



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO



**DOTTORATO DI RICERCA “*Biologia Cellulare E Scienze Tecnologiche Del Farmaco*”
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche**

Settore Scientifico Disciplinare BIO 06

“Analisi dei fattori che rendono le cellule di adenocarcinoma coloretale resistenti o suscettibili all’azione di chemioterapici”

DOTTORE
COORDINATORE
Dott.ssa Maria Magdalena Barreca

Prof.ssa Patrizia Diana

TUTOR
Prof.ssa Ida Albanese

REFERENTE
Prof.ssa Gabriella Sconzo

CICLO XXV – TRIENNIO 2012-2014
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015

DOTTORATO



*“In fin dei conti, non temete i momenti difficili.
Il meglio scaturisce da lì”.*
(Rita Levi Montalcini, 1909-2012)

INDICE

<u>INDICE</u>	2
<u>1. ABSTRACT</u>	5
<u>2. INTRODUZIONE</u>	7
<u>2.1. IL CARCINOMA DEL COLON-RETTO (CRC)</u>	8
<u>2.2. I PROTONCOGENI RAS ED IL CRC</u>	13
<u>2.3. K-RAS ED IL CRC</u>	16
<u>2.4. I PATHWAY DI RAS E LA VIA DELLA PI3K/AKT</u>	17
<u>2.5. RAS ED IL CICLO CELLULARE</u>	21
<u>2.6. p21^{CIP1/WAF1}</u>	24
<u>2.7. EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)</u>	28
<u>2.8. TERAPIE ANTITUMORALI</u>	31
<u>2.8.1. IL CETUXIMAB</u>	33
<u>4. SCOPO DEL PROGETTO</u>	38
<u>5. RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	42
<u>5.1. ANALISI DEGLI EFFETTI DEL CETUXIMAB IN DIVERSE LINEE CELLULARI DI ADENOCARCINOMA COLORETTALE</u>	43
<u>5.1.1. Curve di crescita e saggi di vitalità delle cellule CaCo2</u>	44
<u>5.1.2. Curve di crescita e saggi di vitalità delle cellule HT-29</u>	46
<u>5.1.3. Curve di crescita e saggi di vitalità delle cellule K12 e K13</u>	48
<u>5.2.1. Trattamento delle cellule HT-29</u>	54
<u>5.2.1. a) Saggi di vitalità cellulare</u>	54
<u>5.2.1. b) Analisi del ciclo cellulare</u>	56
<u>5.2.2. Trattamento delle cellule K12 e K13</u>	61
<u>5.2.2. a) Saggi di vitalità cellulare delle cellule K12</u>	61
<u>5.2.2. b) Analisi del ciclo cellulare delle cellule K12</u>	64
<u>5.2.2. c) Saggi di vitalità cellulare delle cellule K13</u>	70
<u>5.2.2. d) Analisi del ciclo cellulare delle cellule K13</u>	73
<u>5.3. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI PROTEINE COINVOLTE NELLA REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE IN CELLULE HT-29 DOPO TRATTAMENTI CON CETUXIMAB E/ O LY294002, E/O PD98059</u>	80

<u>5.4. ANALISI DELL’ESPRESSIONE DI PROTEINE COINVOLTE NELLA REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE IN CELLULE K12 DOPO TRATTAMENTI CON CETUXIMAB E/O LY294002, E/O PD98059.....</u>	<u>84</u>
<u>5.5. ANALISI DELL’ESPRESSIONE DI PROTEINE COINVOLTE NELLA REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE IN CELLULE K13 DOPO TRATTAMENTI CON CETUXIMAB E/O LY294002, E/O PD98059.....</u>	<u>89</u>
<u>6. CONCLUSIONI.....</u>	<u>94</u>
<u>7. MATERIALI E METODI.....</u>	<u>101</u>
<u>7.1. COLTURE CELLULARI.....</u>	<u>102</u>
<u>7.2. TRIPSINIZZAZIONE.....</u>	<u>104</u>
<u>7.3. CONGELAMENTO CELLULARE.....</u>	<u>104</u>
<u>7.4. SCONGELAMENTO DI CELLULE CONSERVATE IN AZOTO LIQUIDO.....</u>	<u>104</u>
<u>7.5. INIBIZIONE DEI PATHWAY PI3K/AKT E RAF/MAPK.....</u>	<u>105</u>
<u>7.6. ANALISI CITOFLUORIMETRICHE CON PROPIDIO IODURO.....</u>	<u>105</u>
<u>7.7. SAGGI DI PROLIFERAZIONE E DI VITALITÀ CELLULARE.....</u>	<u>106</u>
<u>7.8. PREPARAZIONE DEI LISATI PROTEICI TOTALI.....</u>	<u>106</u>
<u>7.9. ELETTROFORESI MONODIMENSIONALE E WESTERN BLOT.....</u>	<u>107</u>
<u>7.10. SAGGI DI IMMUNOFLUORESCENZA PER LOCALIZZAZIONE EGFR.....</u>	<u>109</u>
<u>8. RINGRAZIAMENTI.....</u>	<u>111</u>
<u>9. BIBLIOGRAFIA.....</u>	<u>113</u>

1. ABSTRACT

The colorectal cancer (CRC) is a heterogeneous disease, which develops as a result of numerous genetic and epigenetic alterations. A gene family that is frequently mutated in tumors is that of Ras, which consists of three main oncogenes (H-, K- and N-Ras) on different chromosomes and that encode 21 KDa G proteins. 50% of the CRC presents missense point mutations in K-RAS, 90% of these mutations occurs at codons 12 and 13 and make the protein constitutively active. Moreover, several studies show that mutations in different codons of K-Ras may cause different biological consequences and may lead to a different response to drug treatments. In recent years, several therapies have been developed for the treatment of CRC and among the new drugs there is Cetuximab, a monoclonal IgG1 chimeric human/mouse antibody, which acts against the extracellular domain of EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). The binding of this antibody to the receptor causes a direct inhibition of its tyrosine kinase activity resulting in the inhibition of signal transduction mediated by several pathways such as those of PI3K/AKT, and RAS-RAF/MAPKs. This inhibition stimulates pro-apoptotic mechanisms and the inhibition of cell proliferation. Several studies show that mutations in different codons or different mutations in the same codon of K-Ras may have different biological effects and lead to a different response to therapies based on Cetuximab. K-RAS mutations are in fact considered to be a resistance factor to this drug, even if it has been reported that tumors with codon 13 K-RAS mutations might be less resistant to Cetuximab than tumors with codon 12 mutations. To gain more information on this point, we have analyzed HT-29 clones stably transfected with cDNAs codifying K-RASG12V (clone K12) and K-RASG13D (clone K13) under the control of an inducible promoter. HT-29 cell line and its clones were treated with Cetuximab and their cell cycle and proliferation rate were evaluated after 24, 48 and 72 hours of treatment. HT-29, K12 and K13 cell lines were, also, treated with Cetuximab and/or with LY294002 an inhibitor of PI3K pathway, and/or with PD98059, an inhibitor of RAS pathway, to evaluate the implication of these pathways in the effect induced by Cetuximab on their cell cycle and cell proliferation. After 24h and 48h of treatment with Cetuximab and/or the two inhibitors I have also performed western blot analysis to analyze the level of expression of the *tumor suppressor* protein p53, and its inhibitor, the protein MDM2, and on the expression of one of the p53 targets, the cell cycle regulatory protein p21.

2. INTRODUZIONE

2.1. IL CARCINOMA DEL COLON-RETTO (CRC)

Il cancro coloretale (CRC) è il tumore maligno più frequente nei Paesi sviluppati ed è per questo motivo che è uno dei tumori più studiati. I fattori eziologici e i meccanismi patogenetici che stanno alla base dell'insorgenza di questo tumore sembrano essere complessi ed eterogenei. Le cause del cancro al colon sono diverse e svariate, infatti, sembra che sia fattori ambientali che genetici siano implicati nell'eziopatogenesi di questa malattia. I fattori ambientali sono stati difficili da identificare: tra questi la dieta sembra essere il fattore principalmente coinvolto, confermato anche dal fatto che nei paesi industrializzati il cancro al colon è molto comune. Per esempio una dieta ricca di fibre è associata a una minore insorgenza di questo tipo di tumore poiché il tempo di transito lungo il colon è minore rispetto ad una dieta con poche fibre. Anche l'età gioca un ruolo importante nella predisposizione al cancro al colon; infatti, questo tumore non è comune prima dei 40 anni, ma aumenta significativamente dopo i 50 anni e raddoppia dopo ogni decade. Più recentemente, l'infiammazione cronica, indotta da fattori biologici, chimici e fisici, è stata riconosciuta come fattore di rischio per lo sviluppo del CRC. Infatti, l'infiammazione facilita la fase d'iniziazione delle cellule normali, la loro crescita e la progressione verso la malignità, attraverso la produzione di citochine pro-infiammatorie e di diverse specie reattive dell'ossigeno (Ohshima et al., 2005). Vari agenti ossidanti possono, infatti, danneggiare DNA, RNA e proteine cellulari, mediante reazioni di ossidazione, nitrificazione/nitrosazione e di alogenazione; ciò fa sì che aumentino le mutazioni e siano alterate le funzioni di enzimi e proteine importanti, contribuendo così al processo *multi-step* della cancerogenesi (Ohshima et al., 2005).

Il CRC è tradizionalmente diviso in casi ereditari, sporadici e familiari. Tra le forme ereditarie abbiamo la poliposi adenomatosa familiare (FAP) ed il cancro coloretale ereditario non poliposico (HPNCC). La FAP è una malattia autosomica dominante, che è caratterizzata classicamente dallo sviluppo di centinaia, o migliaia di adenomi nel colon retto durante la seconda decade di età. Pazienti affetti da FAP possono sviluppare il CRC se la malattia non è identificata e trattata in una fase precoce. La base genetica della FAP è una mutazione germinale nel gene APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) (Kudo et al., 2013). L'HPNCC, invece, è una malattia autosomica dominante associata con mutazioni nei geni del mismatch repair (MMR) o nei geni che influenzano l'espressione dei geni MMR (Talseth-Palmer et al., 2013). Approssimativamente, il 75-80% dei casi di cancro coloretale ha invece origine

sporadica. I tumori coloretali sporadici possono essere classificati in due diversi sottotipi a secondo degli eventi molecolari da cui si originano. Il primo è il cosiddetto “*pathway suppressor*” o “*canonical*” e coinvolge, come la FAP, l’instabilità cromosomica (CIN), ed è caratterizzato da perdite alleliche sul cromosoma 5q (APC), 17p (p53) e 18q (DCC/SMAD4) (Al-Sohaily et al., 2012; Armaghany et al., 2012). Nel secondo sottotipo, è coinvolta l’instabilità dei microsatelliti (MSI), ed è chiamato “*mutator pathway*” (Ionov et al., 1993). Oltre a differenze molecolari, questi due sottotipi di CRC presentano diversi comportamenti clinici e distinte caratteristiche istopatologiche.

Il “*pathway suppressor*” è coinvolto nell’80-85% dei CRC. Fearon e Vogelstein hanno proposto un modello di carcinogenesi del coloretto che correla specifici eventi genetici con l’evoluzione morfologica del tessuto. Ogni stadio, nell’evoluzione del tumore, coinvolge una specifica e ben definita alterazione genetica (Figura 1). Mutazioni caratteristiche di questo modello sono presenti nei geni oncosoppressori, come APC, p53, e DCC, ed in oncogeni, come K-RAS (Moràn et al., 2010).

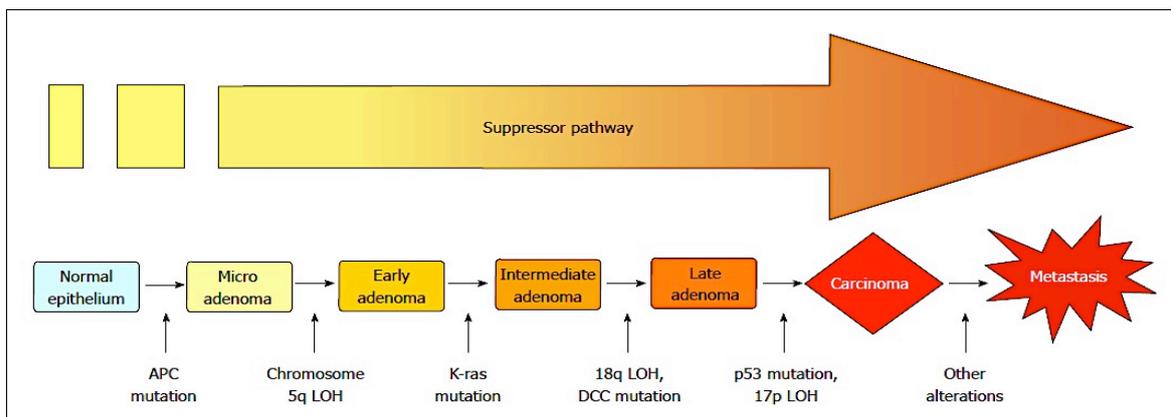


Figura 1. Alterazioni molecolari nel pathway suppressor (Moràn et al., 2010).

Il primo stadio è l’adenoma precoce benigno in cui le cellule epiteliali che rivestono il lume intestinale vanno incontro a iperproliferazione per delezione o mutazioni nel gene oncosoppressore *APC*, formando una massa chiamata polipo o adenoma di tipo tubulare (Figura 2). Il gene *APC* è localizzato sul braccio q del cromosoma 5 e codifica per una proteina di 310 KDa (Jass et al., 2006). *APC* è implicata nella regolazione del pathway di segnalazione Wnt/ β -catenina ed è parte di un complesso multiproteico formato da *APC*, axina, e *GSK3 β* , che lega la β -catenina provocandone: fosforilazione, ubiquitinazione e distruzione mediata dal proteasoma. Alterazioni a livelli di questo complesso portano ad una deregolazione della degradazione della β -catenina, la quale non essendo marcata per la

degradazione trasloca nel nucleo, dove interagisce con i fattori TCF/LEF attivando la trascrizione di molti geni. I geni bersaglio di Wnt sono molteplici, ma è importante ricordarne alcuni che regolano il ciclo cellulare (come i geni per la ciclina D, e per c-Myc), e geni correlati con la progressione tumorale (come quelli per la MMP-7, e per MMP-26). Una delle principali cause di alterazione del complesso multiproteico APC-axina-GSK3 β , sono mutazioni nel gene APC che portano all'assenza della proteina o alla produzione di una proteina tronca. Queste mutazioni interferiscono con il legame di β -catenina, determinando l'attivazione costitutiva del pathway di Wnt. Il fattore APC svolge inoltre ruoli Wnt-indipendenti, la cui alterazione può anche essere correlata con la carcinogenesi; partecipa infatti alla regolazione del citoscheletro, alla segregazione cromosomica, alla mitosi; la sua inattivazione può determinare anche la perdita di adesione cellulare (Morà et al., 2010). Il secondo stadio del CRC è l'adenoma intermedio o adenoma villosa caratterizzato da mutazioni che iperattivano il proto-oncogene K-RAS localizzato nel braccio q del cromosoma 12 (Jass et al., 2006). Recentemente è stato dimostrato che la forma mutante di K-RAS promuove la crescita iperplastica nell'epitelio del colon (tramite l'attivazione di MEK), sopprime il differenziamento nelle cellule tumorali del colon con APC mutato e riduce i contatti cellula-cellula mediati dalle giunzioni (Morà et al., 2010). La delezione dei geni *DCC* (*Deleted in Colon Cancer*) e *SMAD 2/4*, localizzati nel braccio q del cromosoma 18, porta poi alla formazione dell'adenoma tardivo. Il gene *DCC* codifica per una proteina CAM coinvolta nelle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice; le proteine *SMAD 2/4* sono implicate nel pathway anti-proliferativo mediato dal TGF- β . Infine, mutazioni e/o delezioni del gene *p53*, nel braccio p del cromosoma 17, portano al carcinoma *in situ*. Con la perdita di funzionalità della proteina *p53*, implicata nel controllo del ciclo cellulare e nella riparazione dei danni al DNA, si possono accumulare più facilmente ulteriori mutazioni che favoriscono l'invasione tumorale e le metastasi (Jass et al., 2006).

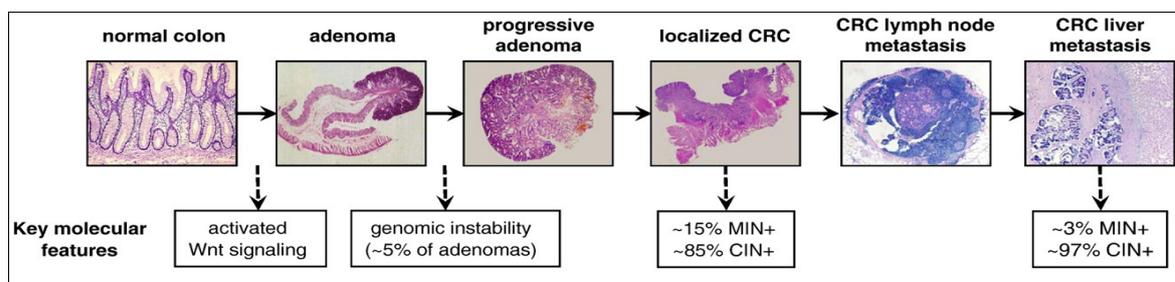


Figura 2. Sezioni epiteliali che mostrano le alterazioni dell'epitelio del coloretto durante la progressione adenoma-carcinoma fino alla formazione di metastasi (Jimenez et al., 2010)

Il “*mutator pathway (MSI)*” è implicato in circa il 15-20% dei CRC sporadici. I tumori MSI sono caratterizzati da un alto accumulo di mutazioni nelle sequenze dei microsatelliti, che sono brevi sequenze nucleotidiche ripetute in tandem. L’accumulo di mutazioni frameshift è causato da un difetto primario nei geni del mismatch repair come: hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 ed hPMS2. Quando le proteine MMR sono funzionali, errori fatti durante la replicazione nelle sequenze dei microsatelliti dalla DNA polimerasi vengono riparati (Figura 3).

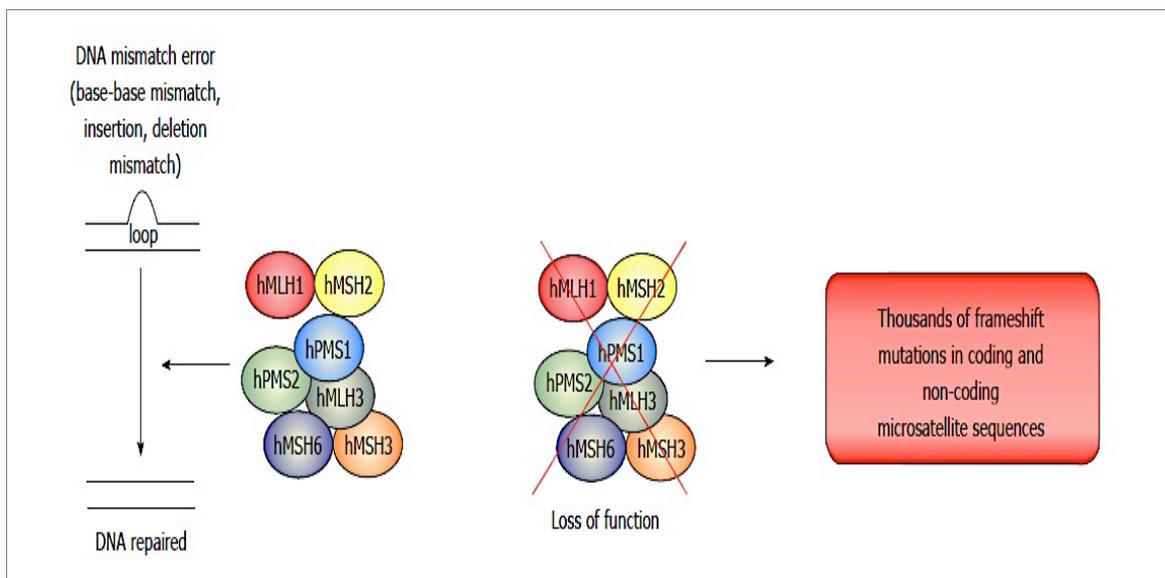


Figura 3. Origine della forte instabilità dei micro satelliti (Moràn et al., 2010).

Mutazioni germinali, o cambiamenti epigenetici, in hMLH1 (silenziamiento principalmente causato dalla metilazione) ed in hMSH2 sono la causa più comune di CRC sporadici MSI-H (MSI di grado elevato) e del carcinoma coloretale ereditario non poliposico (HNPCC). Mutazioni in hMSH6 sono meno frequenti e le alterazioni negli altri geni MMR sono molto rare. Quindi probabilmente la perdita di hMLH1 e hMSH2 è associata con la completa inattivazione del complesso MMR, mentre i difetti delle altre proteine causano solo una parziale deficienza del sistema. I CRC di tipo sporadico MSI-H non mostrano grandi alterazioni citogenetiche e di solito non sono aneuploidi. Questo tipo di tumore presenta un assente, o ridotta, frequenza di mutazioni o perdite alleliche nei geni K-RAS e p53, che di solito si riscontrano nel sottotipo tumorale “pathway suppressor”. Si osservano, invece, mutazioni nelle sequenze dei microsatelliti presenti nei geni implicati nella carcinogenesi coloretale, come TGF β , IGF2R, BAX, MSH3, MSH6, caspasi 5, APC, β -catenina, TCF-4,

axin, MMP-3, E2F-4, BCL-10, cdx-2 e hRAD50. Inoltre, un certo numero di geni normalmente funzionanti sono silenziati dalla metilazione (Morà et al., 2010).

È importante tener presente che i tumori coloretali non sempre possono essere classificati nei due sottotipi, infatti, è stato dimostrato che un piccolo sottogruppo di CRC si sviluppa sia con MSI che CIN, e che alcuni CRC sporadici presentano sia MSI-H che mutazioni di *RAS* e/o delezione di *APC* e *p53* (Jass et al., 2006).

Recentemente, il CRC è stato definito come un tumore che si sviluppa con un percorso multipathway, in cui sono coinvolte non solo alterazioni genetiche, ma anche epigenetiche (Pancione et al., 2012; Patai et al., 2013; Hammoud et al., 2013). Tra i pathway di instabilità genetica che sono stati associati con il CRC, infatti, vi è l’ipermetilazione delle isole CpG (CIMP) (Berg et al., 2011).

I tumori con fenotipo CIMP possono essere distinti in due classi: CIMP1 o CIMP-High (CIMP-H) che mostrano instabilità dei microsatelliti e mutazioni in B-RAF (pV600E) (Van Roon et al., 2013) e CIMP2 o CIMP-Low (CIMP-L) caratterizzati da alterazioni in K-RAS e che raramente presentano instabilità dei microsatelliti o mutazioni in B-RAF o p53 (Levidou et al., 2012). Inoltre, è stato osservato che le mutazioni nei geni k-ras e b-raf sono in genere mutuamente esclusive (Kanthan et al., 2012).

Nelle cellule di CRC vi è, solitamente, una tendenza all’ipometilazione globale del genoma, ma isole CpG in vari promotori mostrano un incremento della metilazione che è spesso legata al silenziamento trascrizionale dei geni da essi regolati (Fearon, 2011). In particolare, l’ipermetilazione delle isole CpG dei promotori dei geni per le E-caderine e per p16^{INK4a} è associata con un fenotipo tumorale metastatico. La proteina p16^{INK4a} è un inibitore delle chinasi ciclina dipendenti 4 e 6 e previene la fosforilazione di RB bloccando in fase G1 il ciclo cellulare (Miranda et al., 2006). Inoltre, l’ipometilazione del DNA, in particolare nelle sequenze pericentromeriche, potrebbe diminuire la fedeltà della segregazione cromosomica, il che suggerisce un possibile ruolo contributivo nel fenotipo CIN (Fearon, 2011).

2.2. I PROTONCOGENI RAS ED IL CRC

Il 50% dei casi di CRC presenta mutazioni puntiformi missense a carico del gene K-RAS. K-RAS è membro della famiglia di proteine RAS. Le proteine RAS sono altamente conservate nelle diverse specie e giocano un ruolo significativo in numerosi processi cellulari, quali la proliferazione, il differenziamento e la morte cellulare (Castellano et al.2011). I tre membri principali della famiglia genica di RAS (H-RAS, N-RAS, e K-RAS) fanno parte della più ampia superfamiglia di piccole proteine G monomeriche in cui sono incluse più di 150 piccole GTPasi, divise in almeno cinque sottofamiglie distinte (Ras, Rho/Rac, Rab, Arf, e Ran), sulla base della relazione della sequenza primaria. In particolare, la sottofamiglia RAS comprende i geni H-RAS, N-RAS, e K-RAS insieme con i correlati loci *R-Ras/TC21*, *Ral*, and *Rap 1*. Tutte le proteine della superfamiglia RAS condividono una struttura molecolare molto simile ed una comune capacità di legare ed idrolizzare il GTP. Le proteine RAS sono dotate di due regioni, switch-1 e switch-2, che cambiano la loro conformazione a seconda che siano legate al GDP o al GTP, alternandosi così tra uno stato "attivo" in cui sono legate al GTP, ed uno "spento" in cui sono legate al GDP. L'attivazione di RAS è accelerata da GEF (*fattore di scambio del nucleotide guanilico*), il quale stimola lo scambio GDP/GTP determinando l'attivazione di numerosi pathwas a valle, fra cui quelli mediati da RAF e da PI3K, come descritto in seguito. La sua inattivazione è invece regolata dalla proteina GAP (*proteina attivante la GTPasi*) che ne stimola l'attività GTP-asi (Figura 4).

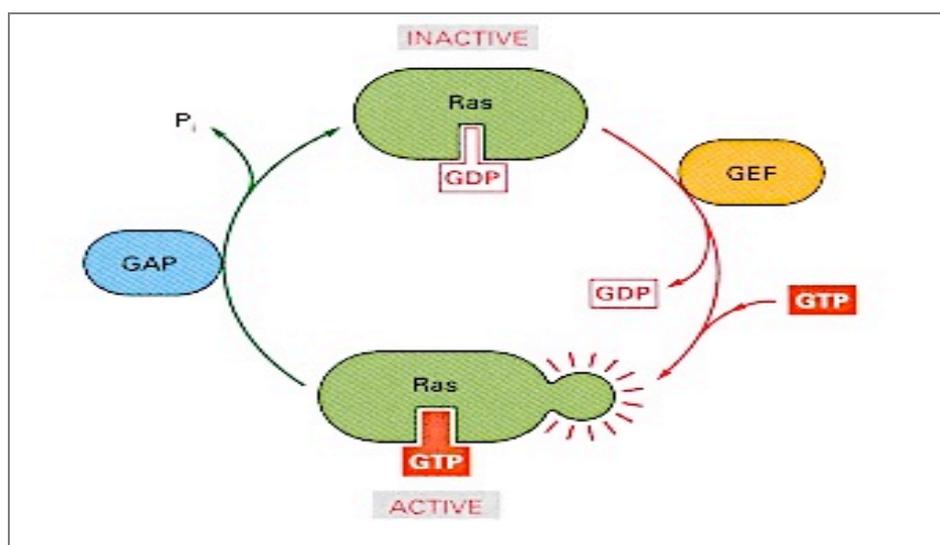


Figura 4. Rappresentazione schematica dei meccanismi di attivazione/inattivazione di RAS.

Questo comportamento permette a queste proteine di funzionare come interruttori molecolari in diversi processi di trasduzione di segnali extracellulari all'interno delle cellule.

L'espressione dei geni H-RAS, N-RAS, e K-RAS è quasi ubiquitaria ed ampiamente conservata tra le specie. In particolare, questi tre loci codificano per quattro differenti isoforme proteiche: H-RAS, N-RAS, K-RAS4A, e K-RAS4B, quest'ultimo risultante da uno splicing alternativo dell'esone 4 del locus K-RAS. Queste quattro isoforme Ras sono omologhe per quanto riguarda la loro sequenza amminoacidica (~80%), la loro differenza risiede nella cosiddetta *regione HVR* (ipervariabile) del loro dominio C-terminale. La regione HVR contiene un motivo *CAAX* (C=cisteina, A=amminoacido alifatico e X=serina o metionina), sito di specifiche modifiche post-traduzionali necessarie per il legame della proteina a microdomini della membrana plasmatica. Infatti, in base alle diverse modifiche post-traduzionali, le isoforme di RAS si localizzano in specifici microdomini di membrana. La differente localizzazione ha importanti conseguenze sulle interazioni di RAS con gli effettori e sull'attivazione dei pathway a valle e quindi di conseguenza sui differenti effetti biologici di RAS. Le modifiche post-traduzionali influenzano la capacità di segnalazione delle diverse isoforme di RAS e la differenza principale che determina la specifica funzione potrebbe dipendere dalle proporzioni relative di ciascuna isoforma in ogni regione cellulare (Castellano et al., 2011) (Figura 5). Inoltre, negli ultimi anni alcune ricerche hanno suggerito che H-RAS attiva fortemente il pathway PI3K/AKT, mentre K-RAS è un attivatore più potente per il pathway RAF/MAPK (Grewal et al., 2011), anche se in merito vi sono ancora dei dubbi e sono in atto degli studi volti a confermarlo.

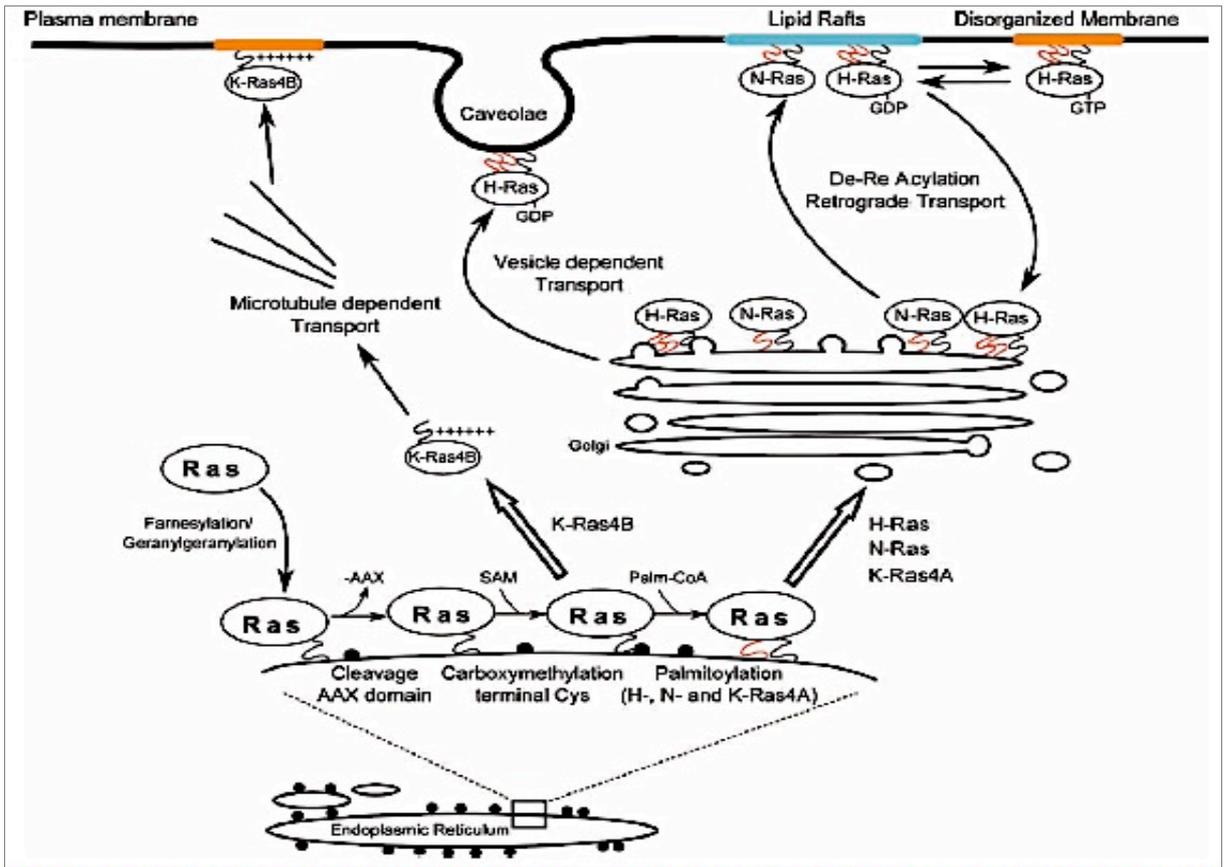


Figura 5. Schema del processamento, del trasporto e della localizzazione delle proteine RAS. (Castellano et al., 2011).

2.3. K-RAS ED IL CRC

Mutazioni nella famiglia dei geni RAS hanno un ruolo importante nella tumorigenesi umana (Chow et al., 2012). Le mutazioni puntiformi missense oncogeniche nei codoni in posizione 12, 13 e 61 nei geni H-RAS, N-RAS, e K-RAS sono le più comuni alterazioni genetiche nei tumori dei mammiferi. Queste mutazioni compromettono l'attività GTP-asi delle proteine RAS, bloccandole nello stato attivato e determinando, quindi, continui segnali per i fattori a valle anche in assenza di segnalazione extracellulare.

Mutazioni nei geni RAS, prevalentemente K-RAS, sono riscontrate, in particolare, negli adenocarcinomi del pancreas (90%), nel colon (50%), nel polmone (30%), nei tumori della tiroide (50%) e nella leucemia mieloide acuta (30%). Le mutazioni di N-RAS e H-RAS sono meno comuni e si trovano rispettivamente, soprattutto, nella leucemia mieloide acuta e nel tumore al rene, ed in quello alla vescica (Grewal et al., 2011). Questa diversa frequenza di mutazione dei geni H, -N e K-Ras potrebbe essere dovuta al diverso effetto che le mutazioni hanno sulla proliferazione cellulare, sul differenziamento e sulla progressione tumorale (Haigis et al., 2008).

Il gene K-RAS è spesso mutato nel CRC ed è stato associato con l'inizio e la progressione del cancro. In particolare, K-RAS è un proto-oncogene localizzato nel cromosoma 12p12.1, può andare incontro a mutazioni puntiformi a livello di hot-spot critici delle sequenze codificanti. Le mutazioni K-RAS, una volta acquisite, sono mantenute durante lo sviluppo del tumore, e per questo, negli ultimi anni si è visto che sono eccellenti targets per i test diagnostici. Le mutazioni nel gene RAS interessano prevalentemente il codone 12 (GGT=glycine) e/o il codone 13 (GGC=glycine) dell'esone 1 e solo nel 5% dei casi il codone 61 (CAA=glutamine) situato nell'esone 2 (Palmirotta et al., 2011). I residui aminoacidici che corrispondono nella proteina a questi codoni risiedono nel sito catalitico, dove quindi si localizza l'attività GTP-asi, che viene ridotta o inibita, rendendo RAS iperattivo, quando per effetto delle mutazioni si ha una sostituzione aminoacidica. Il dominio altamente conservato tra le diverse isoforme di RAS comprende tre regioni: P-loop, che contiene il motivo GXGGXGKS (aminoacidi 10-17) per il legame del GTP, e switch I e II, che controllano il legame con i regolatori (GAPs e GEFs) e gli effettori. Gli aminoacidi 12 e 13 si trovano nel sito P-loop, mentre l'amminoacido 61 è localizzato nella regione Switch-II (Figura 6) (Wicki et al., 2010). La maggior parte delle mutazioni osservate sono transizioni G > A e trasversioni G > T (Palmirotta et al., 2011).

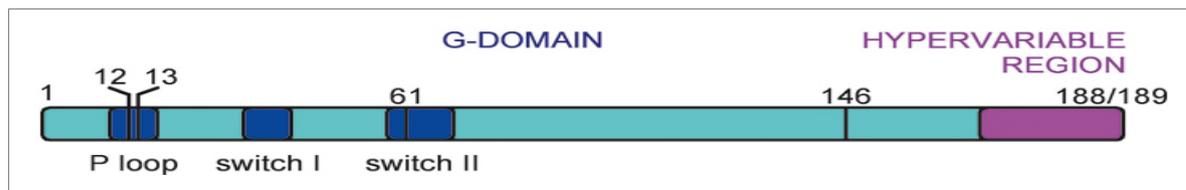


Figura 6. Rappresentazione schematica della localizzazione dei residui aminoacidici 12, 13 e 61. Il dominio altamente conservato (o dominio-G) tra le diverse isoforme di RAS comprende le regioni P-loop per il legame del GTP e Switch I e II per il legame con gli effettori e con le proteine GAP e GEF. (Wicki et al., 2010).

K-RAS mutato è stato trovato in circa il 50% dei CRC. Le mutazioni di K-RAS più comuni sono G12D, G12A, G12R, G12C, G12S, G12V e G13D, e fra queste le più frequenti sono la G12D (la cui proteina ha un aspartato in posizione 12 al posto di una glicina), la G12V (in cui la glicina è sostituita dalla valina) e la mutazione nel codone 13 (con la sostituzione della glicina con l'aspartato) (Tan et al., 2012). Mutazioni nel codone 13 di K-RAS sembrano essere associate ad un carcinoma aggressivo, con metastasi linfonodali, un alto grado SPF (frazione in fase S), tendenza a recidive dopo asportazione del tumore e prognosi infausta per il paziente. Mutazioni nel codone 12, sono invece associate ad un fenotipo tumorale mucinoso e senza un alterato tasso di proliferazione cellulare (Bazan et al., 2002).

2.4. I PATHWAY DI RAS E LA VIA DELLA PI3K/AKT

I segnali che attivano il pathway di RAS sono mediati da diversi ligandi che si legano ai corrispondenti recettori, fra cui i più studiati sono i recettori *RTK* (*recettori a tirosina chinasi*). Il legame di specifici ligandi, come l'*EGF* (*fattore di crescita epidermico*) o il *TGF- α* (*fattore di crescita trasformante α*), con il recettore EGFR (*Epidermal growth factor receptor*), provocano la dimerizzazione e l'autofosforilazione in tirosine del recettore con il successivo avvio della segnalazione intracellulare. Il recettore attivato recluta sulla membrana plasmatica un complesso, SOS/Grb2, che converte RAS dalla forma inattiva (RAS-GDP) alla forma attiva (RAS-GTP). Grb2, funziona come adattatore molecolare, legando, con il suo dominio SH2, il RTK fosforilato nella porzione intracellulare, mentre con il suo dominio SH3 si lega alla proteina SOS, che è un fattore RAS-GEF, quindi si favorirà l'attivazione di RAS. Quest'ultima attivando RAF avvierà una cascata di fosforilazione che porta all'attivazione delle MAPKs (ERK1 ed ERK2), che regoleranno la trascrizione di geni codificanti fattori coinvolti nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare.

RAS può attivare anche altri effettori, tra cui la PI3K (*fosfatidilinositolo-3-chinasi*) e la proteina chinasi B (*AKT, serina/treonina chinasi*). Quest’ultima trasduce segnali molecolari che attivano fattori importanti nella crescita cellulare (Figura 7) e nella sopravvivenza (Scartozzi et al., 2012).

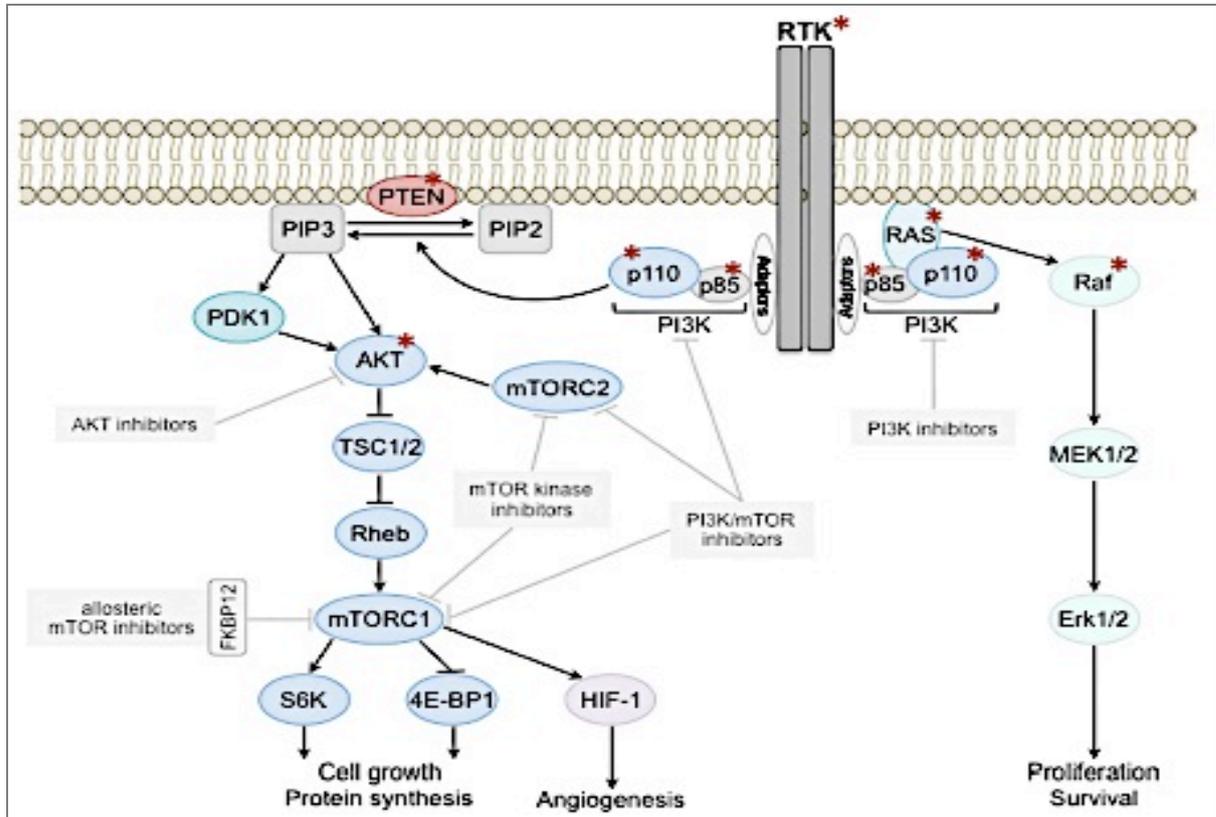


Figura 7. Rappresentazione dei pathway attivati da RAS (Weigelt e Downward, 2012).

Un’altra importante segnalazione a valle di RAS, come già detto, è quindi il pathway PI3K/AKT. Questo pathway è altamente conservato, e la sua attivazione è strettamente controllata tramite un processo a più stadi.

Le PI3K sono una famiglia di chinasi lipidiche che trasmettono segnali intracellulari coinvolti in diversi processi cellulari come proliferazione, crescita, apoptosi e riarrangiamento citoscheletrico. Le PI3Ks si possono dividere in tre classi e spesso l’iperattivazione delle **PI3K di classe I** è associata con il cancro. Le PI3K di classe I sono proteine eterodimeriche costituite da una subunità catalitica ed una regolatoria codificate da diversi geni. La subunità catalitica ha quattro isoforme p110 α , p110 β , p110 δ e p110 γ , che combinandosi con una delle cinque isoforme della subunità regolatoria p85 (p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ o p50 α) generano una chinasi attiva. Le PI3K di classe I sono attivate da segnali trasdotti a monte da RTKs, tra cui

l'EGFR il PDGFR (*Platelet derived growth factor receptor*), l'IR (*insulin receptor*) e recettori accoppiati a proteine G. Le PI3K di classe I, attivate, fosforilano il lipide PIP₂ (*fosfatidilinositolo 3,4-bifosfato*) formando il PIP₃ (*fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato*) a livello del versante interno della membrana plasmatica, il quale agirà da secondo messaggero cellulare reclutando altri fattori. Il PIP₃ si lega quindi al dominio PH di AKT e di PDK1 (*Phosphoinositide dependent kinase 1*), reclutandoli alla membrana plasmatica. AKT è attivata per fosforilazione ad opera della PDK1 nella treonina 308 (*thr 308*) nel dominio chinasi (Gaikwad et al., 2012). L'ulteriore fosforilazione di AKT nel dominio regolatorio C-terminale sulla serina 473, da parte di mTOR e di DNA-PK, stimola l'attività completa di AKT (Hemming et al., 2012). La chinasi AKT attivata sarà in grado di fosforilare un ampio range di proteine coinvolte nella regolazione della crescita cellulare, della progressione del ciclo cellulare e della sopravvivenza. Inoltre, AKT è coinvolta nell'inattivazione della cascata caspasi fosforilando ed inattivando BAD e svolgendo un ruolo anti-apoptotico anche attivando fattori trascrizionali come NF- κ B (Hirsch et al., 2008).

AKT controlla l'inizio della sintesi proteica mediante segnali che procedono attraverso le proteine: TSC (*tuberous sclerosis complex*), Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) e le proteine mTOR (*mammalian target of rapamycin*) che agiscono su due effettori a valle, che sono S6K (*p70 S6 kinase*) e 4EBP (*eukaryotic initiation factor 4E-binding protein*). AKT regola la proliferazione cellulare inattivando la GSK3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*) e sequestrando nel citoplasma il fattore trascrizionale FOXO-1 (*forkhead box-O-1 transcription factor*), in seguito a fosforilazione (Gaikwad et al., 2012). Nelle cellule, la GSK3 β è costitutivamente attiva e per fosforilazione inibisce la GS (*glicogeno sintasi*), che regola il metabolismo glucidico, e la β -catenina, non permettendo che questa attivi l'espressione di due proteine importanti nella regolazione della progressione del ciclo cellulare, c-MYC e ciclina D1, implicata nella transizione G₁/S del ciclo cellulare (Hirsch et al., 2008). I fattori trascrizionali FOXO controllano negativamente la progressione del ciclo cellulare a livello della transizione G₁/S, regolando la trascrizione di geni che codificano per gli CDKI (*inibitori delle chinasi ciclina dipendenti*) come p27^{kip1} e p21^{waf-1}. Pertanto, cellule che presentano una proteina AKT costitutivamente attiva hanno difficoltà ad arrestarsi a livello del *checkpoint* G₁/S. Inoltre AKT può anche fosforilare direttamente p21 e p27 sequestrandoli nel citoplasma, dove non possono svolgere il loro ruolo anti-proliferativo.

Il pathway PI3K/AKT ha, quindi, l'effetto di aumentare la replicazione cellulare e la sopravvivenza e di ridurre l'inibizione della crescita e l'apoptosi (Figura 8) (Gaikwad et al., 2012).

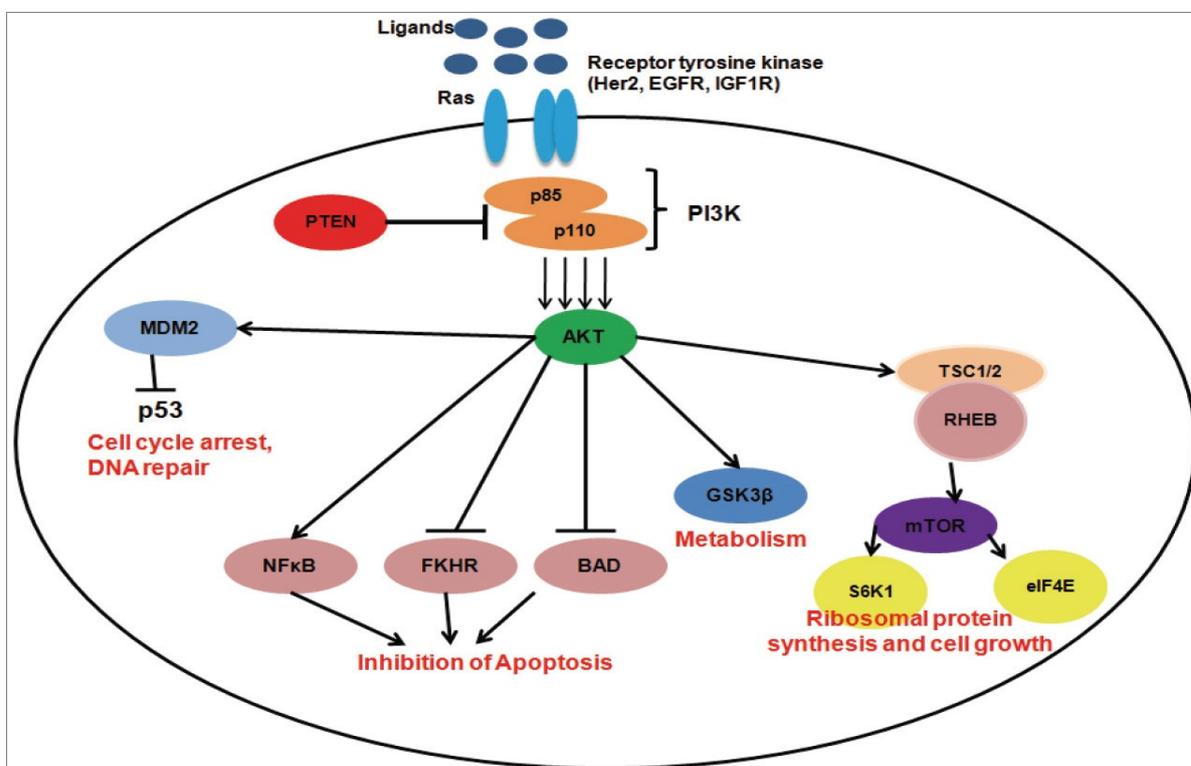


Figura 8. Rappresentazione schematica del pathway PI3K/AKT e le vie regolate da AKT (Gaikwad et al., 2012).

L'attivazione mutazionale o l'amplificazione di PI3K di classe I e l'inattivazione genetica o epigenetica di PTEN (vedi oltre), che determinano un aumento della segnalazione di PI3K, sono associate con la trasformazione cellulare oncogenica e l'insorgenza del cancro. In diversi tipi di tumori, infatti, sono state trovate alterazioni genetiche nella subunità catalitica p110 α di PI3K. Mutazioni somatiche nel gene PI3KCA, che codifica per questa subunità catalitica della PI3K di classe IA, sono state osservate più frequentemente in due hot spot: nel dominio elicoidale (E545K e E542K) e nel dominio chinasi (H1047R). Queste mutazioni inducono un aumento di funzione in p110 α , per cui l'attività chinasi della proteina mutante diventa significativamente più alta e agisce come segnale oncogenico.

Il pathway PI3K/AKT e quello di RAS-RAF-MAPK sono tra i più caratterizzati nella biologia del cancro. Questi due pathway, come si è visto, lavorano parallelamente, attraverso cross-talk (Oh et al. 2002; Bouali et al. 2009); spesso, risultati positivi dal punto di vista terapeutico si

ottengono solo attraverso l’inibizione di entrambe le vie. Dati clinici recenti dimostrano che mutazioni attivanti in K-RAS predicono una resistenza al trattamento con gli inibitori di EGFR, come il Cetuximab e il Panitumumab come vedremo più avanti nel testo (Loboda et al., 2010).

Lo studio di questi due pathway risulta importante per il ruolo che svolgono nei diversi processi cellulari. Queste vie di trasduzione del segnale sono considerate oggi i principali targets delle terapie antitumorali in diversi tipi di cancro in quanto la loro iperattivazione è spesso la causa della resistenza tumorale ai chemioterapici.

2.5. RAS ED IL CICLO CELLULARE

Il ciclo cellulare è un’ordinata serie di eventi che si verifica in risposta a stimoli mitogeni esterni. La divisione cellulare comprende due fasi: l’interfase e la fase M o mitosi. L’interfase a sua volta comprende la fase G₁ (dall’inglese GAP 1), durante la quale la cellula si prepara per la replicazione del DNA che avviene nella fase successiva detta S e la fase G₂ (dall’inglese GAP 2) in cui la cellula si prepara per la fase M. La progressione della cellula attraverso le diverse fasi del ciclo cellulare è finemente controllata, infatti, solo quando una fase del ciclo è stata correttamente completata la cellula può progredire alla fase successiva. Errori durante la replicazione del DNA o nella segregazione dei cromosomi sono alla base del processo di tumorigenesi. L’azione delle molecole coinvolte nel controllo di questi processi si esplica in particolari punti del ciclo cellulare chiamati *check-points*, o “punti di controllo”. Questi *check-points* sono governati dalle complesse interazioni tra i diversi attori molecolari e si attivano in risposta a danni al DNA o a stimoli proliferativi aberranti. L’importanza di tali punti di controllo è dimostrata dal fatto che i geni coinvolti nel loro controllo sono frequentemente alterati nelle cellule tumorali, che sono appunto caratterizzate da una incontrollata proliferazione.

I due *check-points* più importanti e studiati si trovano alla transizione tra la fase G₁ e la fase S (G₁/S) e tra la fase G₂ e la fase M (G₂/M), ma punti di controllo sono presenti anche all’interno della fase S e della fase M. Molte delle proteine con funzione di sensori, mediatori o effettori sono comuni ai diversi checkpoints (Lukas et al., 2004). La transizione da una fase all’altra del ciclo cellulare avviene in maniera altamente regolata da proteine chinasi la cui attività è dipendente dal loro legame con le cicline (CDKs). Questo legame può non essere altamente specifico: infatti, la ciclina E lega solo CDK2, la ciclina B solo CDK1, ma le

ciclina D possono invece legare le CDK2, 4, 6, e la ciclina A lega sia CDK2 che CDK1. Le CDKs sono una famiglia di serina/treonina chinasi espresse in maniera costante durante tutto il ciclo, al contrario le cicline hanno un'espressione differenziale durante il ciclo cellulare, la loro sintesi e degradazione (proteasoma-dipendente), infatti, è strettamente legata alle fasi del ciclo cellulare. La ciclina D raggiunge il suo picco d'espressione in fase G₁ precoce; con il progredire della fase G₁ viene prodotta la ciclina E, la cui funzione è importante per il passaggio alla fase S; con l'ingresso in fase S i livelli di ciclina E cominciano a diminuire, mentre aumenta la ciclina A; infine, in fase G₂ si ha il picco d'espressione per la ciclina B. Le cicline D integrano la risposta proliferativa a segnali mitotici di differente origine, attraverso l'attivazione di RAS, e la loro concentrazione declina alla fine dello stimolo. RAS attraverso il pathway di ERK, induce l'espressione delle cicline D le quali legano le CDK4 e CDK6 formando un complesso necessario per l'ingresso in fase G₁ poiché fosforila la proteina del retinoblastoma (pRB).

La proteina RB è un regolatore negativo del ciclo cellulare che, nella sua forma attiva ipofosforilata, reprime il fattore trascrizionale eterodimerico E2F/DP-1, impedisce la transizione G₁/S, sequestrando i membri della famiglia di fattori di trascrizione E2F ad azione attivatoria (E2F-1, -2, -3), dai quali dipende la trascrizione di diversi geni necessari all'ingresso nella fase S ed ai processi che in essa avvengono (i.e. la replicazione del DNA) (Weinberg et al., 1995; Shapiro et al., 1999). RB nel suo stato iperfosforilato rilascia E2F permettendo la trascrizione di E2F stesso e di geni i cui prodotti proteici sono essenziali per la progressione nella fase S (Fischer et al., 2013).

Durante la fase G₂, si ha il legame della ciclina A con la CDK1 per promuovere l'ingresso in fase M. Questa fase è regolata da due complessi: uno costituito dalla ciclina A e la CDK1, presente solo all'inizio della fase M; l'altro formato dalla ciclina B e la CDK1 che rimane attivo per più tempo. La proteina RAS sembra essere responsabile della regolazione dell'espressione delle cicline A, E e del fattore di trascrizione E2F attraverso la via di segnalazione di ERK (Crespo et al., 2000).

L'attività delle CDKs, e dunque la progressione nel ciclo cellulare, viene regolata negativamente da proteine che inibiscono l'attività enzimatica delle CDK e sono pertanto definite come CDKI (CDK-Inhibitors) distinti in due famiglie: CIP/KIP e INK4. La prima famiglia CIP/KIP comprende p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} e p57^{KIP2}, inibitori non specifici sia delle CDK che delle cicline. La famiglia INK4 è invece costituita da quattro membri, p16^{INK4a},

$p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$ e $p19^{INK4d}$, inibitori specifici delle chinasi ciclina D-dipendenti (CDK4 e CDK6) (LaRue et al., 1998).

La proteina RAS può anche indurre l'espressione dell'inibitore $p16^{INK4a}$ (o $p15^{INK4b}$), bloccando la fosforilazione di pRB e la progressione attraverso G_1 (Serrano et al., 1996).

RAS agisce come oncogene trasformante agendo anche sui livelli di espressione della proteina p53. La proteina RAS può da un lato promuovere la degradazione di p53 attraverso l'induzione di MDM2, una E3-ubiquitina ligasi (Palmero et al. 1998), e dall'altro lato una iperattivazione di RAS up-regola i livelli della proteina p53 in modo $p19^{INK4d}$ ($p14^{ARF}$ in cellule umane) dipendente o indipendente. Il *tumor suppressor* $p19^{INK4d}$ agisce inattivando MDM2, stabilizzando così p53 che regola diversi fattori coinvolti nella riparazione del danno al DNA e nell'apoptosi. La proteina p53 è frequentemente mutata nei tumori umani e la sua espressione aumenta in risposta a danno al DNA, stress cellulare, ipossia e stress ossidativo. La perdita di espressione di p53 causa instabilità genomica e favorisce la progressione tumorale (Kelly-Spratt et al., 2004), gli effetti oncogenici di K-RAS sono infatti predominanti in soggetti con background genetico p53-deficiente (Sevignani et al., 1998).

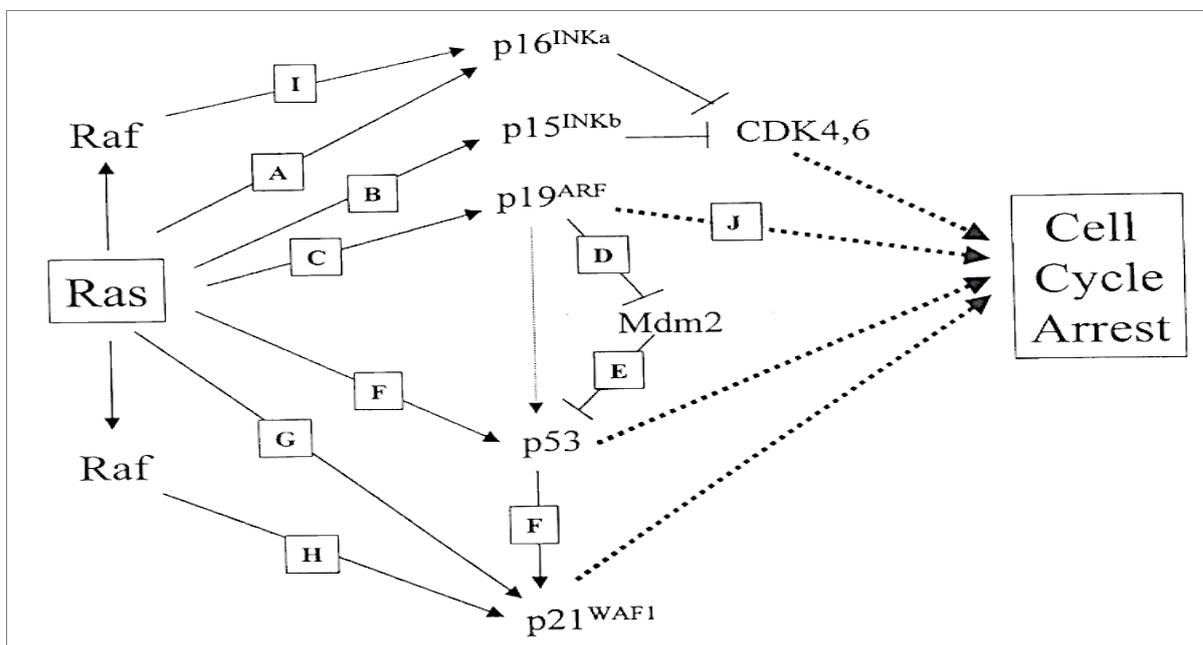


Figura 9. Pathway attraverso cui RAS induce l'arresto della crescita cellulare, identificati in cellule primarie (fibroblasti umani e murini) (Crespo et al., 2000).

Un'alterazione, quindi, in uno dei meccanismi di controllo del ciclo cellulare può condurre ad un'iperproliferazione che potrebbe, infine, portare la cellula verso una trasformazione neoplastica.

2.6. p21^{CIP1/WAF1}

Alterazioni nei geni che codificano per gli inibitori delle CDK (CKIs), si verificano spesso in diversi tipi di tumori e sembrano anche essere implicati nella resistenza ai chemioterapici. Tra gli inibitori del ciclo cellulare vi è la proteina p21, un *tumor suppressor* capace di inibire la proliferazione sia delle cellule normali che di quelle tumorali. Questa proteina è coinvolta nell'arresto in fase G₀/G₁ o in fase G₂/M del ciclo cellulare, ed insieme ad altre proteine come GADD45 e 14-3-3 σ inibisce le cicline A o E legate a CDK2, e le CDK4 legate alle cicline D1 o D2 (Hernandez et al., 2013; Zhang et al., 2013). La proteina p21 sembra inoltre favorire la formazione dei complessi ciclina D-CDK4/6 e quindi, la progressione del ciclo cellulare. Si ritiene che il ruolo di p21 come attivatore o inibitore dei complessi CDK/ciclina dipenda dal suo livello di espressione: a basse concentrazioni sembra favorire il ciclo cellulare, mentre ad alte si comporta da inibitore (Harper et al., 1993; LaBaer et al., 1997; Kim et al., 2012).

Studi recenti hanno invece dimostrato che il ruolo di p21 in realtà dipende dalla sua localizzazione all'interno della cellula, cioè è possibile definire la proteina p21 come un soppressore tumorale quando è localizzata nel nucleo e come un oncogene quando si trova a livello citoplasmatico (Romanov et al., 2012).

La proteina p21 a livello nucleare inibisce il ciclo cellulare legandosi e inibendo i fattori trascrizionali E2F, STAT3 e c-MYC e il co-attivatore trascrizionale p300/CBP. Inoltre è anche in grado di inibire direttamente la sintesi del DNA attraverso l'inattivazione del fattore PCNA (antigene nucleare di proliferazione cellulare) (Dotto, 2000), è capace di interagire direttamente con l'enzima PARP1 per permettere la riparazione di rotture a singolo e a doppio filamento del DNA.

Oltre al ruolo anti-proliferativo legato alla sua localizzazione nucleare, p21 svolge altre funzioni quando si trova nel citoplasma. Nel citoplasma sembra controllare la riorganizzazione del citoscheletro, la migrazione cellulare, e sembra inibire l'attivazione delle caspasi e inibire la proteina pro-apoptotica JNK.

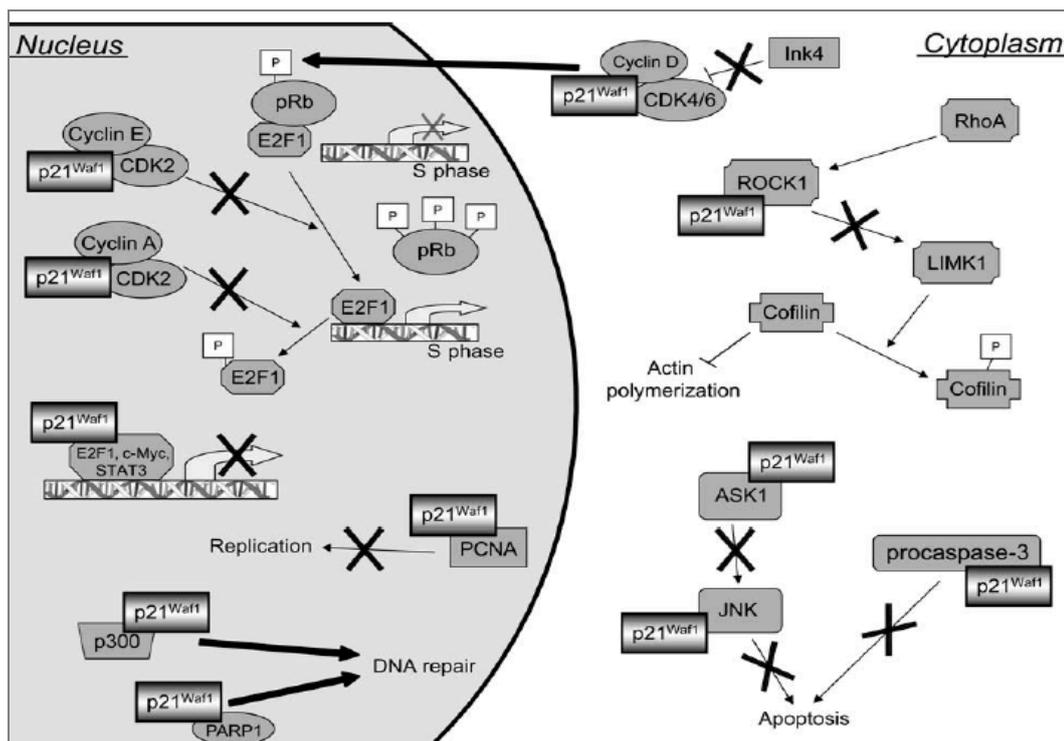


Figura 10. Funzioni nucleari e citoplasmatiche della proteina p21 (Romanov et al., 2012).

L'espressione di p21 è direttamente regolata dal *tumour suppressor* p53, un fattore trascrizionale che regola geni coinvolti nel controllo della crescita cellulare. La proteina p53 sembra indurre l'arresto della crescita e la morte cellulare, attraverso p21, in risposta a danni al DNA (Tarakji et al., 2012). Il promotore del gene p21 presenta, infatti, due elementi di risposta a p53 che sono altamente conservati nell'uomo, nel topo e nel ratto (Woods et al., 1997).

La proteina p21 può essere regolata da RAS anche in modo p53 indipendente, attraverso l'attivazione di RAF1 mediata dalla chinasi ERK (Park et al., 2003). È stato riportato che in cellule di adenocarcinoma colorettole HT-29, che hanno mutazioni in p53, l'incremento di espressione di p21 in seguito a danno al DNA avviene attraverso il pathway di ERK e indipendentemente da p53 (Lee et al., 2006) e sembra che l'aumento di p21 indipendente da p53 causi prevalentemente un blocco in fase G₂/M (Shin et al., 2013). Nelle cellule esistono numerosi meccanismi di regolazione di p21 che non coinvolgono p53. La regolazione di p21 indipendentemente da p53 sembra essere associata con mutazioni in K-RAS, mentre sembra essere dipendente da p53 in caso di mutazioni in H-RAS (Mitomi et al., 2007; Jia et al., 2012). Nel cancro al colon p21 è un gene target del TGF- β e dell'attivina (un membro della superfamiglia del TGF- β) che trasducono segnali intracellulari tramite SMAD2 e SMAD3. Il

TGF- β upregola p21 stimolando un'elevata soppressione della crescita, l'activina invece provoca un decremento dei livelli di p21 ed è un forte induttore dell'apoptosi. Nel tumore colorettole di tipo MSI-H sia la segnalazione del TGF- β che dell'activina sono inibite da mutazioni frameshift nei recettori di superficie di tipo 2, ACVR2 e TGFBR2, mutazioni quindi associate a una cattiva prognosi per i pazienti (Bauer et al., 2012). Un altro importante fattore trascrizionale che regola l'espressione di p21 è MYC. Un fattore trascrizionale che eterodimerizza con un altro fattore, MAX. Il dimero MYC/MAX si lega alle E-box del promotore di p21 inibendo l'attivazione trascrizionale e promuovendo la proliferazione cellulare. È stato anche dimostrato che MYC è capace di inibire l'espressione di p21 impedendo il legame di p53 al promotore (Seoane et al., 2002) e attivando l'espressione della proteina AP4 che reprime la trascrizione del gene p21 (Jackstadt et al., 2013).

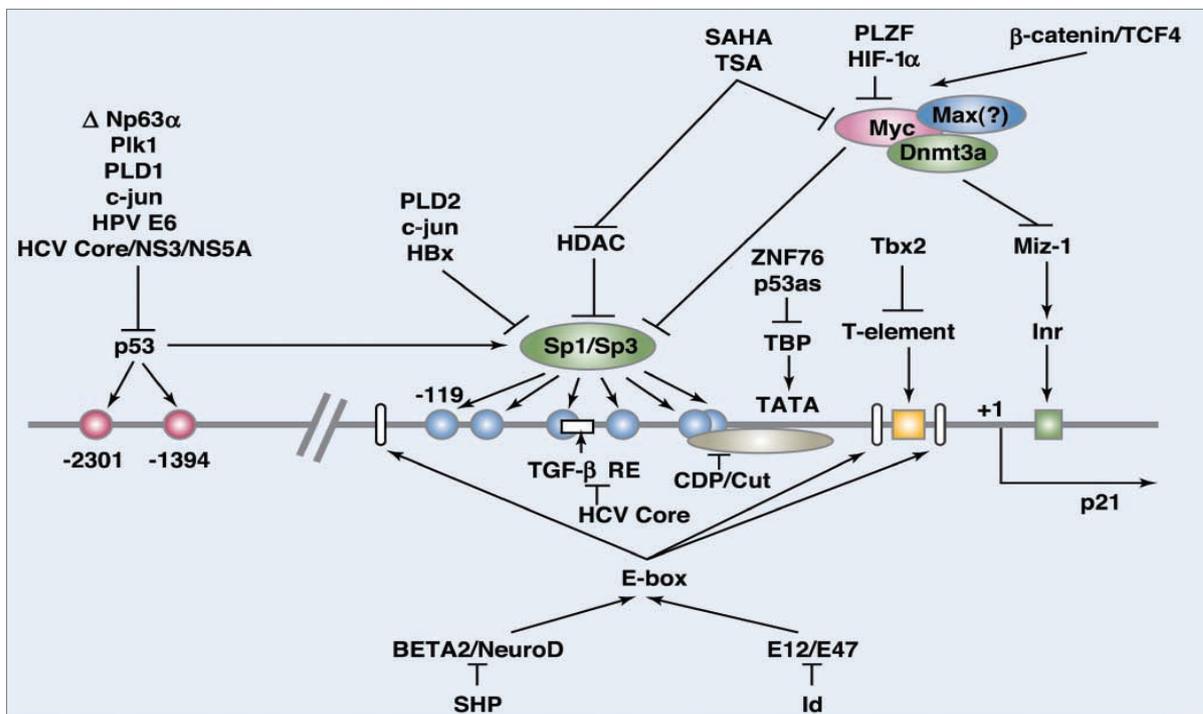


Figura 11. Rappresentazione schematica della regolazione dell'espressione del gene p21 (Gartel et al., 2005).

Oltre alla complessa regolazione a livello trascrizionale, possono intervenire modifiche post-traduzionali nel modulare la funzione, la stabilità e la localizzazione di p21 (Jung et al., 2010; Koster et al., 2010).

AKT1, PKC e PIM-1 sono chinasi che regolano la progressione del ciclo cellulare fosforilando p21 in treonina 145 e serina 146, che si trovano all'interno del segnale di localizzazione nucleare (NLS) e al sito di legame a PCNA. La fosforilazione da parte di PKC

in entrambi i siti riduce il legame di p21 a PCNA e la stabilità della proteina. La fosforilazione solo sulla treonina 145 da parte di AKT1 porta alla traslocazione di p21 dal nucleo al citoplasma, dove non può svolgere il suo ruolo anti-proliferativo, mentre la fosforilazione solo a livello della serina 146 ne aumenta la stabilità (Abukhdeir et al., 2008). La chinasi AKT2 svolge un ruolo opposto a AKT1, si lega infatti a p21 impedendo la fosforilazione in treonina 145 da parte di AKT1 e inducendo un accumulo di p21 nel nucleo. Quindi AKT1 promuove la proliferazione cellulare e inibisce l'apoptosi, mentre AKT2 determina il blocco del ciclo cellulare (Héron-Milhavet et al., 2006).

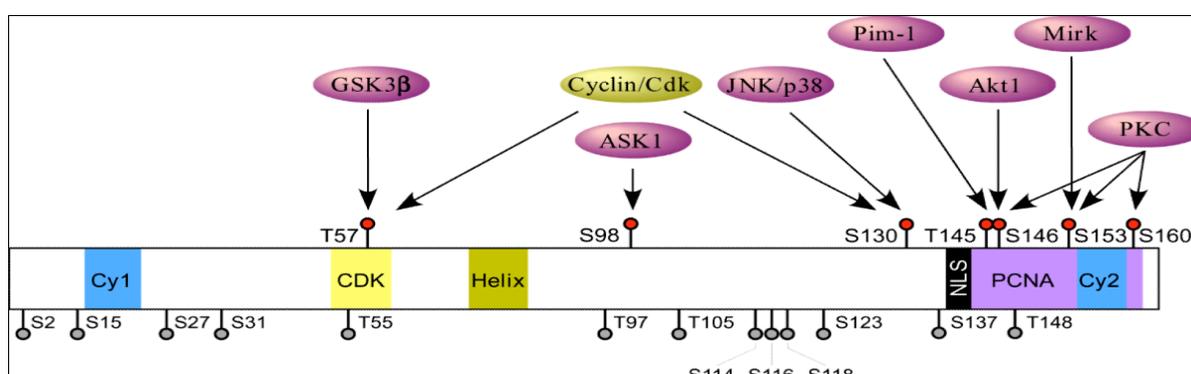


Figura 12. Rappresentazione schematica dei siti più significativi della proteina p21. p21 ha sei domini funzionali ben definiti che comprendono due domini di legame per le cicline (Cy1 and Cy2), un dominio di legame per le chinasi (CDK), un motivo elica (Helix), un dominio di legame per PCNA (PCNA), ed il segnale di localizzazione nucleare (NLS). Il polipeptide p21 contiene 20 residui serine/threonine, sette dei quali possono essere fosforilati da diverse chinasi (in alto nella Figura). Altri cinque residui sono potenziali siti di fosforilazione (S31, T97, S114, S123, e S137) secondo analisi con il programma NetPhos 2.0 (Technical University of Denmark) (Jung et al. 2011)

2.7. EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)

Un ruolo importante nell'attivazione dei diversi pathway di trasduzione del segnale mediati da RAS o da PI3K, come già accennato precedentemente, è svolto dal recettore EGFR. L'EGFR è una glicoproteina di 170 kDa codificata da un gene localizzato sul cromosoma 7p12. L'EGFR è un membro della famiglia di recettori transmembrana a tirosina chinasi (TKR) ErbB, costituita da quattro recettori correlati tra loro, ErbB1, ErbB2, ErbB3 ed ErbB4, che nella loro forma attiva formano omodimeri od eterodimeri (Figura 10) (Markmann et al., 2010). Questo recettore è espresso in molti tessuti epiteliali ed overespresso in diversi tumori. Dal punto di vista strutturale questo recettore consta di una porzione extracellulare di interazione con il ligando, un dominio transmembrana ed una porzione citoplasmatica che contiene il dominio tirosin-chinasico (Burgess et al., 2003). Il legame extracellulare di specifici ligandi al recettore comporta l'attivazione di una cascata di eventi di trasduzione del segnale che mediano le risposte cellulari ai segnali di crescita cellulare, di differenziamento, di sopravvivenza, segnali coinvolti nell'angiogenesi e nella sensibilità ai farmaci. Sono stati identificati diversi ligandi di EGFR, tra cui EGF, TGF α e la neoregulina; il loro legame alla porzione extracellulare del recettore ne determina l'omo o etero-dimerizzazione e l'attivazione dei domini tirosin-chinasici citoplasmatici (Hubbard et al., 1998). L'attivazione di questi domini e la conseguente autofosforilazione di tirosine nella porzione citoplasmatica del recettore porta al reclutamento di proteine adattatrici con domini Src homology, (SH2 ed SH3), come Shc e GRB2 innescando una serie di eventi che portano all'attivazione di diversi *pathways*, tra cui la cascata di RAS-RAF-MAPKs ed il pathway PI3K/AKT (Figura 13). Mutazioni di questi pathway, come precedentemente descritto, portano ad un'alterazione della crescita cellulare e del processo apoptotico (Ciardiello et al., 2001).

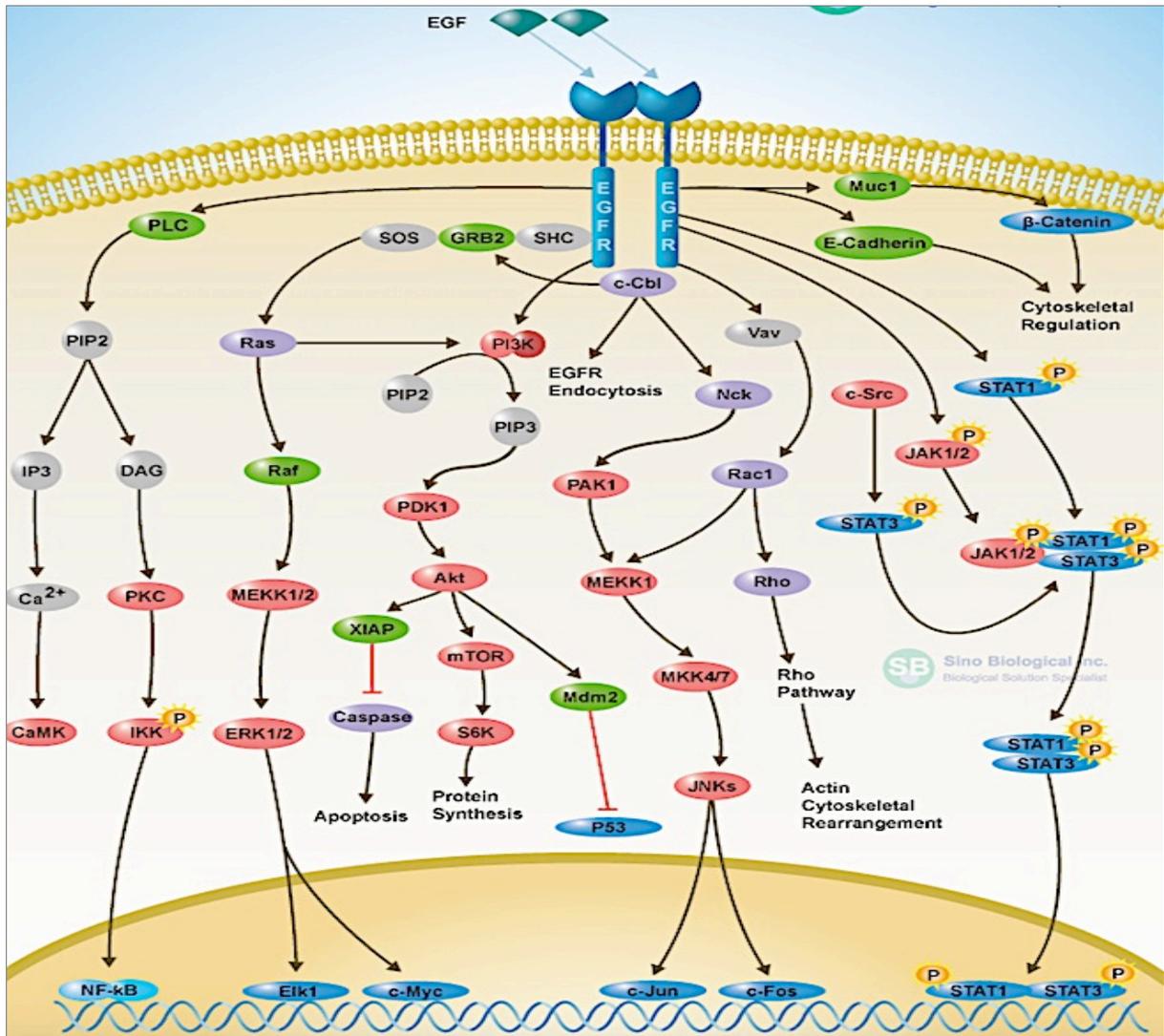


Figura 13. EGFR e pathway da esso regolati. (Sino Biological Inc., Biological solution specialist)

Recenti studi mostrano che AKT è capace di fosforilare MST2 (*Mammalian sterile twenty 2*) (reonina 117 e 384) favorendo la sua interazione con il fattore RAF-1, inibendo la formazione del complesso pro-apoptotico RASSF1A (*RAS association domain-containing protein 1 A*) - MST2 - LATS1 (*Large tumor suppressor homolog 1*). RAF-1 e AKT possono essere differenzialmente reclutati dalle diverse isoforme di RAS. N-RAS e K-RAS sono più efficienti nell'attivare il pathway PI3K-AKT, mentre H-RAS è un più potente attivatore di ERK, anche se in letteratura sono riportate delle eccezioni (Yan et al., 1998; Grewal et al., 2011). Quindi, il rilascio di MST2 da RAF-1 potrebbe essere attivato dalle isoforme di RAS che preferenzialmente attivano il pathway delle MAP chinasi, mentre la formazione del complesso anti-apoptotico RAF-1/MST2 potrebbe essere favorito dalle isoforme di RAS che attivano PI3K. Questo significa che MST2 potrebbe essere un punto di convergenza per la

segnalazione di RAS e regolare l'equilibrio tra la proliferazione e l'apoptosi fungendo da bersaglio comune per i pathway delle MAP chinasi e PI3K (Romano et al., 2010).

È stato dimostrato che l'espressione della forma mutata di K-RAS, può indurre la secrezione del fattore di crescita EGF che stimola in maniera autocrina il recettore EGFR. Il recettore EGFR fosforilato attiva di conseguenza la proteina K-RAS wt che attraverso il pathway di PI3K/AKT inibisce l'apoptosi favorendo la formazione dei complessi RAF-1-MST2 ed inibendo direttamente l'attività chinasi di MST2 per fosforilazione (Matallanas et al., 2011; Romano et al., 2013). Quindi, K-RAS mutato è capace di indurre un loop autocrino che antagonizza l'apoptosi e richiede la collaborazione di K-RAS *wild type* (wt). Pertanto, nel CRC, esiste una sinergia tra K-RAS mutato e K-RAS wt poiché la trasformazione tumorale indotta da K-RAS mutato richiede la presenza di un allele K-RAS wt (Figura 14).

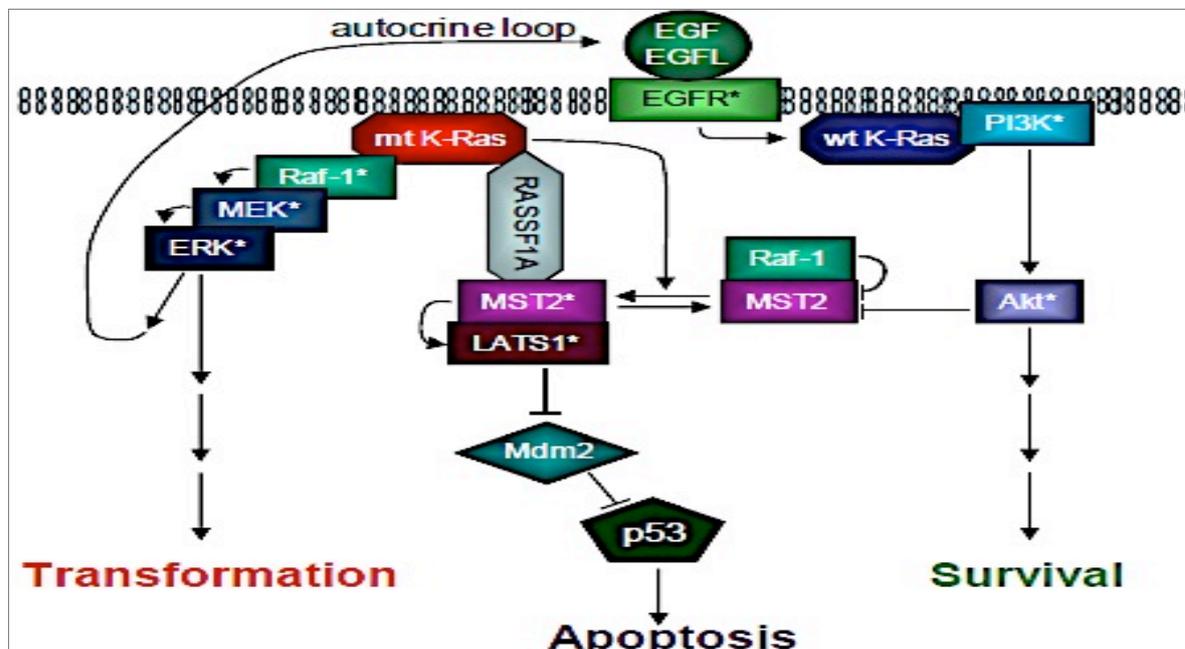


Figura 14. Modello del ruolo di K-RAS mutato e K-RAS *wild-type* nella trasformazione tumorale (Matallanas et al., 2011).

Nel CRC, come nella maggioranza dei tumori di origine epiteliale, il recettore EGFR è frequentemente iper-espresso o iper-attivato. Tale iperespressione è stata associata alla resistenza dei tumori ai farmaci dotati di attività citotossica, tanto da rendere l'EGFR un indicatore di prognosi sfavorevole (Normanno et al., 2001), ma anche una delle molecole bersaglio delle nuove terapie con farmaci basati su anticorpi monoclonali anti-EGFR.

2.8. TERAPIE ANTITUMORALI

Negli ultimi anni si sta sviluppando sempre di più la ricerca mirata alla scoperta di biomarkers specifici che possano essere utilizzati per la diagnosi precoce, per monitorare lo stadio di avanzamento del CRC o comunque per sviluppare una terapia più specifica e personalizzata dei pazienti affetti da CRC. La diagnosi precoce della malattia sembra essere un approccio realistico per ridurre la mortalità, grazie alla presenza di un precursore benigno della malattia (l'adenoma) curabile e che da molto spazio proprio per un intervento curativo. Negli ultimi anni in diversi paesi è stato sviluppato un programma di screening che comunque potrebbe essere implementato e sostenuto dalla scoperta di nuovi biomarkers specifici (Hoff et al., 2010). La prognosi ed il trattamento del CRC dipende in particolar modo dallo stadio della malattia stessa. Il CRC è classificato con un sistema tumorale a stadi (Sobin et al., 1987):

- pazienti con la malattia al I ed al II stadio di avanzamento senza coinvolgimento dei linfonodi vanno incontro a cure chirurgiche ma non a chemioterapia;
- pazienti con malattia al III stadio (linfonodi coinvolti) per i quali oltre alla chirurgia è raccomandata la chemioterapia (Van Cutsem et al., 2009);
- pazienti in cui la malattia ha colpito organi distanti (stadio IV).

Il tipo di trattamento del CRC dipende da diversi fattori, principalmente dalle dimensioni, dalla localizzazione e dall'estensione del tumore. Sono applicabili vari tipi di trattamento, dall'intervento chirurgico (consente l'asportazione della massa tumorale), alla radioterapia, immunoterapia o chemioterapia. Quest'ultima consiste nell'utilizzo di farmaci antitumorali per distruggere le cellule cancerose eviene impiegata oltre che per controllare la crescita neoplastica o alleviare i sintomi della malattia, anche dopo trattamento chirurgico al fine di eliminare eventuali cellule tumorali residue. Talvolta diventa necessario utilizzare combinazioni di trattamenti diversi. Attualmente, sono disponibili differenti agenti chemioterapici dotati di effetto citotossico, quali le fluoropirimidine (inibitori della timidilato sintasi), l'oxaliplatino (un analogo del platino che viene spesso associato alla terapia con fluoropirimidine), o l'*irinotecan* (un inibitore della topoisomerasi I).

È dimostrato comunque che il 20-30% dei pazienti allo stadio II della malattia presentano recidiva e solo il 15% dei pazienti allo stadio III riceve benefici dalla chemioterapia. Questo rende necessario l'incremento di biomarkers per ottimizzare le decisioni terapeutiche nei pazienti con la malattia agli stadi II e III (De Witt et al., 2013).

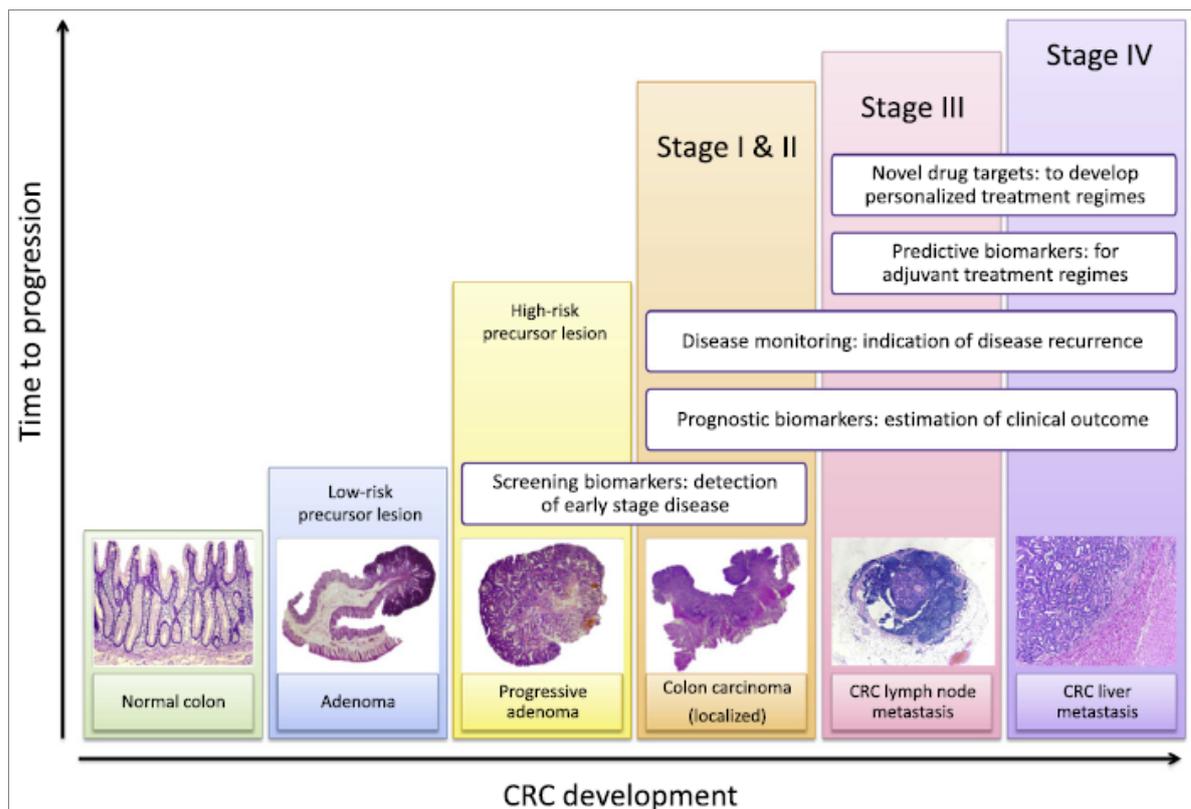


Figura 15. Rappresentazione schematica del bisogno di biomarkers nei vari stadi di sviluppo del tumore. In basso lungo l'asse-x i diversi stadi del tumore sono rappresentati da sezioni epiteliali colorate con ematossilina-eosina. Sull'asse-y è rappresentato l'intervallo di tempo raffigurato con delle barre colorate che rappresentano i differenti stadi di progressione del tumore, all'interno delle diverse barre sono indicati i livelli ai quali sono necessari nuovi biomarkers ed i motivi per i quali lo sono (De witt et al. 2013).

Inoltre, in pazienti in cui la malattia ha colpito organi distanti (stadio IV), in sede di diagnosi o nel corso di scelta della terapia durante gli altri stadi della malattia, la terapia farmacologica sta prendendo sempre più importanza negli ultimi anni. Non per tutti però va bene la stessa terapia farmacologica, così oggi si tende a cercare di validare dei metodi diagnostici volti a predire la risposta alle terapie. Ad esempio, pazienti affetti da CRC caratterizzato dall'aver K-RAS mutato sono, attualmente, esclusi da terapie con farmaci anti-EGFR (Van Custem et al., 2010). Lo stato mutazionale di K-RAS può in qualche modo predire la risposta a trattamenti con farmaci anti-EGFR, ma non sempre risulta essere una relazione diretta, in quanto le mutazioni di K-RAS possono comportarsi in maniera differente e non essere comunque l'unico fattore implicato nella possibile resistenza alla terapia. Per questo motivo la scoperta di nuovi biomarkers anche come target per nuovi farmaci risulta di notevole importanza.

Le nuove linee di ricerca farmacologica si sono rivolte all'identificazione di agenti in grado di interferire in maniera selettiva contro bersagli molecolari specifici al fine di ridurre gli effetti

collaterali sistemici. Questi nuovi farmaci vengono usati sia da soli che in associazione ad agenti chemioterapici classici. Tra i nuovi farmaci più utilizzati nel trattamento del CRC troviamo gli inibitori dell'EGFR. Sono state sviluppate diverse terapie basate su anticorpi monoclonali contro l'EGFR.

Tra le prime molecole utilizzate sui pazienti ci sono il *Panitumumab* ed il *Cetuximab*, utilizzato in questo studio.

2.8.1. IL CETUXIMAB

Il *Cetuximab* (IMC-C225, *Erbix* ImClone System Inc, New York, NY) è un anticorpo monoclonale IgG1 chimerico uomo/topo (Figura 16), che agisce in maniera specifica contro il dominio extracellulare dell'EGFR competendo con i naturali ligandi.

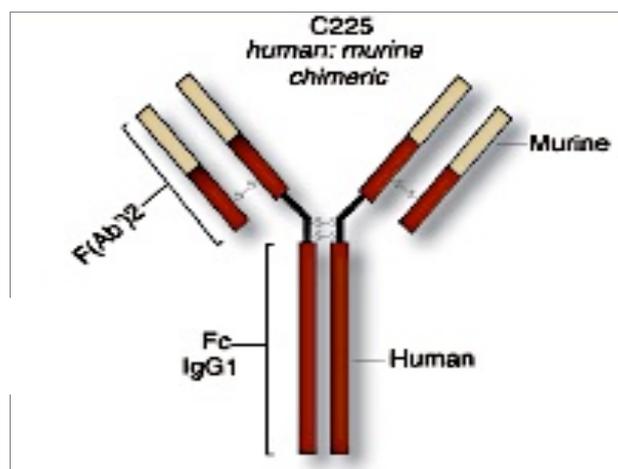


Figura 16. Struttura del Cetuximab.

Il legame del Cetuximab al recettore ne comporta l'internalizzazione causando una diretta inibizione della sua attività tirosin-chinasica (Figura 16). Ciò a sua volta provoca il blocco delle vie della trasduzione del segnale attivate da questo recettore, come quella della PI3K/AKT e di RAS-RAF/MAPKs, inducendo meccanismi proapoptotici ed inibendo la proliferazione cellulare, l'angiogenesi e la formazione di metastasi (Vincenzi et al., 2010). Si ritiene, inoltre, che il Cetuximab sia in grado sia di inibire l'attività riparatoria del DNA delle cellule tumorali nei confronti del danno causato dalla chemioterapia e dalla radioterapia che di impedire la formazione di nuovi vasi sanguigni all'interno dei tumori; ciò si traduce in una globale soppressione della crescita tumorale. L'efficacia anti-tumorale del Cetuximab è stata

dimostrata sia da solo che in combinazione con altri agenti chemioterapici, viene usato ad esempio in associazione con l’irinotecan (Saltz et al., 2001).

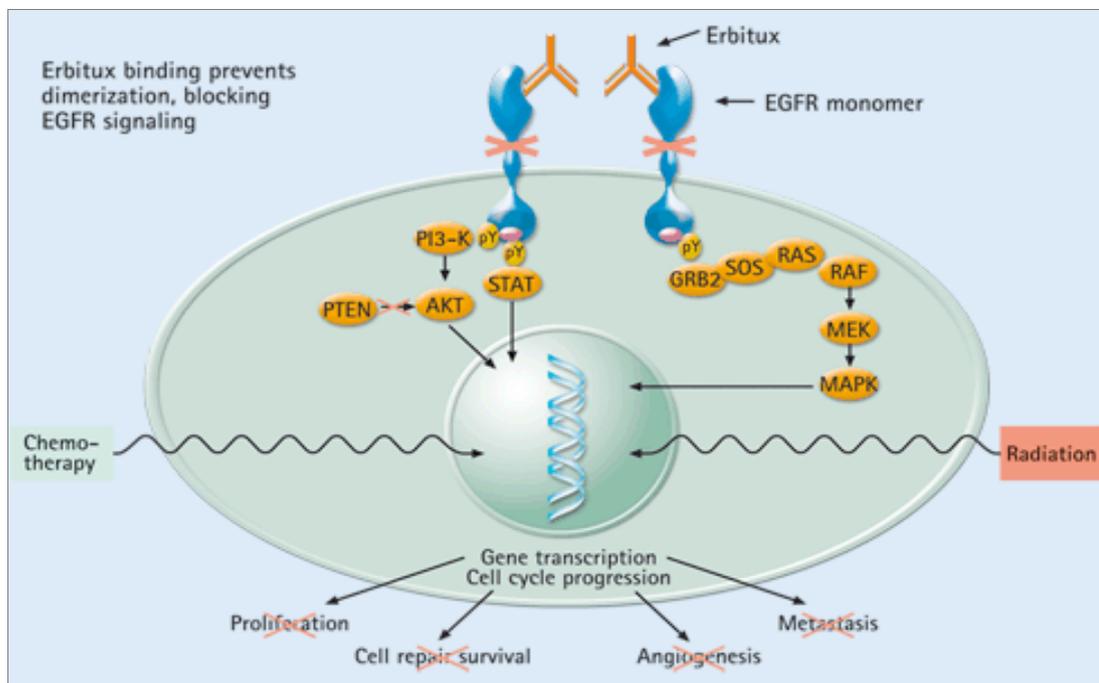


Figura 17. Rappresentazione della interazione tra Cetuximab (Erbix) ed EGFR.

E' noto che non tutti i pazienti affetti da CRC rispondono in modo positivo alla terapia con il Cetuximab (Camp et al., 2005), così oggi si tende a cercare di validare dei metodi diagnostici volti a predire la risposta alla terapie. Come precedentemente detto, pazienti affetti da CRC caratterizzato dall'aver K-RAS mutato sono esclusi da terapie con Cetuximab (Van Custem et al., 2010). Lo stato mutazionale di K-RAS permette cioè di predire la risposta a trattamenti con questo tipo di farmaci, ma non sempre risulta esserci una relazione diretta, in quanto le mutazioni di K-RAS possono comportarsi in maniera differente. Uno studio recente ha infatti messo in luce come cellule che hanno K-RAS con mutazione nel codone 13, in particolare la mutazione G13D, siano sensibili al trattamento con Cetuximab (Yokota, 2012).

Questo studio, seppure da approfondire, supporta l'ipotesi secondo cui pazienti con CRC che hanno mutazioni in K-RAS rappresentano una popolazione eterogenea che risponde in maniera diversa ai trattamenti.

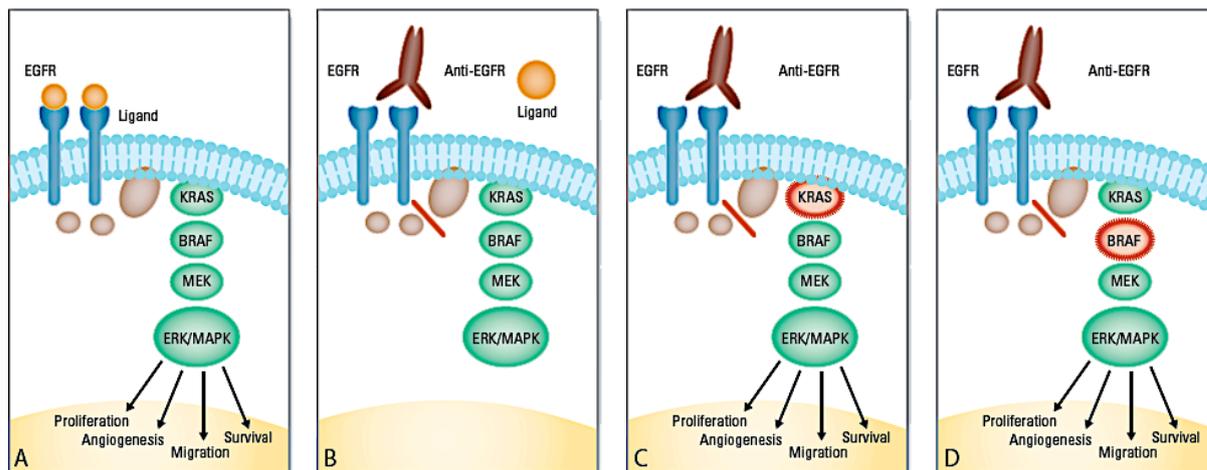


Figura 18. Schematizzazione dell'azione del farmaco anti-EGFR (mAb). **A)** Schematizzazione della normale attività del recettore EGFR in seguito ad interazione con il proprio ligando. **B)** Azione del mAb anti-EGFR quando gli effettori di EGFR non sono mutati. **C)** e **D)** Azione del mAb anti-EGFR quando gli effettori di EGFR, rispettivamente K-RAS e BRAF, sono mutati. Si vede in B) che quando gli effettori di EGFR sono wild type le vie da essi attivate risultano bloccate in seguito all'azione di molecole anti-EGFR (mAb); al contrario in C) e D) si evidenzia l'incapacità del mAb anti-EGFR di bloccare le vie attivate dal recettore quando uno degli effettori è mutato.

Oltre a K-RAS, altri fattori coinvolti nella risposta alla terapia anti-EGFR sono lo stato mutazionale di BRAF, di PIK3CA e di PTEN, oltre che la distribuzione di EGFR sulla membrana plasmatica, ma la loro efficacia predittiva nella risposta alla terapia non è del tutto chiara. Mutazioni a livello di BRAF, in particolare la mutazione nella valina in posizione 600 (BRAFFV600E), ricorrono nel 7% dei tumori umani, di cui il 20% sono rappresentati da CRC (Davies et al., 2002). BRAF fa parte di una famiglia di proteine chinasi che vengono attivate in risposta a segnali mitogenici attraverso la via di segnalazione attivata da RAS. La mutazione V600 porta ad un'attivazione costitutiva di BRAF con conseguente fosforilazione di MEK ed ERK e ad un'attivazione continua del pathway delle MAPK in maniera RAS-indipendente (Wan et al., 2004). Nel CRC la mutazione di BRAF è associata con un decorso clinico negativo, infatti pazienti con tale mutazione riportano metastasi ed una mortalità superiore al 70% se paragonati a pazienti con CRC caratterizzati da BRAF wild type (Hutchins et al., 2011)

Come accennato nel paragrafo 2.4, nel CRC la deregolazione del pathway della PI3K può essere conseguenza di una mutazione del gene PIK3CA che codifica per la subunità p110 α catalitica della PI3K, o dell'inattivazione dell'inibitore, PTEN. PTEN agisce come tumor-suppressor defosforilando il PIP₃ generato dalla PI3K; la sua perdita provoca quindi un aumento della concentrazione del PIP₃ e, come conseguenza, un'attivazione continua del pathway della PI3K. I meccanismi che portano all'inattivazione di PTEN sono eterogenei, tra

questi, delezioni, mutazioni inattivanti, ipermetilazione del promotore. Negli ultimi anni è stata dimostrata nei tumori una correlazione tra alterazione di PTEN e resistenza ai trattamenti con farmaci anti-EGFR; sembra, infatti, che sia necessaria la presenza di questa proteina per un'efficace risposta ai farmaci (Kim et al., 2010). Dati contrastanti però non permettono ancora oggi di trovare una correlazione tra la mutazione di PIK3CA e la risposta a terapia con anti-EGFR. In particolare, in alcuni pazienti trattati con Cetuximab la mancata risposta al trattamento è stata associata con la presenza di una mutazione attivante, poco comune, di PIK3CA, nell'esone 9, specialmente in tumori con K-RAS non mutato (Sartore-Bianchi et al., 2009). Studi sempre più numerosi evidenziano che mutazioni di PIK3CA, o la perdita di PTEN, possono coesistere con mutazioni di K-RAS o di BRAF e questo porta ad ipotizzare un loro possibile ruolo come marcatori predittivi per terapie anti-EGFR sia singolarmente che in relazione allo stato di mutazione di K-RAS. Il ruolo di BRAF come possibile marcatore predittivo per la terapia anti-EGFR risulta ancora controverso (Yokota et al., 2012).

Nell'efficacia di terapie anti-EGFR risulta avere un ruolo importante anche la distribuzione del recettore EGFR. È noto, infatti, che l'EGFR può traslocare al nucleo (Giri et al., 2005) dove può fungere da co-attivatore della trascrizione, mediando così la trascrizione di geni come il gene della ciclina D1, del fattore iNOS, di B-Myb e della Chinasi Aurora A (Lin et al., 2006). A livello nucleare, l'EGFR può svolgere anche un'altra funzione, attivando per fosforilazione il fattore PCNA e stabilizzandone così il legame alla cromatina, causa di una più attiva proliferazione cellulare (Wang et al., 2006). Sembra quindi che una localizzazione nucleare dell'EGFR possa essere legata ad una resistenza a terapie anti-EGFR (Figura 19).

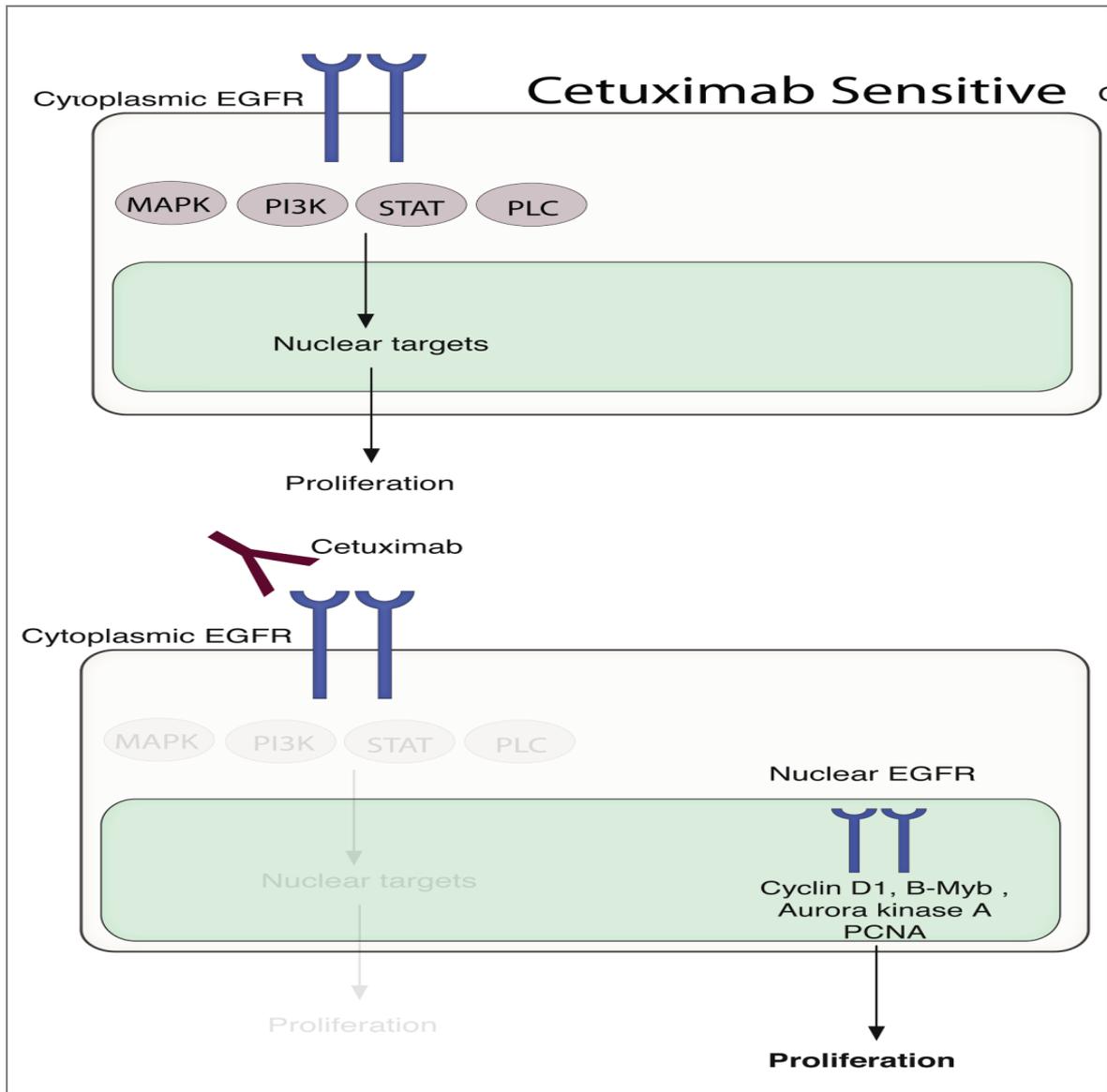


Figura 19. Possibile meccanismo di resistenza a terapia con molecole anti-EGFR causata dalla diversa localizzazione del recettore EGFR.

4. SCOPO DEL PROGETTO

I pazienti con CRC metastatico che hanno K-RAS mutato nel codone 12 o 13 sono attualmente esclusi dal trattamento con l'anticorpo monoclonale Cetuximab perché considerati refrattari alla terapia (Wicki et al., 2010). Tuttavia, *in vitro* e *in vivo* in modelli murini, hanno dimostrato che solo le cellule che portano la mutazione nel codone 12 sono insensibili all'anticorpo anti-EGFR (Karapetis et al., 2008). Studi clinici recenti retrospettivi su pazienti con CRC metastatico, con mutazione in posizione 13 di K-RAS, che hanno ricevuto il trattamento con Cetuximab, hanno mostrato infatti un aumento della sopravvivenza. Quindi, la mutazione nel codone 13 di K-RAS può essere considerata un biomarker predittivo della risposta all'anticorpo (De Roock et al., 2010).

Questo progetto si prefigge, quindi, di comprendere meglio i meccanismi molecolari implicati nella risposta positiva o negativa a terapie con anticorpi anti-EGFR nel cancro al colon, al fine di poter evidenziare nuovi markers biomolecolari utilizzabili in terapie personalizzate in pazienti con tumori coloretali caratterizzati da diverso pattern mutazionale. A questo scopo in questo studio sono state utilizzate cellule di adenocarcinoma coloretale HT-29.

La linea cellulare HT-29 è stata isolata nel 1964 da una donna caucasica di 44 anni con un adenocarcinoma al colon differenziato di II grado. L'indagine citogenetica con la tecnica del G-banding ha evidenziato in queste cellule un cariotipo con un numero modale di 71-72 cromosomi che denuncia un'ipertriploidia (Figura 20), e sono state identificate diverse aberrazioni cromosomiche riportate in Tabella 1.

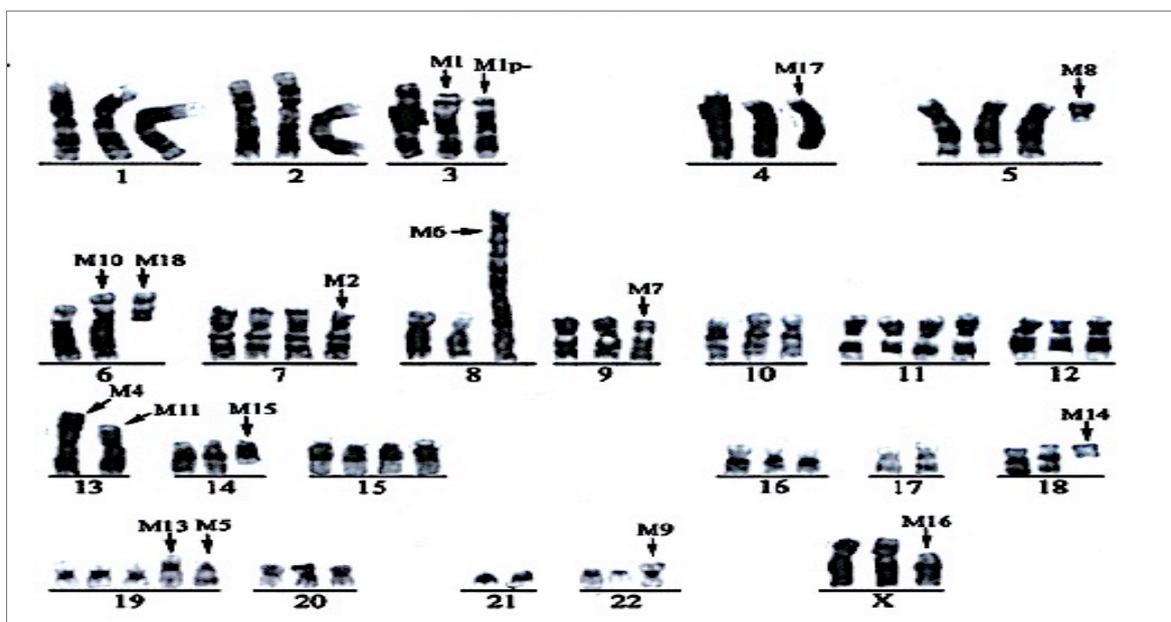


Figura 20. Cariotipo G-banding di una metafase rappresentativa della linea cellulare tumorale del colon HT-29 (Kawai et al., 2002).

Normal chromosomes			Marker chromosomes			
Chromosome	Copies	% of cells	Marker	Copies	% of cells	Marker identification
1	3	100%	1	1	90%	del(3)(p14)
2	3	95%	1p-	1	80%	der(3)del(3)(p14?)del(3)(p25?)
3	1	85%	2	1	100%	del(7)(p15)
4	2	95%	3			Not present in our sample
5	3	75%	4	1	100%	i(13)(q10)
6	1	95%	5	1	100%	der(19)t(17;19)(17q12 or q21;q13)
7	3	90%	6	1	100%	der(8;8)(q?;q?)
8	2	90%	7	1	100%	der(9)
9	2	90%	8	1	60%	del(5)(q11)
10	3	95%	9	1	75%	ider(22)(p10)ins(22;22)(p11;?)
11	4	95%	10	1	100%	der(6)t(6;14)(q23;q13)
12	3	85%	11	1	100%	der(13;13)(q10;q10)del(13)(q14?)
13	1/0	50/50%	12			Not present in our sample
14	1	75%	13	1 or 2	85%	add(19)(q13).ish(wcp19+)
15	4	70%	14	1 or 2	90%	i(18)(p10)
16	3	95%	15	1	80%	der(14)t(6;14)(q23;q13)
17	2	95%	16	1 or 2	100%	del(X)(p11)
18	2/1	65/30%	17	1 or 2	95%	del(4)(q31)
19	2	85%	18	1	100%	del(6)(q12)
20	4/3/2	50/25/25%				
21	2	85%				
22	2	85%				
X	2	80%				

Tabella 1. Riarrangiamenti cromosomici evidenziati mediante l’analisi G-banding, SKY, FISH in cellule HT-29 (Kawai et al., 2002). **p**= braccio corto; **q**= braccio lungo; **;** si usa nei riarrangiamenti strutturali per separare cromosomi o regioni; **()** = si includono tra le parentesi i cromosomi con alterazioni strutturali e i punti di rottura; **?**= indica un cromosoma, o un suo segmento, non identificato con certezza; **add**= materiale aggiuntivo che si attacca all’estremità p o q di un cromosoma e ne aumenta la lunghezza; **der**= cromosoma derivato da un riarrangiamento; **del**= delezione; **i**= isocromosoma; **or**= indica interpretazione alternativa; **ider**= isoderivato, indica un isocromosoma per uno dei bracci di un cromosoma derivato; **ins**= inserzione; **t**= traslocazione. Simboli in uso nelle ibridazioni *in situ*:= separa le osservazioni citogenetiche dai risultati dell’ibridazione *in situ*; += presente su uno specifico cromosoma; **ish**= ibridazione *in situ*; **wcp**= *whole chromosome paint*

Le cellule HT-29 presentano il gene $p16^{INK4a}$ con il promotore metilato (Gayet et al., 2001) ed il suo gene presenta delle alterazioni a livello dei primi due esoni (come dimostrato da precedenti studi condotti nel nostro laboratorio). Inoltre, esse presentano un allele di $p53$ deleto ed uno mutato all’interno del dominio di legame al DNA in posizione 273 in cui un’arginina è sostituita da un residuo di istidina (mutazione Arg273His) (Gayet et al., 2001). La mutazione Arg273His riduce l’affinità di legame al DNA e quindi, l’attività trascrizionale di $p53$ rispetto alla proteina *wild type* (Mallawaaratchy et al., 2012). Altre mutazioni sono a carico di APC, SMAD4, B-RAF e PI3K (Mallawaaratchy et al., 2012). La mutazione a carico del nucleotide 600 nel gene *b-raf* sostituisce l’amminoacido valina con l’acido glutammico (V600E) e porta ad una costitutiva attivazione del pathway delle MAPK (Mallawaaratchy et al., 2012; McCubrey et al., 2006; Davies et al., 2002). L’alterazione in PI3K è la mutazione nel gene *pik3ca* (esone 7) che codifica per la subunità catalitica $p110\alpha$. La mutazione cade a

livello del dominio C2 che permette alla PI3K di legare i lipidi di membrana (Samuels et al., 2004) e sembra iperattivare la proteina (Oda et al., 2008; Mallawaarachy et al., 2012). In letteratura è riportato che le cellule HT-29, nonostante la mutazione PIK3CA, sono sensibili all'inibizione da parte di inibitori come LY294002 (Mallawaarachy et al., 2012).

Le cellule HT-29 non hanno mutazioni a livello di K-RAS e H-RAS (Gayet et al., 2001), pertanto nel nostro sistema sperimentale tali cellule sono state stabilmente trasfettate con i cDNA codificanti per isoforme mutate di RAS (K-RASG12V nel clone K12 e K-RASG13D nel clone K13) poste sotto il controllo di un promotore inducibile dall'ormone Mifepristone [GeneSwitchTM System (Invitrogen)].

Ci si è proposto quindi di analizzare gli effetti del Cetuximab in cellule HT-29 e sui due cloni K12 e K13, per valutare come cellule con mutazioni differenti rispondano a trattamenti con questo farmaco e per meglio comprendere i differenti effetti molecolari che le diverse isoforme oncogeniche di RAS inducono *in vitro*. Questo studio potrebbe consentire di individuare, per singoli pazienti, terapie più mirate e più adeguate al loro background genetico.

5. RISULTATI
E
DISCUSSIONE

5.1. ANALISI DEGLI EFFETTI DEL CETUXIMAB IN DIVERSE LINEE CELLULARI DI ADENOCARCINOMA COLORETTALE

In questo studio sono state utilizzate linee cellulari di adenocarcinoma coloretale, caratterizzate da un diverso spettro mutazionale a livello del pathway di RAS, al fine di valutare come mutazioni diverse a livello di questo pathway possano influenzare la risposta delle cellule al trattamento con il farmaco chemioterapico Cetuximab. In particolare ho utilizzato le linee:

- **CaCo2**: cellule di adenocarcinoma coloretale in cui non sono presenti mutazioni a livello del pathway K-RAS. Questa linea cellulare, secondo dati in letteratura, risulta sensibile a questo tipo di trattamento.
- **HT-29**: cellule in cui K-RAS è wt ma è presente la mutazione V600E nel suo effettore BRAF. Questa linea cellulare è stata utilizzata per valutare se fattori coinvolti nel pathway di K-RAS influenzino la risposta delle cellule al trattamento con il Cetuximab.
- **K12**: clone derivato dalla linea cellulare HT-29 trasfettata con il cDNA codificante per una isoforma mutata di RAS, K-RASG12V, posta sotto il controllo di un promotore inducibile dall'ormone Mifepristone [GeneSwitchTM System (Invitrogen)].
- **K13**: clone derivato dalla linea cellulare HT-29 trasfettata con il cDNA codificante per una diversa isoforma mutata di RAS, K-RASG13D, posta sotto il controllo di un promotore inducibile dall'ormone Mifepristone [GeneSwitchTM System (Invitrogen)]. Queste ultime due popolazioni cellulari sono state utilizzate per valutare se e come mutazioni differenti in K-RAS possano influenzare la risposta al trattamento con il farmaco.

5.1.1. Curve di crescita e saggi di vitalità delle cellule CaCo2

Inizialmente ho eseguito dei saggi di proliferazione e di vitalità, con Trypan Blue, sulla linea cellulare CaCo2 la quale, secondo dati in letteratura, risulta sensibile a questo tipo di trattamento. Questi saggi sono stati utilizzati per valutare la concentrazione di Cetuximab alla quale le cellule risultano essere sensibili. Le cellule sono state piastrate in piastre multiwell da sei pozzetti alla concentrazione di 1×10^5 cellule/pozzetto, il giorno seguente alcune aliquote sono state contate (tempo 0) e le altre sono state tenute in coltura come controllo o trattate con Cetuximab alla concentrazione di 20 μ g/ml o 50 μ g/ml. Aliquote di cellule controllo e trattate, raccolte dopo 24, 48 o 72 ore, sono state processate seguendo il protocollo per il saggio di proliferazione e vitalità descritto in Materiali e Metodi. In Figura 21 sono riportati le curve e gli istogrammi ottenuti dalla media di due esperimenti condotti con ognuna delle concentrazioni di Cetuximab, in maniera indipendente, ciascuno in triplicato. Le curve di crescita sono state ottenute contando le cellule adese totali, sia vive (bianche) che morte (blu), mentre gli istogrammi relativi alla vitalità cellulare riportano la percentuale di cellule vive sul totale di cellule contate. Non sono incluse, in queste analisi, le cellule staccatesi dalle piastre e passate in sospensione.

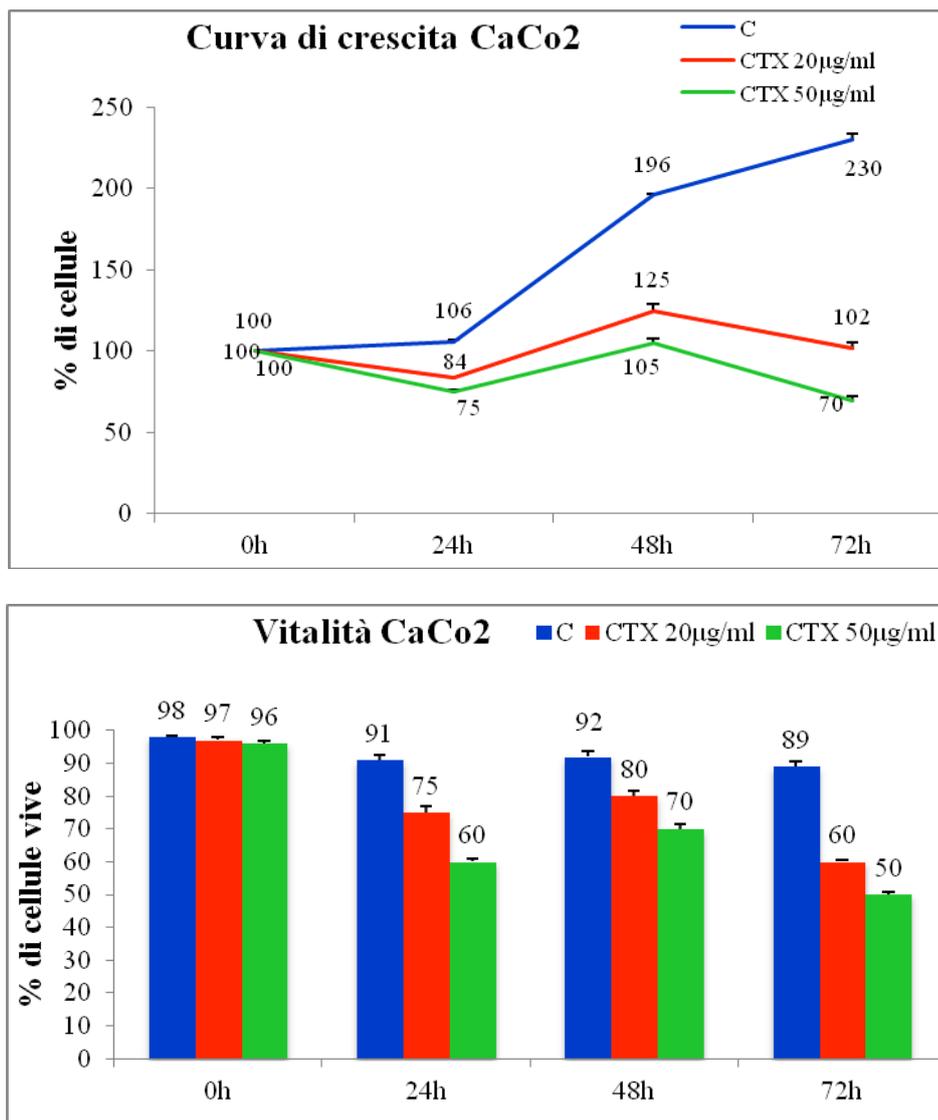


Figura 21. Curve di crescita delle cellule CaCo2 controllo (C) e trattate con Cetuximab (CTX 20µg/ml e CTX 50µg/ml). Le curve in alto riportano per ciascun campione, la media delle percentuali di cellule rispetto a quelle contate al tempo zero e poste pari a 100. Le curve sono state costruite riportando i valori medi ottenuti dai due esperimenti, condotti in triplicato ed in maniera indipendente. Gli istogrammi, in basso, riportano invece la percentuale di cellule adese vive rispetto alle cellule adese totali. Gli istogrammi sono stati ottenuti riportando i valori medi ottenuti dai due esperimenti, condotti in triplicato ed in maniera indipendente. Tutti i dati sono stati elaborati con il programma Microsoft Office Excel (2007).

Dall'analisi di queste curve si conferma come questa linea cellulare risulta sensibile al farmaco ad entrambe le concentrazioni utilizzate, subendo un maggiore effetto alle 72 ore con la concentrazione di 50µg/ml. Per questo motivo, i successivi esperimenti con le altre linee cellulari, sono stati condotti utilizzando il Cetuximab a quest'ultima concentrazione.

5.1.2. Curve di crescita e saggi di vitalità delle cellule HT-29

Una volta stabilita la concentrazione di Cetuximab da utilizzare, ho eseguito analoghi saggi di proliferazione e vitalità cellulare sulla linea cellulare HT-29 dopo trattamento con il farmaco. Anche in questo caso aliquote di cellule controllo (C) e trattate con Cetuximab (CTX) sono state processate seguendo il protocollo per il saggio di proliferazione e vitalità descritto in Materiali e Metodi. In Figura 22A sono riportati le curve e gli istogrammi ottenuti dalla media di quattro esperimenti condotti in maniera indipendente, ciascuno in triplicato. Come nel caso precedente non sono incluse in queste analisi le cellule staccatesi dal substrato e passate in sospensione.

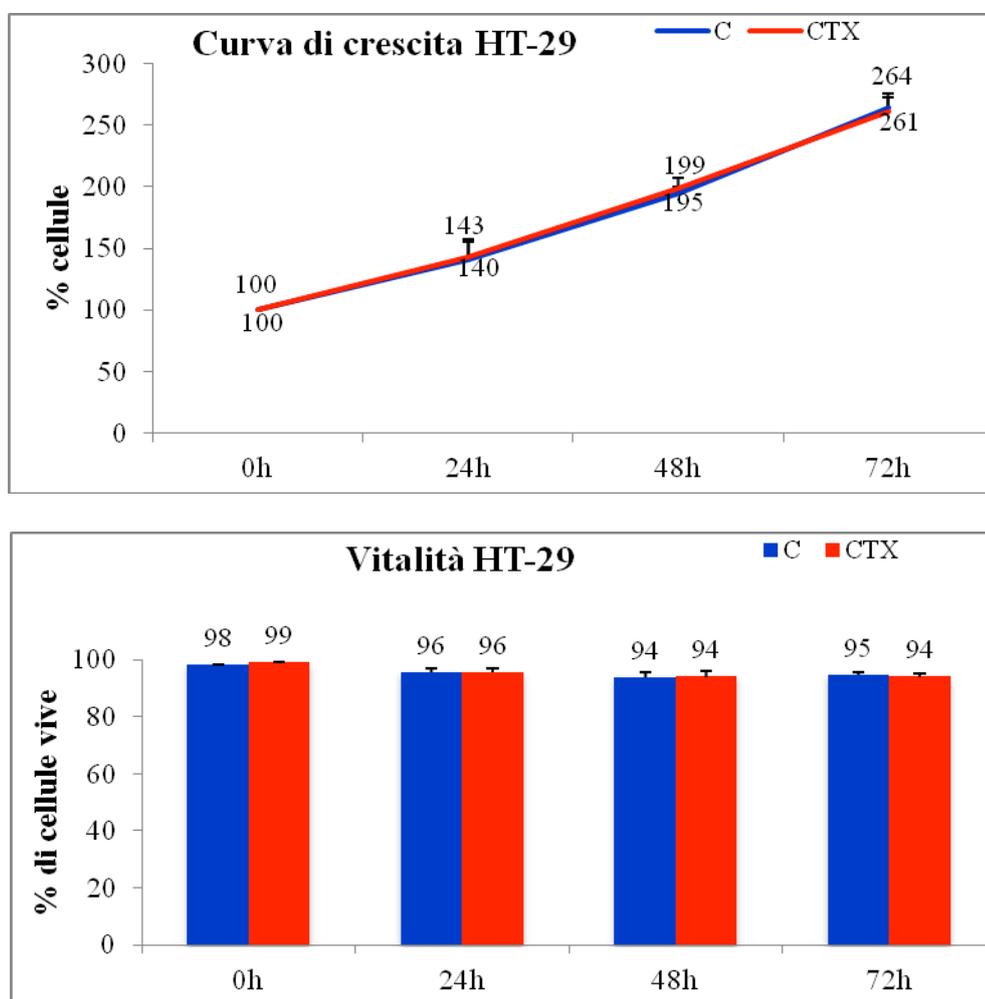


Figura 22A. Curve di crescita e Saggio di vitalità delle cellule HT-29 controllo (C) e trattate con Cetuximab 50 μ g/ml (CTX). Le curve in alto riportano per ciascun campione la media delle percentuali di cellule rispetto a quelle contate al tempo zero e poste pari a 100. Le curve sono state costruite riportando i valori medi ottenuti dai quattro esperimenti, condotti in triplicato ed in maniera indipendente. Gli istogrammi, in basso, riportano la percentuale di cellule adese vive rispetto alle cellule adese totali. Gli istogrammi sono stati ottenuti riportando i valori medi ottenuti dai quattro esperimenti, condotti in triplicato ed in maniera indipendente. Tutti i dati sono stati elaborati con il programma Microsoft Office Excel (2007).

L’analisi delle curve di crescita mostra come il Cetuximab non sembra avere effetto né sulla proliferazione di queste cellule né sulla loro vitalità.

Dati in letteratura dimostrano come il recettore EGFR possa traslocare al nucleo e fungere da co-attivatore della trascrizione, conferendo resistenza alle cellule trattate con farmaci anti-EGFR. Ho quindi condotto saggi di immunofluorescenza che indicano che il trattamento, per 24 ore con Cetuximab non influenza in queste cellule la localizzazione di EGFR (Figura 22B).

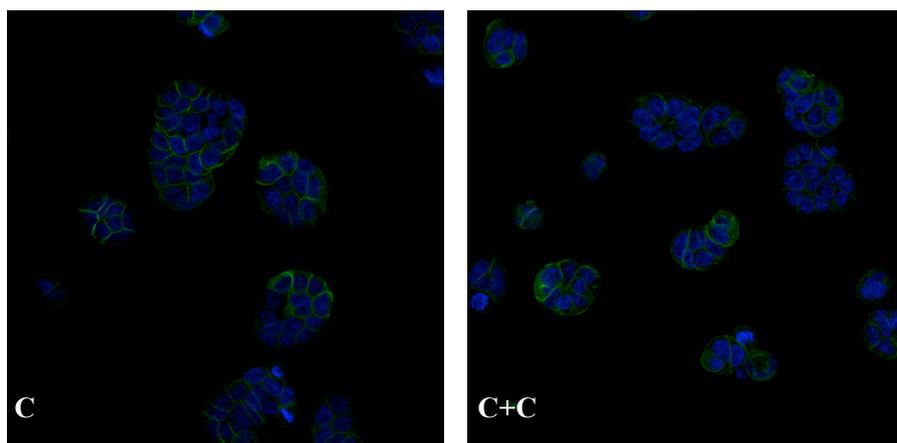


Figura 22B. Immagini ottenute al microscopio a fluorescenza relative alle cellule HT-29. In blu i nuclei marcati con HOECHST 3342 ed in verde il recettore EGFR marcato con anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con fluoresceina.

Questi primi risultati potrebbero indicare che mutazioni in uno dei fattori, come BRAF, coinvolti nel pathway di K-RAS possono determinare la resistenza delle cellule al trattamento con Cetuximab.

5.1.3. Curve di crescita e saggi di vitalità delle cellule K12 e K13

Le cellule K12 e K13 sono state piastrate in piastre multiwell da sei pozzetti alla concentrazione di 2×10^5 cellule/pozzetto e, il giorno seguente, alcune aliquote sono state contate (tempo 0), altre sono state trattate prima con l'ormone Mifepristone (10^{-8} M) così da attivare l'espressione dell'isoforma mutata di K-RAS e tre ore dopo con Cetuximab alla concentrazione di 50 μ g/ml. Allo stesso modo sono state preparate cellule non sottoposte al trattamento con l'ormone che sono state utilizzate come controllo. Per entrambi i cloni sono stati, quindi, preparati i campioni controllo (C), controllo+Cetuximab (C+CTX), indotti (M), indotti+Cetuximab (M+CTX), trattati per 24, 48 e 72 ore. Le aliquote di cellule, raccolte dopo il trattamento sono state processate seguendo il protocollo come nei casi precedenti. Nelle Figure 23A e 23B sono riportati le curve e gli istogrammi ottenuti dalla media di quattro esperimenti condotti in maniera indipendente, ciascuno in triplicato, rispettivamente sulle cellule K12 e K13.

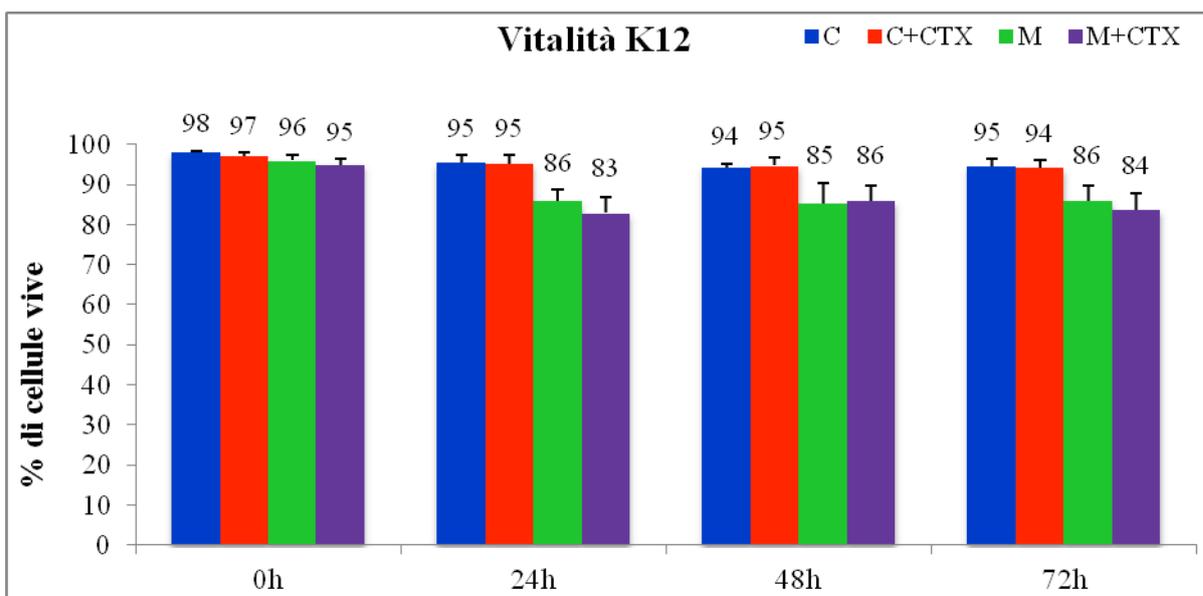
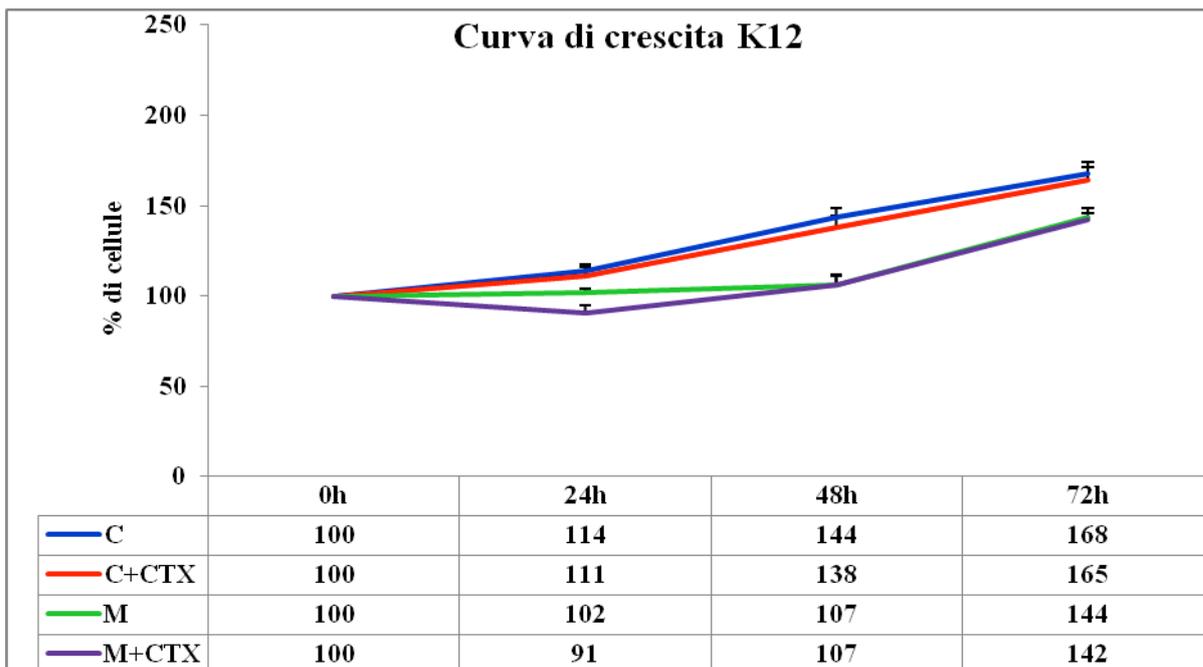


Figura 23A. Curve di crescita e Saggio di vitalità delle cellule K12 controllo (C), trattate con Cetuximab (C+CTX), K12 indotte ad esprimere l'isoforma mutata di K-RAS mediante aggiunta di Mifepristone (M), indotte e trattate con Cetuximab (M+CTX). Le curve, in alto, riportano la media delle percentuali di cellule rispetto a quelle contate al tempo zero, e poste pari a 100. Le curve sono state costruite riportando i valori medi ottenuti dai quattro esperimenti, condotti in triplicato ed in maniera indipendente. Gli istogrammi, in basso, riportano la percentuale di cellule adese vive rispetto alle cellule adese totali. Gli istogrammi sono stati ottenuti riportando i valori medi ottenuti dai quattro esperimenti, condotti in triplicato ed in maniera indipendente. Tutti i dati sono stati elaborati con il programma Microsoft Office Excel (2007).

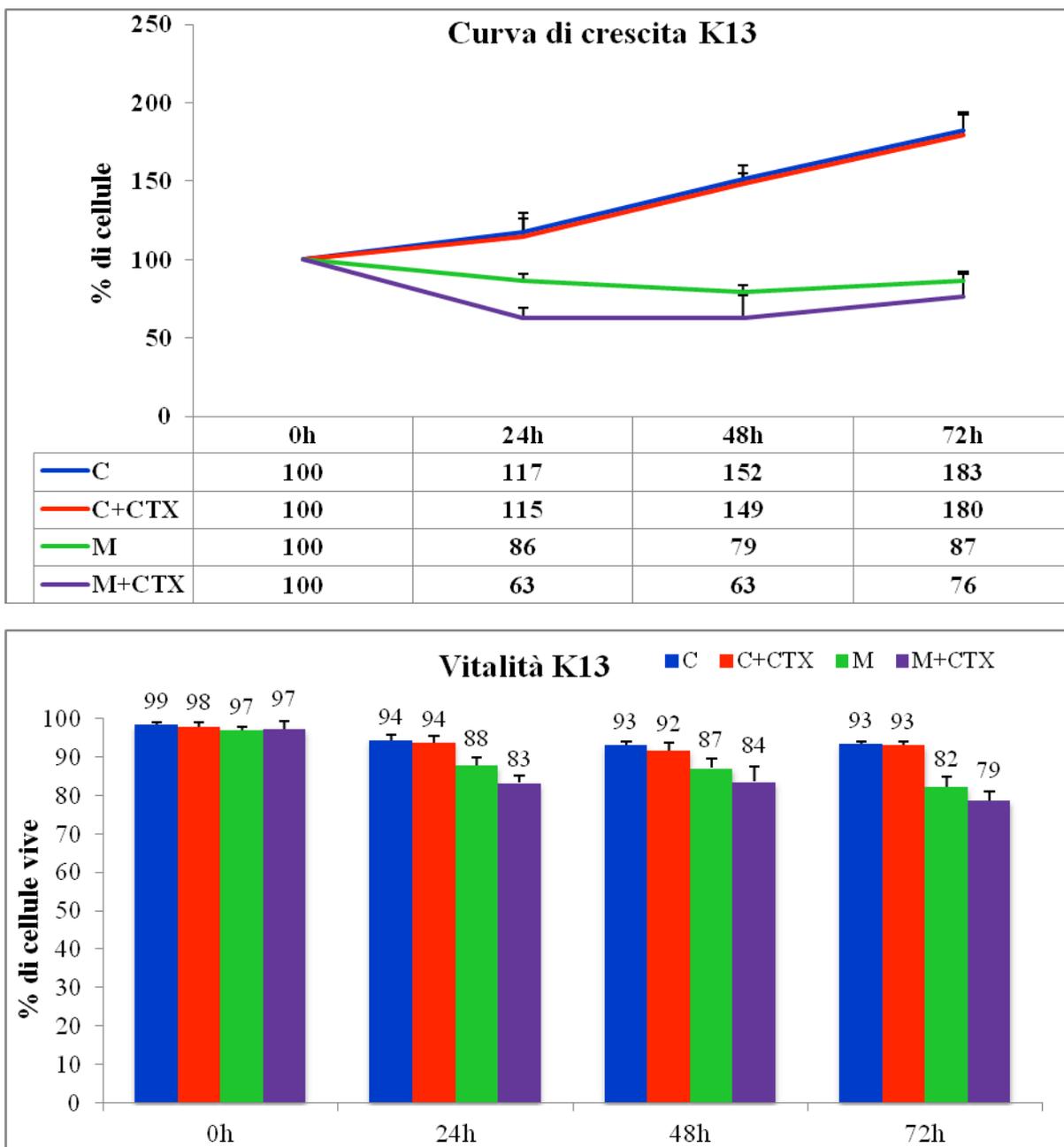


Figura 23B. Curve di crescita delle cellule K13 controllo (C), trattate con Cetuximab (C+CTX), K13 indotte ad esprimere l'isoforma mutata di K-RAS mediante aggiunta di Mifepristone (M), indotte e trattate con Cetuximab (M+CTX). Le curve, in alto, riportano la media delle percentuali di cellule rispetto a quelle contate al tempo zero, e poste pari a 100. Le curve sono state costruite riportando i valori medi ottenuti dai quattro esperimenti, condotti in triplicato ed in maniera indipendente. Gli istogrammi, in basso, riportano la percentuale di cellule adese vive rispetto alle cellule adese totali. Gli istogrammi sono stati ottenuti riportando i valori medi ottenuti dai quattro esperimenti, condotti in triplicato ed in maniera indipendente. Tutti i dati sono stati elaborati con il programma Microsoft Office Excel (2007).

Nel saggio di proliferazione analizzando la curva relativa alle cellule K12 (Figura 23A) si osserva che l'induzione dell'espressione di K-RASG12V provoca già un rallentamento del tasso di proliferazione rispetto alle cellule C a 24, 48 e 72 ore. Il trattamento con Cetuximab non sembra invece avere alcun effetto sulla proliferazione delle cellule K12 C, ma sembra

avere un leggero effetto sulle cellule K12 M già a 24 ore.

Il test di vitalità mostra che la percentuale di cellule morte resta invariata fra le 24, 48 e 72 ore per le cellule K12 C e K12 C+CTX confermando che il farmaco non ha effetto su queste cellule. Allo stesso modo la percentuale di cellule morte resta invariata fra le 24 e 48 ore per le cellule indotte (M) e indotte e trattate (M+CTX).

Al contrario l'espressione di K-RASG13D provoca, come già osservato in studi condotti in precedenza nel nostro laboratorio, un blocco della proliferazione e morte cellulare nelle prime 48 ore. Il trattamento con Cetuximab delle cellule indotte ha un chiaro effetto citotossico.

Il test di vitalità mostra un aumento progressivo della mortalità cellulare delle cellule M ed un aumento maggiore in cellule M+CTX.

I saggi di immunofluorescenza condotti sulle cellule K12 e K13 indicano che il trattamento, per 24 ore, con Cetuximab non influenza la localizzazione di EGFR, ma si evidenzia come l'induzione della isoforma mutata di K-RASG12D provochi una riduzione dei livelli di recettore (Figura 24).

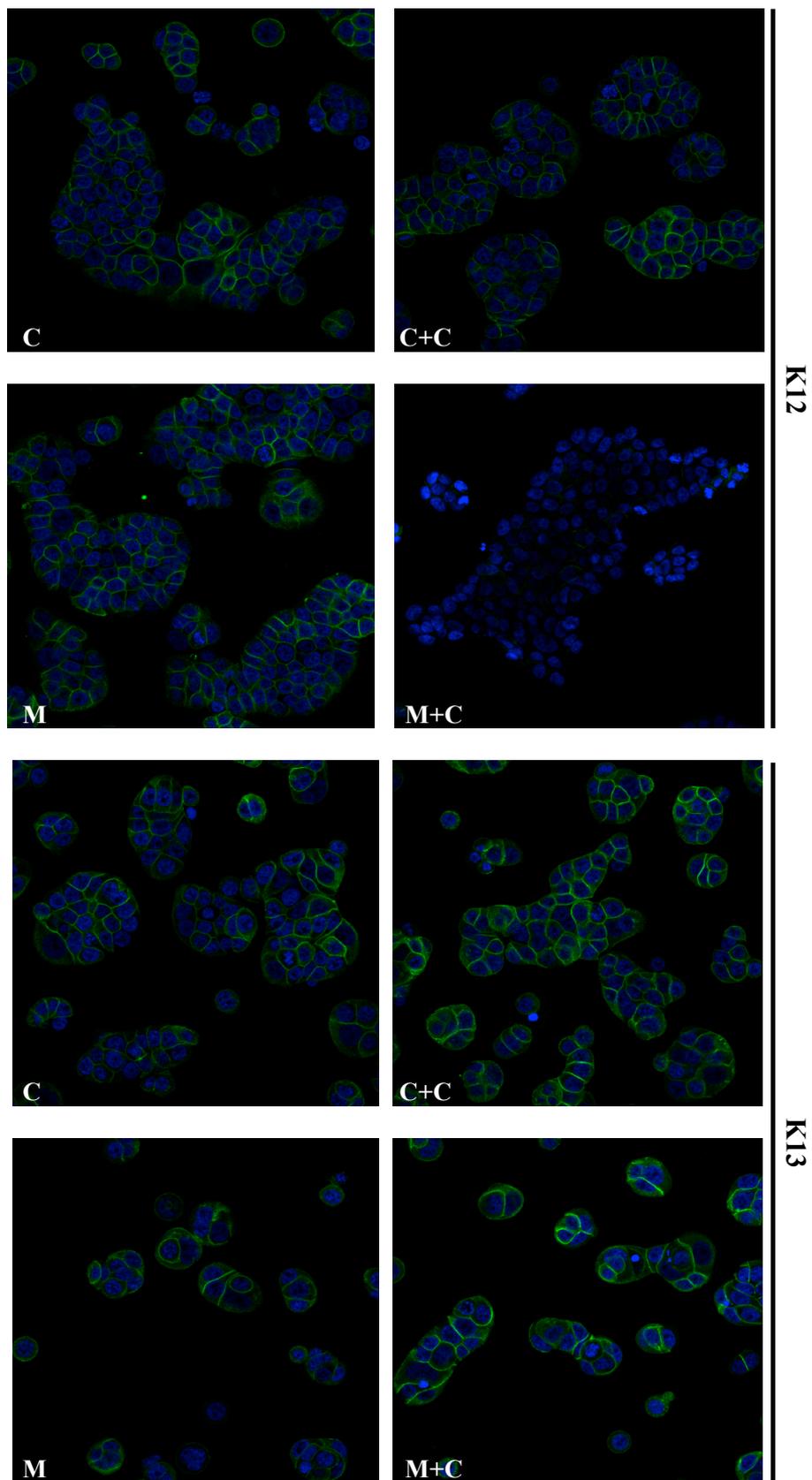


Figura 24. Immagini di microscopia a fluorescenza relative alle cellule K12 e K13 controllo (C) e trattate con Cetuximab (C+CTX), e cellule indotte (M) e indotte e trattate con Cetuximab (M+CTX). In blu i nuclei marcati con HOECHST 3342 ed in verde il recettore EGFR marcato con anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con fluoresceina.

Da questi primi dati risulta quindi evidente una differente risposta delle cellule K12 e K13 in seguito ad induzione di K-RAS mutato e trattamento con Cetuximab.

Le cellule K12 indotte ad esprimere l'isoforma K-RASG12V non risentono dell'effetto del Cetuximab in termini di proliferazione o di vitalità cellulare se non un lieve blocco della proliferazione alle 24 ore di trattamento. Queste cellule sembrano comunque risentire di un effetto da parte del Cetuximab che sembra ridurre i livelli del recettore EGFR (Figura 24, pannello M+C). Le cellule K13 indotte ad esprimere l'isoforma K-RASG13D invece sembrano risentire dell'effetto del farmaco mostrando una ridotta proliferazione per tutto l'intervallo di trattamento.

5.2. ANALISI DEGLI EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON CETUXIMAB E/O CON LY294002, E/O CON PD98059.

Per cercare di comprendere i meccanismi alla base della resistenza al Cetuximab, ho condotto degli esperimenti per valutare se questa fosse mediata dall'attivazione di uno specifico pathway come quello delle MAP chinasi, o dalla via PI3K/AKT. Ho condotto quindi saggi di proliferazione, di vitalità cellulare ed analisi del ciclo cellulare trattando le cellule HT-29 ed i cloni K12 e K13 con Cetuximab e/o l'inibitore, LY294002 (LY) oppure con Cetuximab e/o PD98059 (PD). Questi due inibitori agiscono bloccando i due principali pathway a valle di RAS: l'inibitore PD agisce sul pathway RAF/MEK/ERK, ed in particolare è un inibitore specifico delle chinasi MEK 1 e 2; l'inibitore LY inibisce invece l'attività chinasi della PI3K, bloccando così il pathway PI3K/AKT.

5.2.1. Trattamento delle cellule HT-29

Sono stati condotti saggi di vitalità e di proliferazione delle cellule HT-29 trattate con Cetuximab (concentrazione finale 50µg/ml) e/o con l'inibitore PD98059 (concentrazione finale 20µM), e/o con l'inibitore della PI3K (LY294002, concentrazione finale 25µM). In particolare sono stati preparati campioni di cellule controllo (C), cellule trattate con Cetuximab (CTX), cellule trattate con PD98059 (PD), cellule trattate sia con Cetuximab che con PD98059 (CTX+PD), cellule trattate con LY294002 (LY), cellule trattate sia con Cetuximab che con LY294002 (CTX+LY). Le cellule sono state piastrate in piastre (100mmx20mm) alla concentrazione di 2×10^6 , il giorno seguente alcune aliquote sono state prelevate e contate per i saggi di vitalità e proliferazione (tempo 0), altre aliquote sono state sottoposte ai diversi trattamenti per 24, 48 e 72 ore. Dopo le 24, 48 e 72 ore da ciascun campione sono state prelevate aliquote utilizzate per i saggi di vitalità, di proliferazione e per le analisi citofluorimetriche tutte in triplicato.

5.2.1. a) Saggi di vitalità cellulare

In Figura 25 sono riportati rispettivamente la curva di crescita e l'istogramma del saggio di vitalità relativi alla media dei quattro esperimenti condotti in triplicato. Le curve di crescita sono state ottenute contando le cellule totali, sia vive (bianche) che morte (blu), mentre gli istogrammi relativi alla vitalità cellulare riportano la percentuale di cellule vive sul totale di

cellule contate. In questo caso, al contrario di quanto effettuato in precedenza, sono state incluse nelle analisi le cellule staccatesi dal substrato e passate in sospensione.

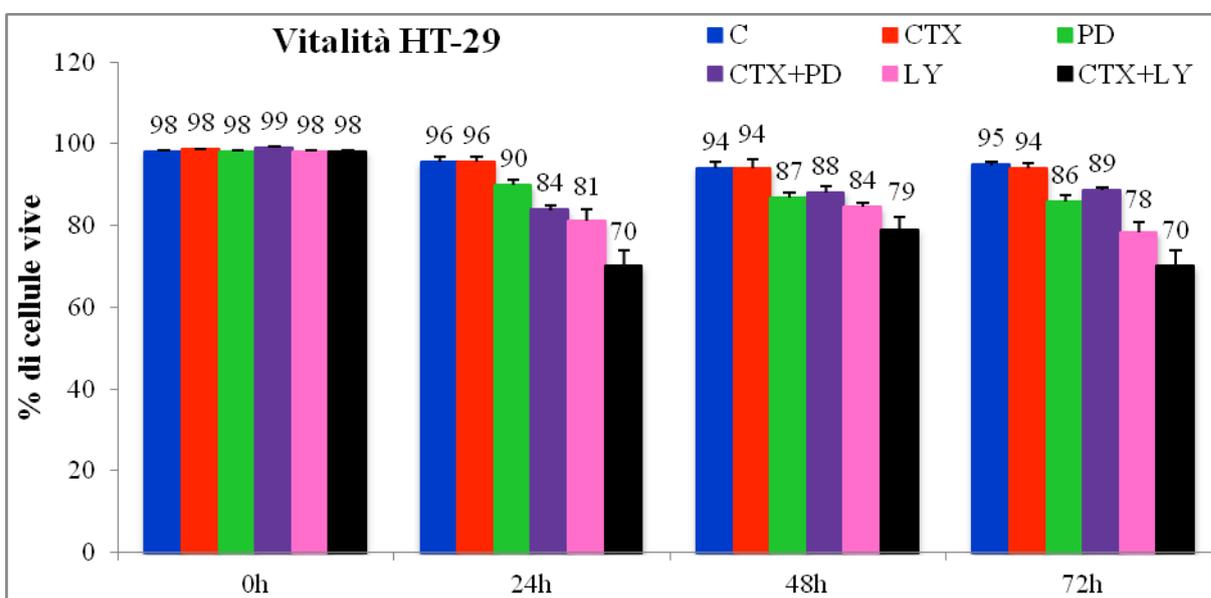
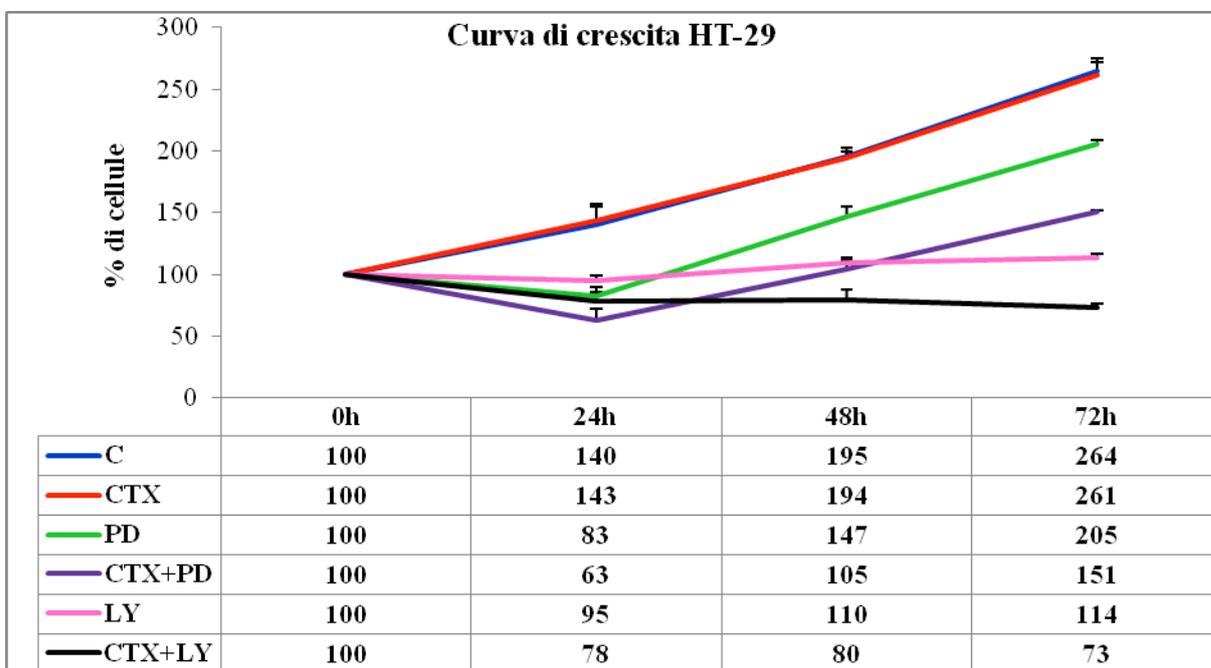


Figura 25. Curve di crescita delle cellule HT-29 controllo (C) e trattate con Cetuximab 50µg/ml (CTX), trattate con PD98059 (PD), con Cetuximab più PD98059 (CTX+PD), trattate con LY294002 (LY) e con Cetuximab più LY294002 (CTX+LY). Le curve riportano la media delle percentuali di cellule rispetto a quelle contate al tempo zero, e poste pari a 100. Le curve sono state ottenute analizzando i valori medi ottenuti dai quattro esperimenti, condotti in triplicato ed in maniera indipendente. Gli istogrammi riportano la percentuale di cellule vive rispetto alle cellule totali. Gli istogrammi sono stati ottenuti analizzando i valori medi ottenuti dai quattro esperimenti, condotti in triplicato ed in maniera indipendente. Tutti i dati sono stati elaborati con il programma Microsoft Office Excel (2007).

Dall'analisi di questi risultati si conferma che il Cetuximab non ha effetto sulla proliferazione o sulla vitalità delle cellule HT-29 non essendoci quasi alcuna differenza tra il campione C e quello trattato (CTX).

Le cellule con PD mostrano invece una riduzione della proliferazione e della vitalità alle 24 ore ed una significativa suscettibilità al trattamento con Cetuximab. Alle 48 ore, invece, sia le cellule trattate con PD che quelle con CTX+PD mostrano una ripresa della proliferazione, anche se i campioni CTX+PD hanno una ripresa minore rispetto alle cellule con il solo inibitore.

L'inibitore LY sembra avere un effetto citostatico, le cellule trattate con LY mostrano, infatti, una ridottissima proliferazione a tutti gli intervalli di tempo di osservazione ed una certa percentuale di morte. Quest'effetto cellulare citostatico risulta aumentato nelle cellule CTX+LY, inoltre, queste cellule mostrano un persistente blocco della proliferazione ed una maggiore riduzione della vitalità cellulare, effetto probabilmente dovuto all'azione concertata dei due trattamenti. L'inibizione del pathway della PI3K sembra quindi, ridurre se non eliminare la resistenza delle cellule HT-29 al Cetuximab cosa che non appare così evidente nel caso in cui venga inibito il pathway delle MEK.

5.2.1. b) Analisi del ciclo cellulare

Delle cellule trattate con il Cetuximab da solo o in associazione con gli inibitori PD ed LY è stata valutata anche la distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare.

Le aliquote di cellule, raccolte dopo 24, 48 o 72 ore, sono state processate seguendo il protocollo con Propidio Ioduro su cellule a fresco, descritto in Materiali e Metodi. In Figura 26 sono mostrati i grafici ottenuti dall'analisi al citofluorimetro di singoli campioni che sono rappresentativi di uno dei quattro esperimenti condotti in triplicato.

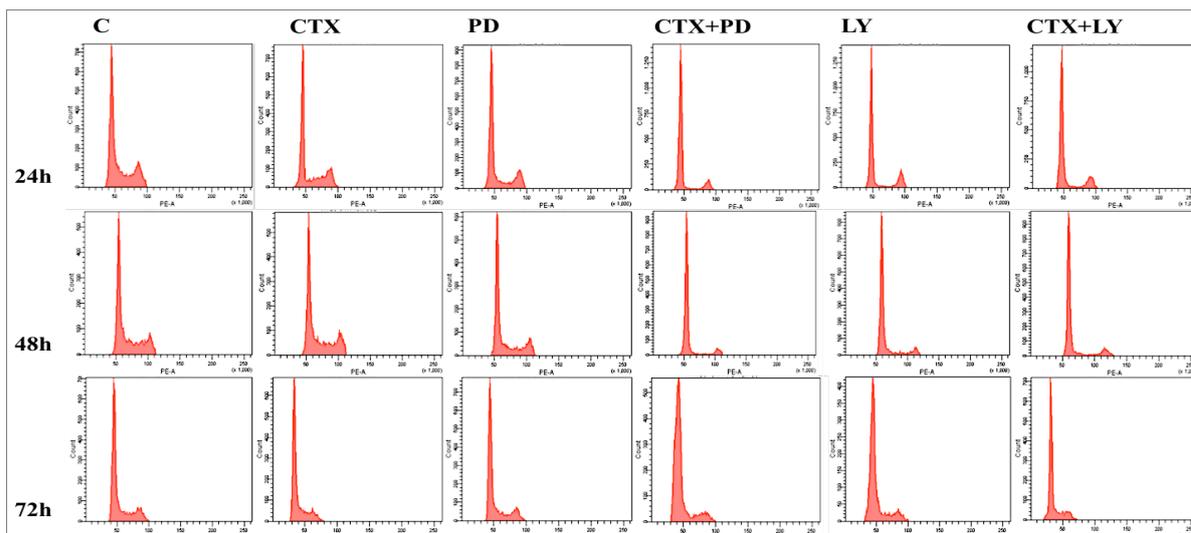


Figura 26. Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria eseguita sulle cellule HT-29. HT-29 controllo (C) trattate con Cetuximab (CTX), trattate con PD98059 (PD), con Cetuximab più PD98059 (CTX+PD), con LY294002 (LY), con Cetuximab e LY294002 (CTX+LY) per 24, 48 e 72 ore. I grafici riportano in ordinata il numero di cellule e in ascissa il contenuto di DNA. I grafici riportati in Figura sono stati ottenuti e analizzati mediante il software BD FACSDiva e sono indicativi di uno dei quattro esperimenti condotti.

In Tabella A sono riportati i valori medi e la deviazione standard, ottenuti dai quattro esperimenti, della percentuale di cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento, analizzando i dati mediante il software BD FACSDiva.

TABELLA A

	24h			48h			72h		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
C	63%±7	19%±6	16%±5	66%±5	20%±6	13%±2	76%±7	11%±5	11%±4
CTX	64%±7	21%±1	15%±5	65%±6	19%±6	14%±1	77%±6	12%±4	10%±2
PD	68%±1	14%±3	17%±2	70%±8	16%±7	11%±3	73%±6	15%±6	10%±1
PD+CTX	79%±2	5%±2	13%±3	83%±2	5%±2	8%±3	81%±2	9%±2	9%±1
LY	79%±7	9%±4	12%±5	81%±6	11%±5	7%±2	77%±4	13%±2	8%±3
LY+CTX	80%±9	7%±3	11%±5	83%±5	8%±3	8%±1	79%±1	10%±3	9%±2

Tabella A. Sono riportati i valori ottenuti dalla media di tutti gli esperimenti relativi alle cellule HT-29. Si riporta la media e la deviazioni standard della percentuale di cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento ottenuti per ciascun campione in triplicato, per i quattro esperimenti, analizzando i dati mediante il software BD FACSDiva.

In Figura 27 sono mostrati gli istogrammi rappresentativi delle analisi presentate in Tabella A, che riportano la media dei valori medi della percentuale di cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare, ottenuti dai quattro esperimenti condotti.

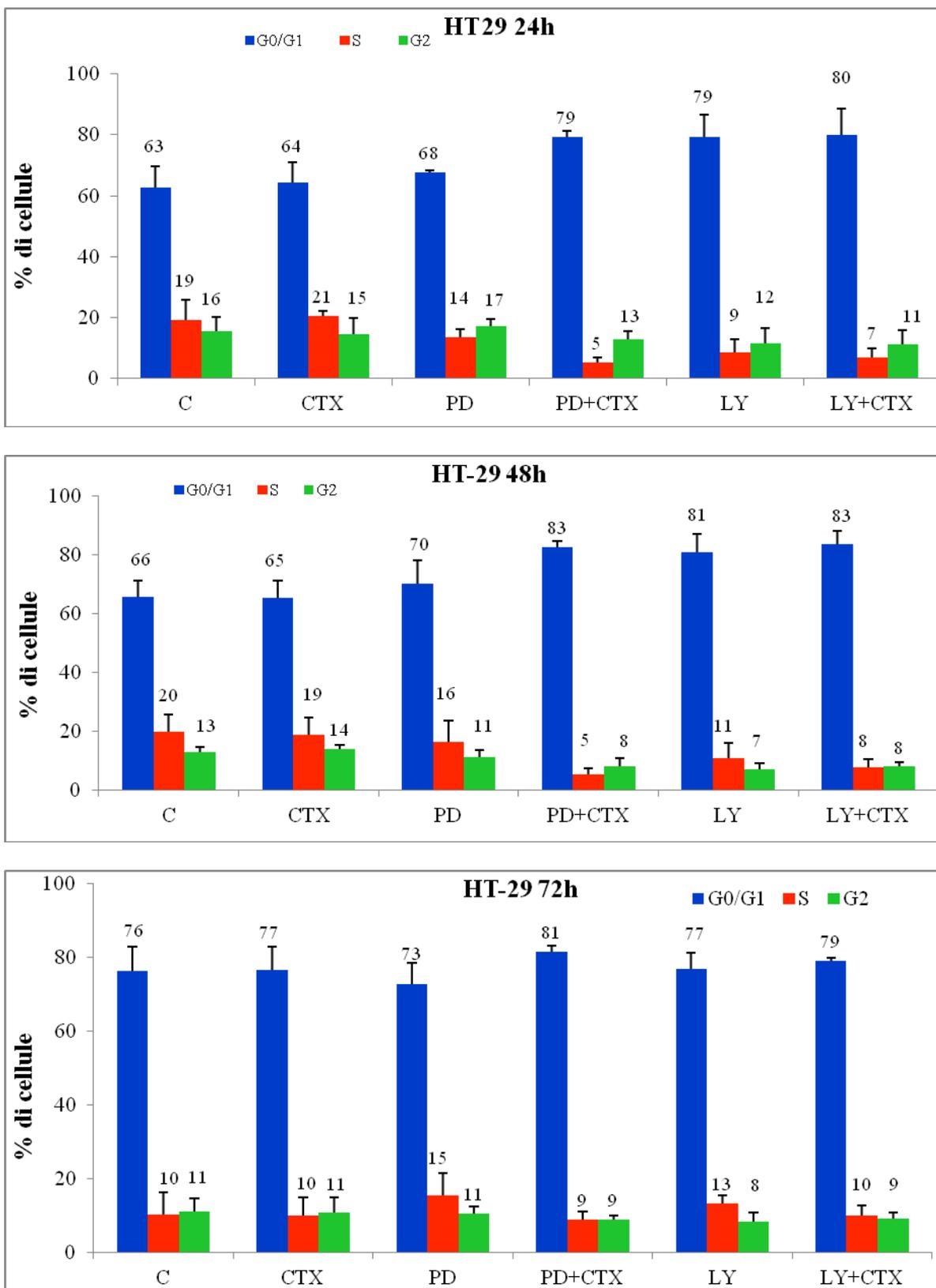


Figura 27. Rappresentazione grafica della media di tutti gli esperimenti condotti. Sono riportati i valori espressi in percentuale di cellule presenti nelle singole fasi del ciclo cellulare, per gli esperimenti a 24, 48 e a 72 ore.

In Tabella B sono riportati, la percentuale media delle cellule C per ogni fase del ciclo cellulare e, per i campioni trattati con Cetuximab e/o PD e/o LY, l'aumento o la riduzione della percentuale media di cellule nella corrispondente fase del ciclo.

TABELLA B

	24h			48h			72h		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
C	63%	19%	16%	66%	20%	13%	76%	10%	11%
CTX	+1	+2	-2	-1	-1	+1	+1	+2	-1
PD	+5	-5	+1	+4	-4	-2	-3	+5	-1
PD+CTX	+16	-14	-3	+17	-15	-5	+5	-1	-2
LY	+16	-11	-5	+15	-9	-6	+1	+3	-3
LY+CTX	+17	-12	-5	+17	-12	-5	+3	0	-2

Tabella B. Sono riportate la percentuale di cellule HT-29 controllo (C) per ogni fase del ciclo cellulare e le differenze, tra le medie della percentuale di cellule sottoposte ai diversi trattamenti per 24, 48 e 72 ore e quella del campione C.

Da questi risultati, come dai risultati dei saggi di vitalità, non è evidente un effetto rilevante del Cetuximab sul ciclo cellulare delle cellule HT-29. L'inibitore PD ha invece un effetto provocando un leggero aumento delle cellule in fase G₀/G₁, con diminuzione della percentuale in fase S soprattutto alle 24 e 48 ore di trattamento. Quest'effetto viene notevolmente potenziato dall'azione del Cetuximab, che provoca un notevole aumento in fase G₀/G₁ ed una conseguente riduzione della percentuale di cellule in fase S del ciclo cellulare. Tale effetto sembra ridursi alle 72 ore, ma bisogna tenere conto del fatto che, a tale tempo, le cellule controllo (C) si avvicinano alla confluenza e quindi rallentano la loro crescita.

Effetto simile si ha (sempre alle 24 e 48 ore di trattamento) quando le cellule sono trattate con l'inibitore LY da solo. Quest'effetto dell'inibitore è evidente anche quando le cellule sono trattate contemporaneamente con il Cetuximab ma, al contrario di quanto evidenziato per il PD, non risulta esserci un'influenza dell'inibitore sull'azione del farmaco.

Da questi risultati si può, quindi, affermare che i due inibitori influenzano in misura maggiore o minore l'azione del farmaco per quanto riguarda l'effetto che questo ha sulla proliferazione, sulla vitalità delle cellule HT-29 e sulla loro distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare. In particolare, il PD sembra sensibilizzare le cellule alle 24 ore di trattamento con Cetuximab, provocando un blocco della proliferazione ed una maggiore mortalità; inoltre, si evidenzia come questo inibitore provochi un aumento delle cellule trattate con il farmaco in fase G₀/G₁ ed una conseguente riduzione della percentuale di cellule in fase S del ciclo cellulare.

L'inibitore LY, da solo, sembra provocare un blocco della proliferazione e quest'effetto risulta potenziato nelle cellule trattate anche con Cetuximab le quali mostrano anche una maggiore mortalità (Figura 25). Questo inibitore, inoltre, provoca un aumento delle cellule in fase G_0/G_1 ed una conseguente riduzione della percentuale in fase S del ciclo cellulare alle 24 e 48 ore di trattamento, non sembra esserci però una differenza tra le cellule trattate con il solo inibitore e le cellule trattate contemporaneamente con il farmaco.

Dal confronto dei dati ottenuti con i due inibitori sembra quindi che l'inibitore PD influenzi maggiormente l'azione del Cetuximab sul ciclo cellulare, provocando un blocco in fase G_0/G_1 delle cellule, soprattutto alle 24 e 48 ore di trattamento; l'inibitore LY invece influenza l'azione del farmaco sulla proliferazione e vitalità cellulare inducendo una maggiore mortalità cellulare.

5.2.2. Trattamento delle cellule K12 e K13

Allo scopo di valutare il coinvolgimento dei pathway PI3K/AKT e delle MAPK nella resistenza al trattamento con Cetuximab in presenza di mutazioni in K-RAS, gli stessi saggi condotti con i due inibitori, PD ed LY, sono stati ripetuti utilizzando le due linee cellulari K12 e K13. Per eseguire i saggi di proliferazione e di vitalità cellulare su queste linee cellulari sono stati preparati i campioni controllo (C), controllo più Cetuximab (C+CTX), controllo più PD98059 (C+PD), controllo più LY294002 (C+LY), controllo più Cetuximab e PD98059 (C+CTX+PD), controllo più Cetuximab e LY294002 (C+CTX+LY), campioni indotti (M), indotti più Cetuximab (M+CTX), indotti più PD98059 (M+PD), indotti più LY294002 (M+LY), indotti più Cetuximab e PD98059 (M+CTX+PD) e indotti più Cetuximab e LY294002 (M+CTX+LY), trattati per 24, 48 e 72 ore (come descritto in Materiali e Metodi). Sono stati condotti tre esperimenti indipendenti per le K12 e quattro esperimenti per le K13, ciascuno in triplicato.

5.2.2. a) Saggi di vitalità cellulare delle cellule K12

Nelle figure 28 (a e b) e 29 (a e b) sono riportate le curve di crescita e gli istogrammi relativi alla vitalità cellulare ottenuti dalla media dei tre esperimenti. Le curve di crescita sono state ottenute contando le cellule totali, sia vive (bianche) che morte (blu), mentre gli istogrammi, relativi alla vitalità cellulare, riportano la percentuale di cellule vive sul totale di cellule contate. In questo caso sono state incluse nelle analisi le cellule staccatesi dal substrato e passate in sospensione.

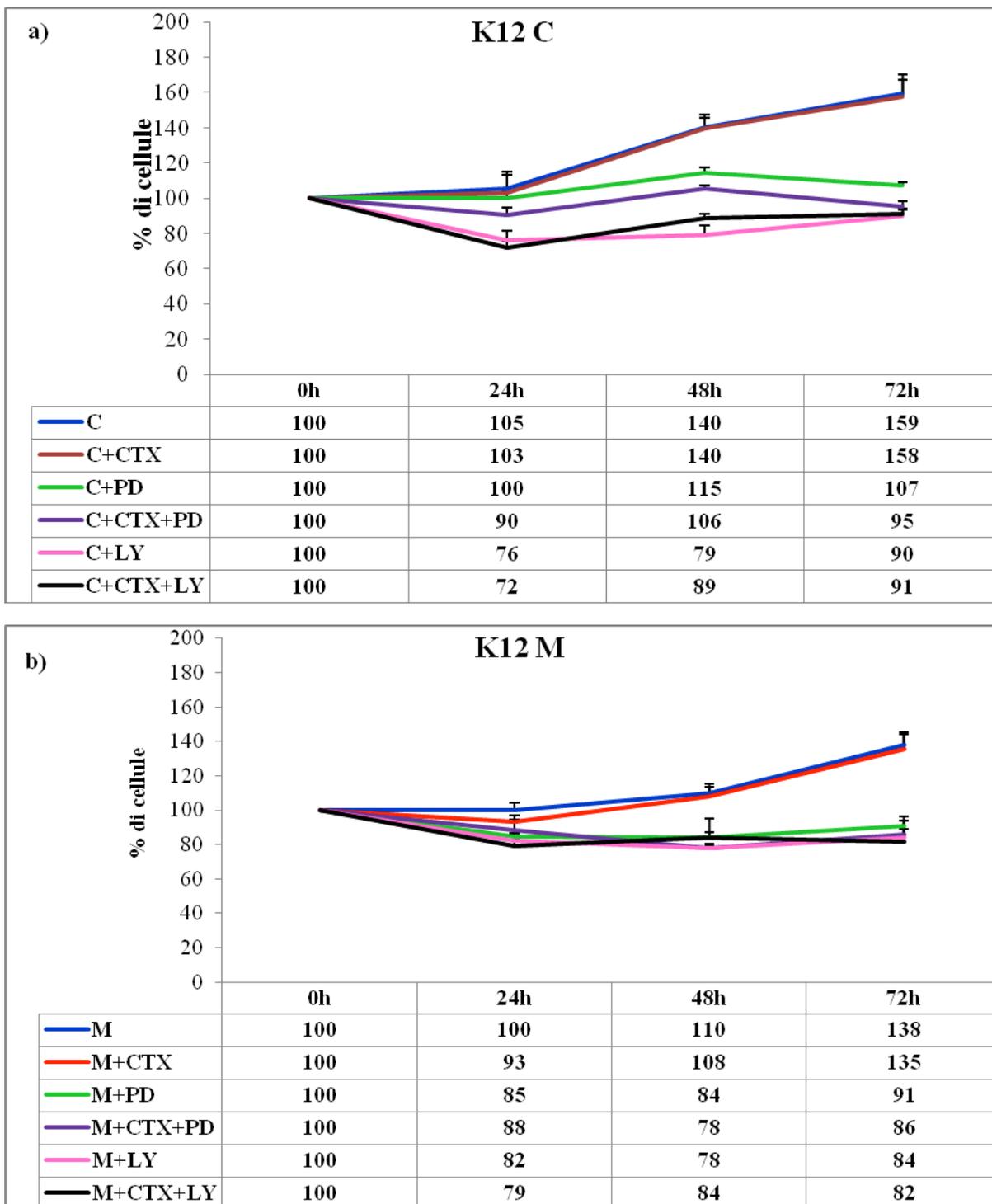


Figura 28. Curve di crescita di cellule K12. **a)** cellule K12 controllo (C), trattate con Cetuximab (C+CTX), trattate con PD98059 (C+PD), con Cetuximab più PD98059 (C+CTX+PD) e con Cetuximab più LY294002 (C+CTX+LY); **b)** cellule K12 indotte (M), indotte e trattate con Cetuximab (M+CTX), trattate con PD98059 (M+PD), con Cetuximab più PD98059 (M+CTX+PD), con LY294002 (M+LY) e con Cetuximab più LY294002 (M+CTX+LY); le curve di crescita riportano la percentuale di cellule rispetto a quelle contate al tempo zero per ciascun campione e poste pari a 100 e sono il risultato dalla media di tre esperimenti analizzati con il programma Microsoft Office Excel (2007).

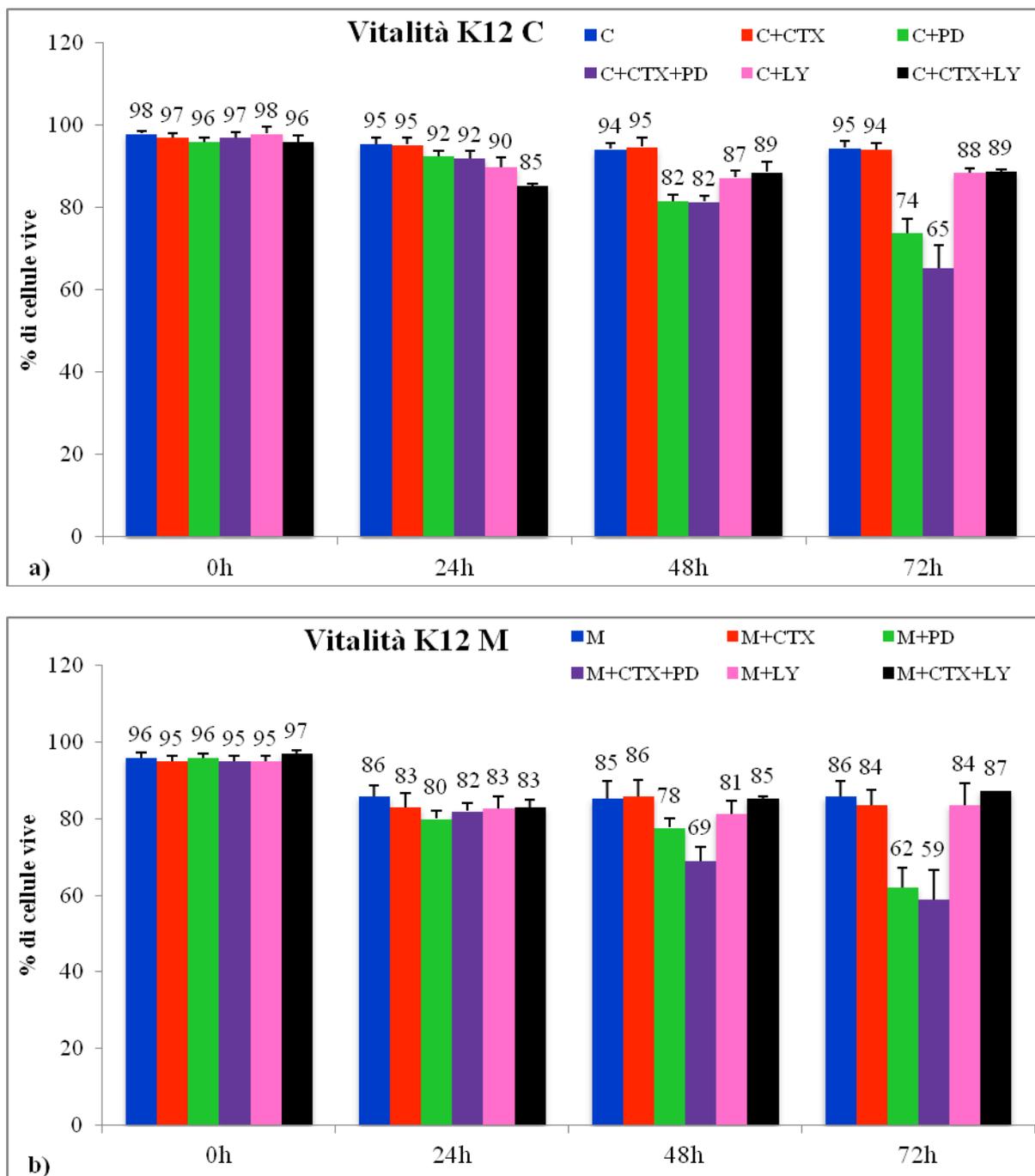


Figura 29. Saggi di vitalità di cellule K12. a) Cellule K12 controllo (C), trattate con Cetuximab (C+CTX), trattate con PD98059 (C+PD), con Cetuximab e PD98059 (C+CTX+PD), con LY294002 (C+LY) e con Cetuximab più LY294002 (C+CTX+LY); b) cellule K12 indotte (M), indotte e trattate con Cetuximab (M+CTX), trattate con PD98059 (M+PD), con Cetuximab e PD98059 (M+CTX+PD), con LY294002 (M+LY) e con Cetuximab più LY294002 (M+CTX+LY). I saggi di vitalità riportano la percentuale di cellule vive rispetto alle cellule totali e sono il risultato dalla media di tre esperimenti analizzati con il programma Microsoft Office Excel (2007).

Dall'analisi di questi risultati si conferma che il Cetuximab non ha effetto sulle cellule K12 non indotte. L'inibitore LY risulta avere un effetto citotossico sulle cellule K12 C, ma non sono evidenti particolari differenze tra i campioni trattati con LY e quelli trattati anche con il

farmaco. L’inibitore PD sembra, invece, avere un effetto citostatico. Il contemporaneo trattamento delle cellule K12 C con il Cetuximab e l’inibitore PD, rende il farmaco efficace, aumentando l’effetto del singolo inibitore. Questo inibitore provoca, inoltre, un aumento della mortalità cellulare a 48 e 72 ore accentuato dal farmaco.

Nelle cellule indotte ad esprimere K-RAS mutato (M), il Cetuximab ha un effetto modesto e solo alle 24 ore. Il trattamento delle stesse cellule con il farmaco in associazione con l’inibitore PD, che induce un blocco della crescita ed elevata mortalità soprattutto alle 48 e 72 ore, potenzia l’effetto del Cetuximab. Anche l’inibitore LY induce blocco della proliferazione ed il Cetuximab, al contrario di quanto avviene con il PD non viene modificato.

Questi dati dimostrano, quindi, che inibendo il pathway delle MEK le cellule K12 risultano più sensibili Cetuximab, soprattutto quando indotte ad esprimere l’isoforma mutata di K-RAS.

5.2.2. b) Analisi del ciclo cellulare delle cellule K12

Degli stessi campioni sui quali ho effettuato i saggi di vitalità cellulare, ho valutato la distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare.

Aliquote di cellule raccolte dopo 24, 48 o 72 ore, sono state processate. In Figura 30 e 31 sono mostrati i grafici ottenuti dall’analisi al citofluorimetro di singoli campioni e che sono relative ad uno dei tre esperimenti condotti.

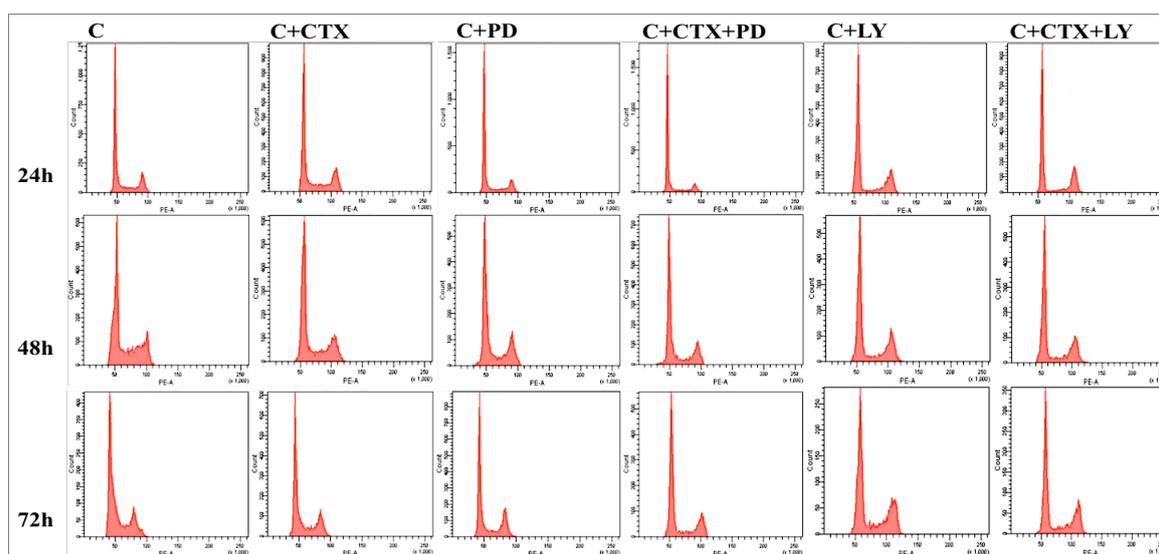


Figura 30. Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria eseguita sulle cellule K12 C. K12 controllo (C), trattate con Cetuximab (C+CTX), trattate con PD98059 (C+PD), con Cetuximab più PD98059 (C+CTX+PD), con LY294002 (C+LY), con Cetuximab e LY294002 (C+CTX+LY) per 24, 48 e 72 ore. I grafici riportano in ordinata il numero di cellule e in ascissa il contenuto di DNA. I grafici riportati in Figura sono stati ottenuti e analizzati mediante il software BD FACSDiva e sono indicativi di uno dei tre esperimenti condotti.

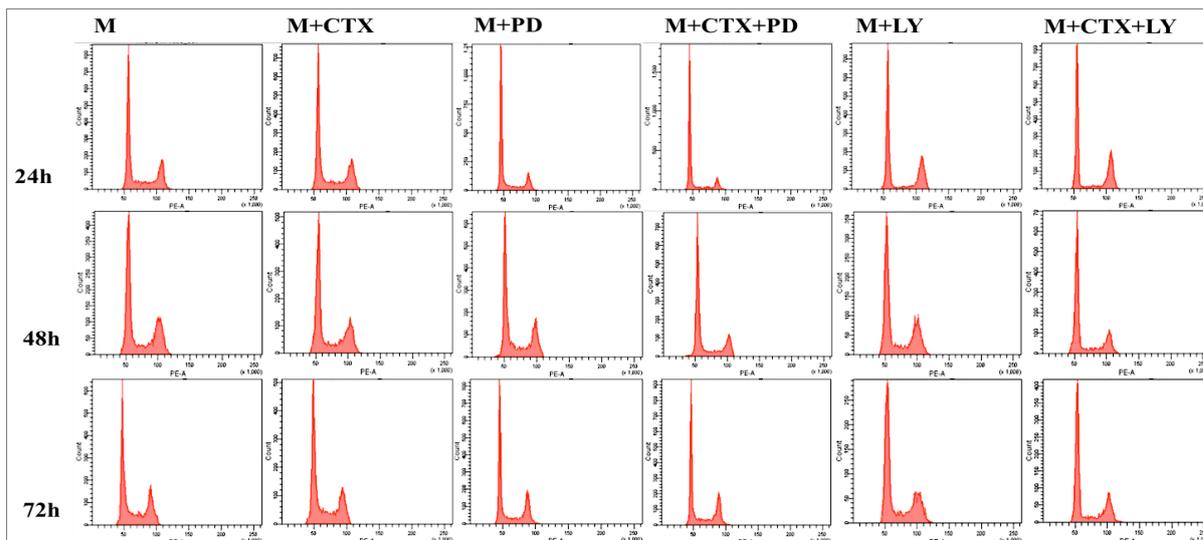


Figura 31. Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria eseguita sulle cellule K12 M. K12 indotte con Mifepristone (M), indotte e trattate con Cetuximab (M+CTX), indotte e trattate con PD98059 (M+PD), indotte e trattate con Cetuximab+PD98059 (M+CTX+PD), indotte e trattate con LY294002 (M+LY), indotte e trattate con Cetuximab e LY294002 (M+CTX+LY) per 24, 48 e 72 ore. I grafici riportano in ordinata il numero di cellule e in ascissa il contenuto di DNA. I grafici riportati in Figura sono stati ottenuti e analizzati mediante il software BD FACSDiva e sono indicativi di uno dei tre esperimenti condotti.

In Tabella C sono riportati i valori di percentuale relativi alla media dei tre esperimenti condotti in maniera indipendente ed in triplicato. In particolare sono riportati i valori medi e la deviazione standard, ottenuti dai tre esperimenti, della percentuale di cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento, analizzando i dati mediante il software BD FACSDiva.

TABELLA C

	24h			48h			72h		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
C	53%±8	23%±6	21%±5	56%±4	22%±4	19%±4	59%±4	22%±3	17%±2
C+CTX	56%±6	23%±5	21%±4	58%±4	21%±2	20%±3	60%±6	20%±2	18%±5
C+PD	60%±9	20%±6	21%±6	61%±4	15%±2	22%±2	58%±1	17%±2	21%±5
C+PD+CTX	64%±12	15%±1	20%±9	65%±6	13%±2	19%±4	64%±3	15%±5	18%±3
C+LY	68%±2	10%±2	20%±1	66%±6	12%±0	22%±4	70%±3	14%±3	20%±5
C+LY+CTX	66%±2	9%±1	24%±1	65%±9	13%±2	22%±6	66%±3	12%±3	19%±4
	24h			48h			72h		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
M	51%±6	20%±2	27%±5	51%±6	23%±4	24%±6	52%±6	21%±4	27%±5
M+CTX	52%±5	20%±2	26%±4	52%±7	22%±3	25%±5	54%±6	20%±3	25%±6
M+PD	58%±7	17%±1	22%±6	52%±7	24%±2	23%±3	55%±7	22%±6	21%±2
M+PD+CTX	61%±10	14%±1	22%±6	62%±9	17%±5	22%±6	57%±9	19%±5	21%±3
M+LY	60%±10	9%±1	28%±8	61%±7	15%±1	21%±9	57%±10	16%±2	27%±7
M+LY+CTX	59%±9	10%±2	30%±9	65%±5	15%±1	18%±5	61%±10	14%±1	26%±9

Tabella C. Sono riportati i valori ottenuti dalla media di tutti gli esperimenti relativi alle cellule K12. Si riporta la media e le deviazioni standard della percentuale di cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento ottenuti per ciascun campione in triplicato, per i tre esperimenti, analizzando i dati mediante il software BD FACSDiva.

In Figura 32 e 33 sono mostrati gli istogrammi rappresentativi delle analisi presentate in Tabella C, che riportano la media dei valori medi della percentuale di cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare, ottenuti dai tre esperimenti condotti.

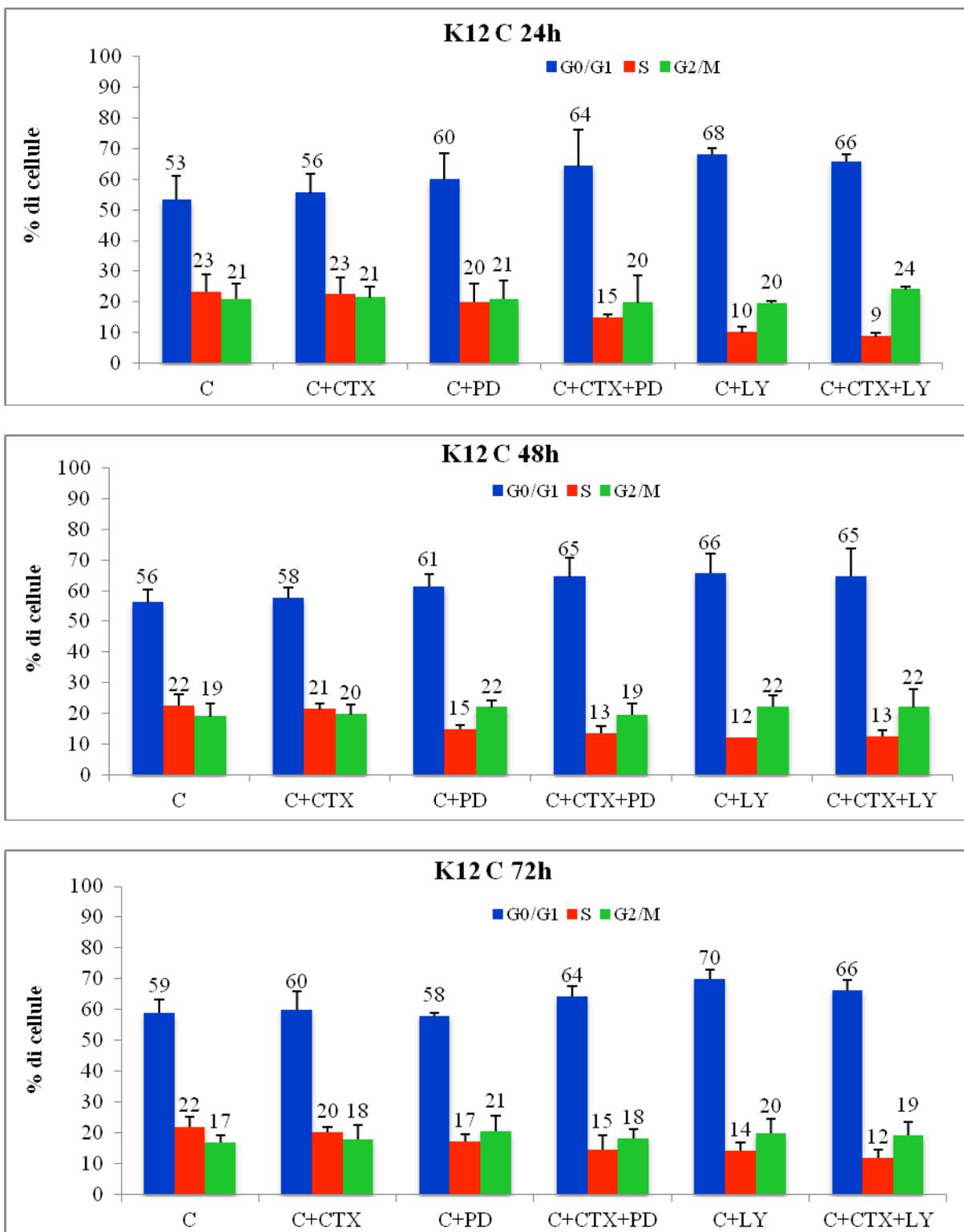


Figura 32. Rappresentazione grafica della media di tutti gli esperimenti condotti per le cellule K12 C. Sono riportati i valori espressi in percentuale di cellule presenti nelle singole fasi del ciclo cellulare, per gli esperimenti a 24, 48 e a 72 ore.

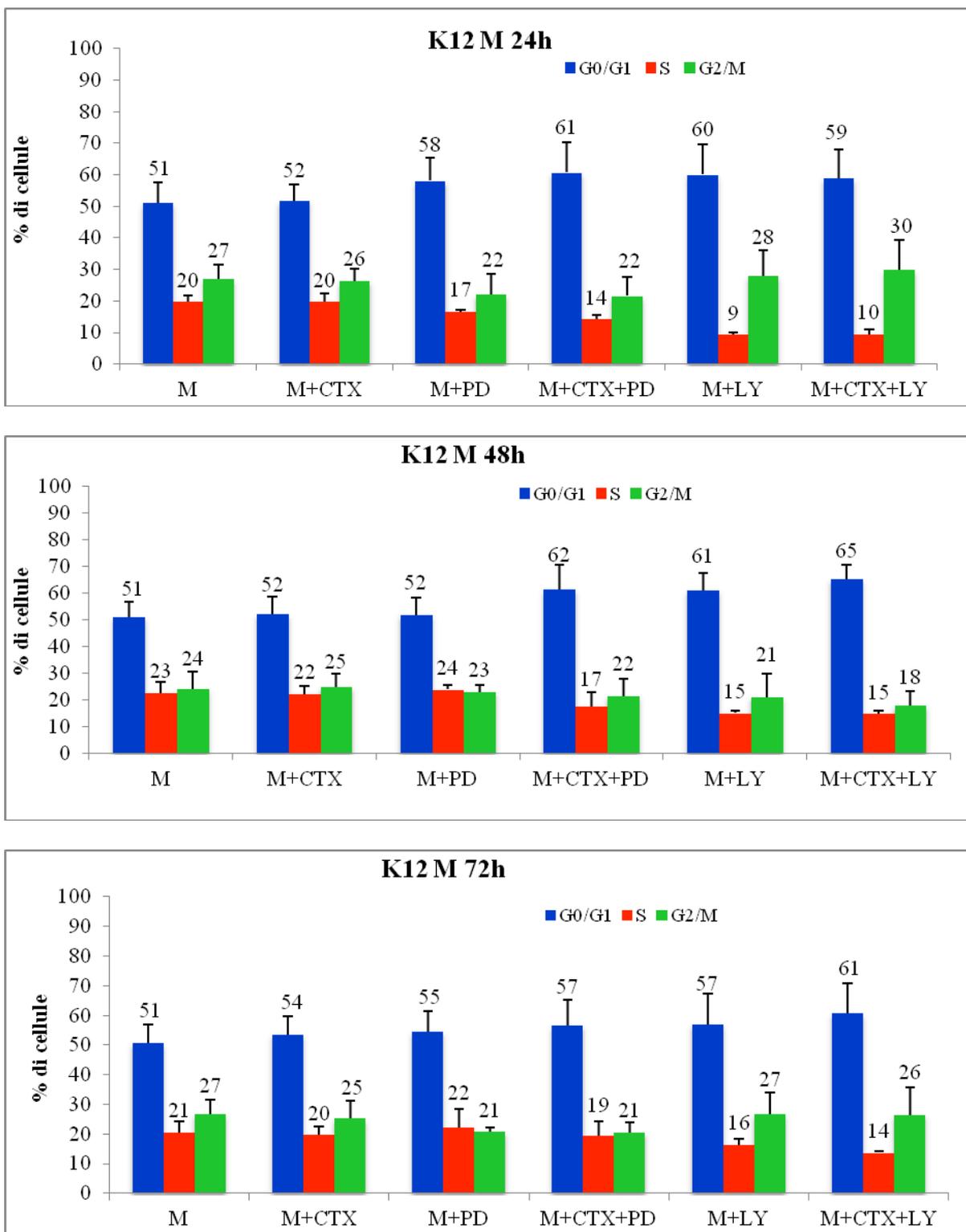


Figura 33. Rappresentazione grafica della media di tutti gli esperimenti condotti per le cellule K12 M. Sono riportati i valori espressi in percentuale di cellule presenti nelle singole fasi del ciclo cellulare, per gli esperimenti a 24, 48 e a 72 ore.

In Tabella D sono riportati, per ogni fase del ciclo cellulare, la percentuale media delle cellule C e delle cellule M e, per i campioni trattati con Cetuximab e/o PD e/o LY, l’aumento o la riduzione della percentuale media di cellule nella corrispondente fase del ciclo.

TABELLA D

	24h			48h			72h		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
C	53%	23%	21%	56%	22%	19%	59%	22%	17%
C+CTX	+3	-1	+1	+2	-1	+1	+1	-2	+1
C+PD	+7	-3	+1	+5	-7	+3	-1	-5	+4
C+PD+CTX	+11	-8	-1	+9	-9	0	+5	-7	+1
C+LY	+15	-13	-1	+10	-10	+3	+11	-8	+3
C+LY+CTX	+13	-14	+3	+9	-10	+3	+7	-10	+2
	24h			48h			72h		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
M	51%	20%	27%	51%	23%	24%	59%	22%	17%
M+CTX	+1	0	-3	+1	-1	+1	-6	-2	+8
M+PD	+7	-3	-5	+1	+1	-1	-4	0	+4
M+PD+CTX	+10	-6	-5	+11	-6	-3	-2	-3	+4
M+LY	+9	-11	+1	+10	-8	-3	-2	-6	+10
M+LY+CTX	+8	-11	+3	+14	-8	-6	+2	-8	+9

Tabella D. Sono riportate la percentuale di cellule K12 controllo (C) per ogni fase del ciclo cellulare e le differenze, tra le medie della percentuale di cellule sottoposte ai diversi trattamenti per 24, 48 e 72 ore e quella del campione C. Nella parte in basso della tabella sono riportate la percentuale di cellule K12 indotte (M) per ogni fase del ciclo cellulare e le differenze, per ogni fase del ciclo cellulare, tra le medie della percentuale di cellule sottoposte ai diversi trattamenti per 24, 48 e 72 ore e quella del campione M.

Dall’analisi di questi risultati non si evidenzia effetto da parte del Cetuximab sulle cellule K12 controllo o indotte. Risulta esserci invece un effetto di entrambi gli inibitori sulle cellule K12 C. Gli inibitori provocano un aumento delle cellule in fase G₀/G₁ con conseguente riduzione delle cellule in fase S, soprattutto a 24 e 48 ore di trattamento. In un trattamento contemporaneo del Cetuximab con uno dei due inibitori testati, si osserva che il PD, ma no l’LY, rende il farmaco efficace. Effetto analogo seppure minore si ha per le cellule K12 M.

I risultati ottenuti dimostrano quindi che l’inibizione della via della PI3K e del pathway delle MAPK ha un effetto citossico sulle cellule K12. Questi risultati, inoltre, dimostrano che l’inibizione del pathway delle MAPK sensibilizza le cellule K12 al trattamento con Cetuximab soprattutto quando indotte ad esprimere l’isoforma K-RAG12V, provocando un

blocco della proliferazione ed un'elevata mortalità alle 48 e 72 ore di trattamento. Gli inibitori PD ed LY inoltre nelle cellule K12, indotte e non ad esprimere l'isoforma mutata di K-RAS, provocano un aumento delle cellule in fase G_0/G_1 e conseguente riduzione in fase S, soprattutto a 24 e 48 ore di trattamento ed il Cetuximab sembra potenziare gli effetti del PD ma non dell'LY.

5.2.2. c) Saggi di vitalità cellulare delle cellule K13

Lo stesso tipo di esperimenti è stato ripetuto utilizzando il clone K13, per valutare se mutazioni differenti di K-RAS evidenzino risposte diverse al trattamento con Cetuximab associato con i due inibitori LY e PD.

Nelle Figure 34 (a e b) e 35 (a e b) sono riportate le curve di crescita e gli istogrammi relativi alla vitalità cellulare ottenuti dalla media di quattro esperimenti, che hanno dato risultati paragonabili.

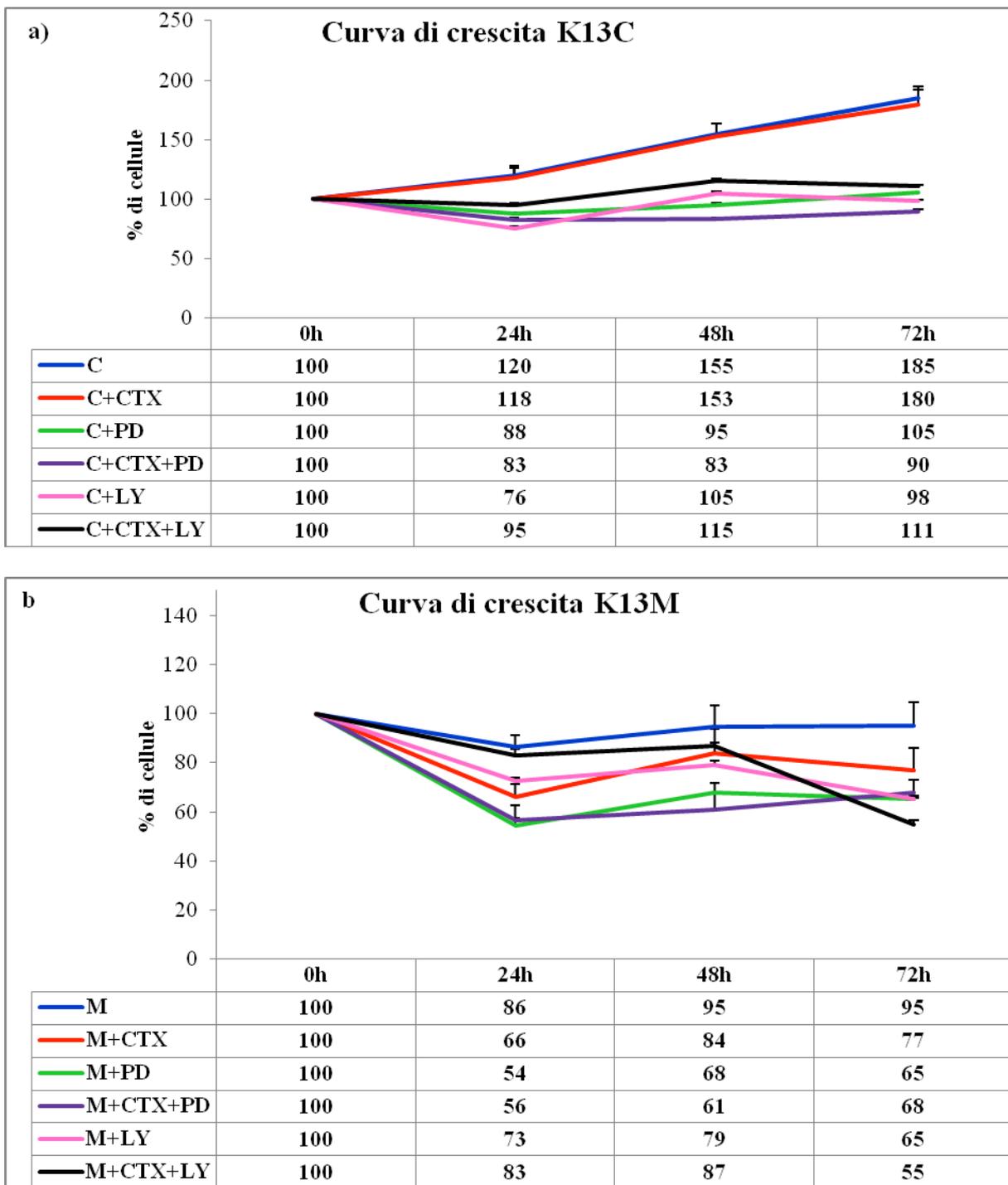


Figura 34. Curve di crescita di cellule K13. a) Cellule K13 controllo (C), trattate con Cetuximab (C+CTX), trattate con PD98059 (C+PD), con Cetuximab e PD98059 (C+CTX+PD), con LY294002 (C+LY) e con Cetuximab più LY294002 (C+CTX+LY); b) cellule K13 indotte (M), indotte e trattate con Cetuximab (M+CTX), trattate con PD98059 (M+PD), con Cetuximab e PD98059 (M+CTX+PD), con LY294002 (M+LY) e con Cetuximab più LY294002 (M+CTX+LY). Le curve di crescita riportano la percentuale di cellule rispetto a quelle contate al tempo zero per ciascun campione e poste pari a 100, e sono il risultato dalla media di quattro esperimenti analizzati con il programma Microsoft Office Excel (2007).

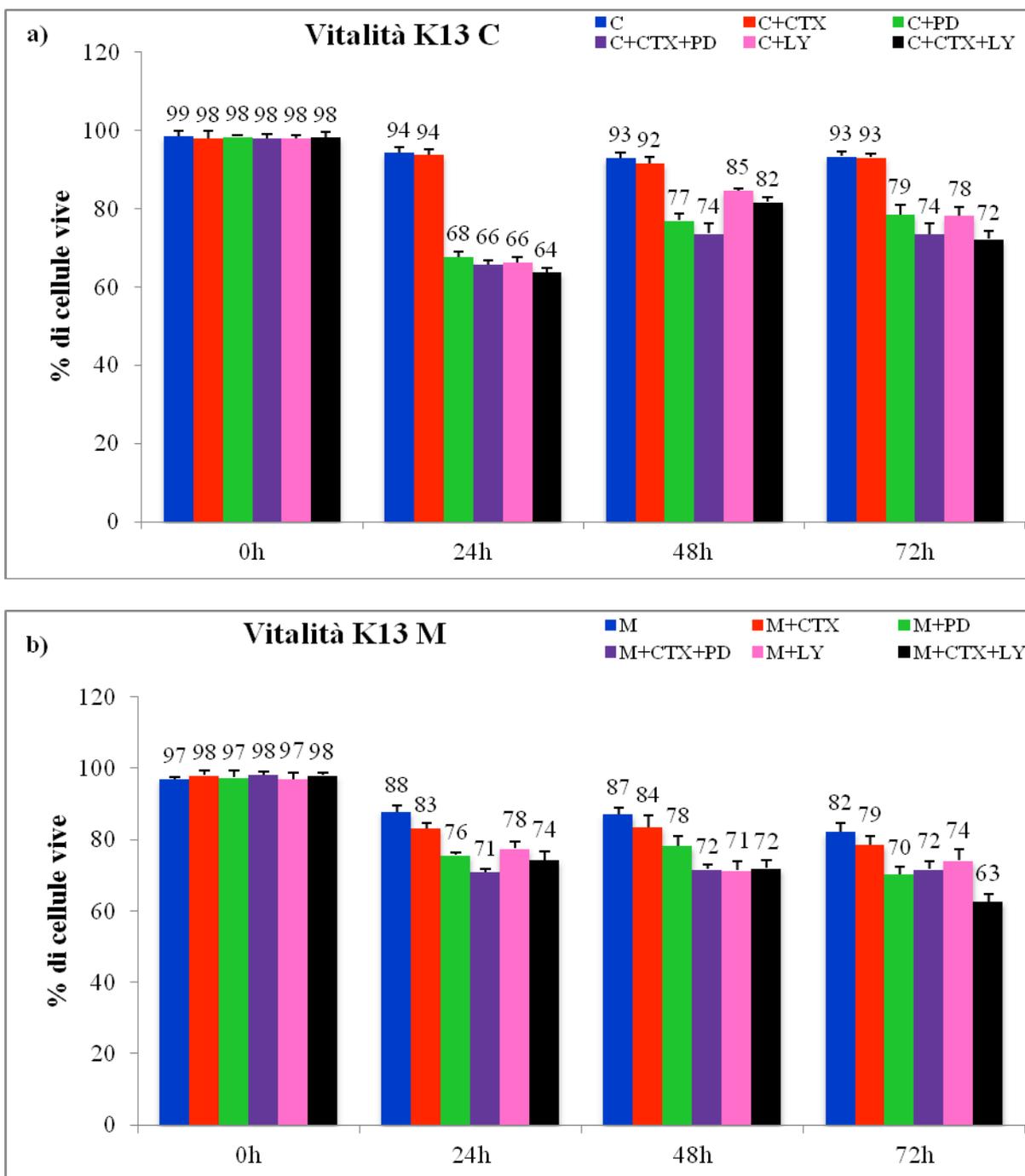


Figura 35. Saggi di vitalità di cellule K13. a) Cellule K13 controllo (C), trattate con Cetuximab (C+CTX), trattate con PD98059 (C+PD), con Cetuximab e PD98059 (C+CTX+PD), con LY294002 (C+LY) e con Cetuximab più LY294002 (C+CTX+LY); b) Cellule K13 indotte (M), indotte e trattate con Cetuximab (M+CTX), trattate con PD98059 (M+PD), con Cetuximab e PD98059 (M+CTX+PD), con LY294002 (M+LY) e con Cetuximab più LY294002 (M+CTX+LY); i saggi di vitalità riportano la percentuale di cellule vive rispetto alle cellule totali e sono il risultato dalla media di quattro esperimenti analizzati con il programma Microsoft Office Excel (2007).

Gli inibitori hanno entrambi un effetto su queste cellule; in particolare, si nota un effetto citotossico di LY alle 24 ore di trattamento parzialmente contrastato dal Cetuximab (C+CTX+LY) ed un effetto citostatico del PD per tutto l'intervallo di trattamento potenziato,

in questo caso, dal Cetuximab (C+CTX+PD). Per quanto riguarda le cellule K13 indotte ad esprimere K-RAS mutato si nota come l’induzione della mutazione provochi un blocco della proliferazione e renda le cellule notevolmente più sensibili al trattamento con Cetuximab (M+CTX) soprattutto alle 24 ore di trattamento. L’induzione della mutazione, inoltre, sembra rendere le cellule più sensibili anche al trattamento con l’inibitore PD e non sembra esserci un’influenza del farmaco. L’inibitore LY risulta per queste cellule citotossico. Il Cetuximab contrasta l’effetto di questo inibitore, almeno per le prime 48 ore. Alle 72 ore invece si ha una drastica riduzione del numero di cellule.

5.2.2. d) Analisi del ciclo cellulare delle cellule K13

Anche delle cellule K13 controllo ed indotte, con Mifepristone, ad esprimere la mutazione è stata effettuata l’analisi del ciclo cellulare mostrata rispettivamente nelle Figure 36 e 37. In queste Figure sono mostrati i grafici ottenuti dall’analisi al citofluorimetro di singoli campioni e che sono relative ad uno dei quattro esperimenti condotti.

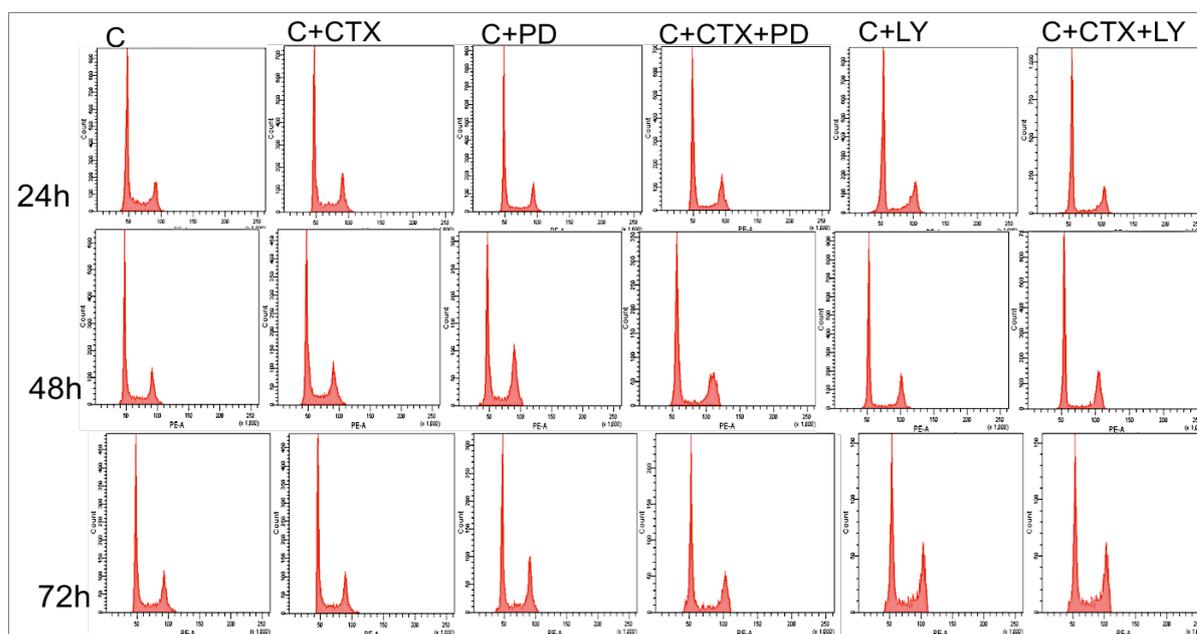


Figura 36. Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria eseguita sulle cellule K13 C. K13 controllo (C), trattate con Cetuximab (C+CTX), trattate con PD98059 (C+PD), con Cetuximab più PD98059 (C+CTX+PD), con LY294002 (C+LY), con Cetuximab e LY294002 (C+CTX+LY) per 24, 48 e 72 ore. I grafici riportano in ordinata il numero di cellule e in ascissa il contenuto di DNA. I grafici riportati in Figura sono stati ottenuti e analizzati mediante il software BD FACSDiva.

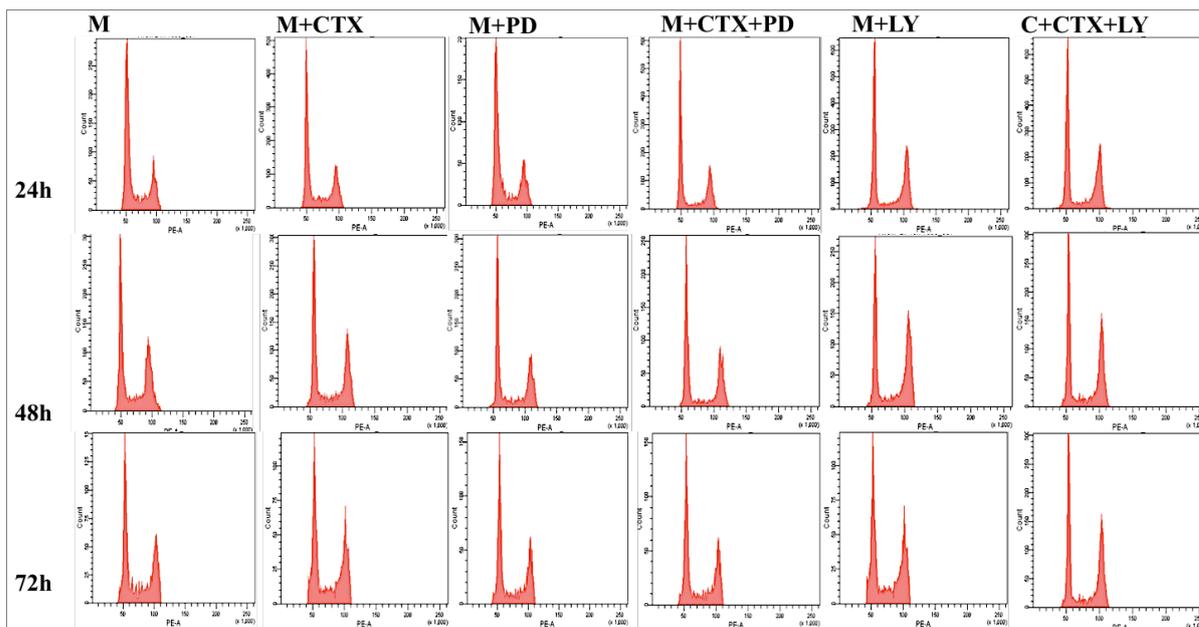


Figura 37. Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria eseguita sulle cellule K13 M. K13 indotte con Mifepristone (M), indotte e trattate con Cetuximab (M+CTX), indotte e trattate con PD98059 (M+PD), indotte e trattate con Cetuximab piú PD98059 (M+CTX+PD), indotte e trattate con LY294002 (M+LY), indotte e trattate con Cetuximab e LY294002 (M+CTX+LY) per 24, 48 e 72 ore. I grafici riportano in ordinata il numero di cellule e in ascissa il contenuto di DNA. I grafici riportati in Figura sono stati ottenuti e analizzati mediante il software BD FACSDiva.

In Tabella E sono riportati i valori relativi alla media dei tre esperimenti condotti in triplicato. In particolare sono riportati i valori medi e la deviazione standard, ottenuti dai quattro esperimenti, della percentuale di cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento, analizzando i dati mediante il software BD FACSDiva.

TABELLA E

	24h			48h			72h		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
C	51%±5	21%±2	27%±6	52%±4	22%±4	25%±4	49%±4	22%±3	26%±3
C+CTX	49%±3	21%±1	28%±5	51%±4	24%±3	23%±4	51%±5	22%±4	24%±3
C+PD	55%±5	19%±3	24%±3	55%±10	14%±1	28%±8	53%±4	17%±1	29%±4
C+PD+CTX	56%±1	18%±1	25%±1	57%±1	13%±1	26%±1	64%±1	13%±3	21%±2
C+LY	57%±3	14%±2	28%±6	58%±7	13%±3	39%±2	51%±2	27%±2	22%±2
C+LY+CTX	60%±7	12%±1	26%±4	57%±4	9%±1	37%±6	49%±2	22%±5	30%±8
	24h			48h			72h		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
M	46%±7	22%±2	33%±7	45%±1	19%±1	36%±1	36%±3	24%±2	37%±4
M+CTX	44%±6	21%±3	35%±6	44%±1	21%±3	34%±2	37%±4	23%±4	38%±3
M+PD	53%±8	16%±1	32%±6	48%±2	16%±1	34%±1	43%±1	18%±4	36%±4
M+PD+CTX	55%±4	14%±0	32%±6	47%±3	17%±3	36%±1	46%±4	19%±6	33%±2
M+LY	44%±4	13%±2	44%±3	32%±7	13%±3	54%±6	32%±2	21%±3	45%±7
M+LY+CTX	44%±6	13%±2	43%±3	34%±6	16%±3	46%±6	33%±6	21%±1	45%±9

Tabella E. Sono riportati i valori ottenuti dalla media di tutti gli esperimenti relativi alle cellule K13. Si riporta la media e le deviazioni standard della percentuale di cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento ottenuti per ciascun campione in triplicato, per i quattro esperimenti, analizzando i dati mediante il software BD FACSDiva.

Nelle Figure 38 e 39 sono mostrati gli istogrammi rappresentativi delle analisi presentate in Tabella E, che riportano la media dei valori medi della percentuale di cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare, ottenuti dai quattro esperimenti condotti.

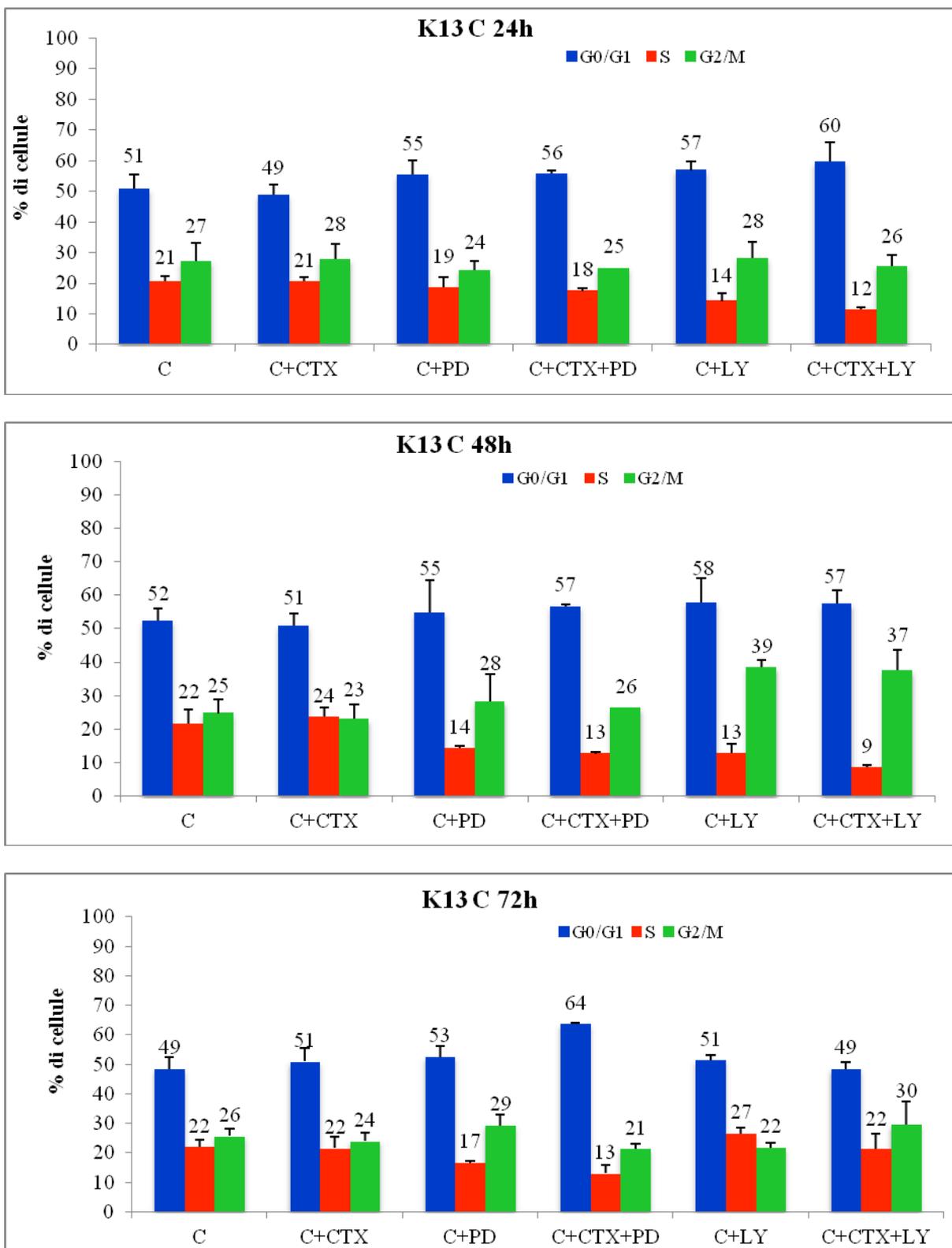


Figura 38. Rappresentazione grafica della media di tutti gli esperimenti condotti per le cellule K13 C. Sono riportati i valori espressi in percentuale di cellule presenti nelle singole fasi del ciclo cellulare, per gli esperimenti a 24, 48 e a 72 ore.

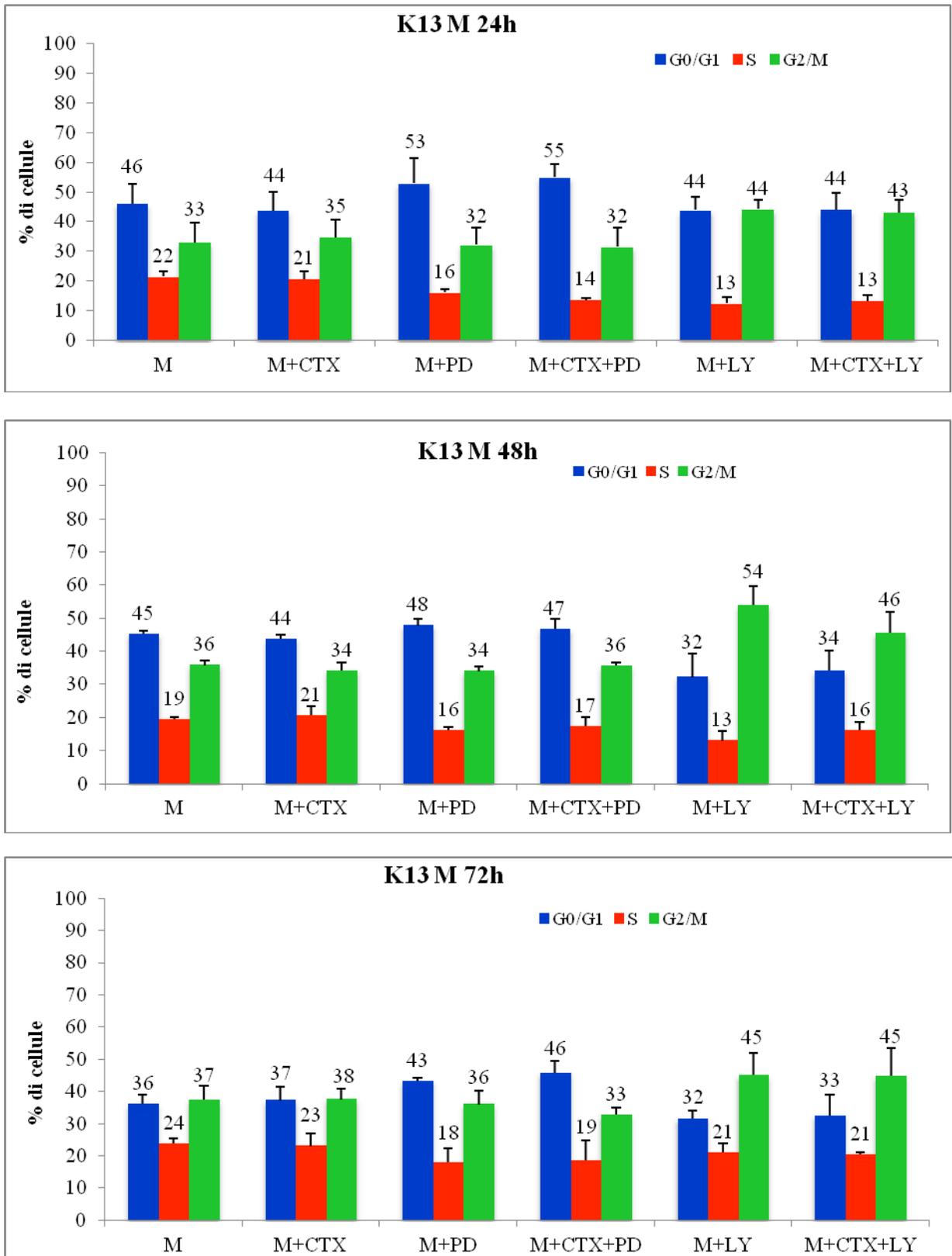


Figura 39. Rappresentazione grafica della media di tutti gli esperimenti condotti per le cellule K13 M. Sono riportati i valori espressi in percentuale di cellule presenti nelle singole fasi del ciclo cellulare, per gli esperimenti a 24, 48 e a 72 ore.

In Tabella F sono riportate, la percentuale media delle cellule C e delle cellule M nelle varie fasi del ciclo cellulare, per i campioni trattati con Cetuximab e/o PD e/o LY, l’aumento o la riduzione della percentuale media di cellule nella corrispondente fase del ciclo.

TABELLA F

	24h			48h			72h		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
C	51%	21%	27%	52%	22%	25%	49%	22%	26%
C+CTX	-2	0	+1	-1	+2	-2	+2	0	-2
C+PD	+4	-2	-3	+3	-8	+3	4	-5	+3
C+PD+CTX	+5	-4	-2	+5	-9	+1	+15	-9	-5
C+LY	+6	-7	+1	+6	-9	+14	+2	+5	-4
C+LY+CTX	+9	-10	-2	+5	-14	+12	-1	-1	+4
	24h			48h			72h		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
M	46%	22%	33%	45%	19%	36%	36%	24%	37%
M+CTX	-2	-1	+2	-1	2	-2	+1	-1	+1
M+PD	+7	-6	-1	+3	-3	-2	+7	-6	-1
M+PD+CTX	+9	-8	-2	+2	-2	0	+10	-5	-4
M+LY	-2	-10	+11	-13	-6	+18	-4	-3	+8
M+LY+CTX	-2	-9	+10	-11	-3	+10	-4	-4	+8

Tabella F. Sono riportate la percentuale di cellule K13 controllo (C) per ogni fase del ciclo cellulare e le differenze, per ogni fase del ciclo cellulare, tra le medie della percentuale di cellule sottoposte ai diversi trattamenti per 24, 48 e 72 ore e quella del campione C. Nella parte in basso della Tabella sono riportate la percentuale di cellule K13 indotte (M) per ogni fase del ciclo cellulare e le differenze, per ogni fase del ciclo cellulare, tra le medie della percentuale di cellule sottoposte ai diversi trattamenti per 24, 48 e 72 ore e quella del campione M.

Dall’analisi dei dati si evidenzia che il Cetuximab non sembra influenzare significativamente il ciclo cellulare delle cellule K13 che siano esse indotte o meno ad esprimere l’isoforma mutata di K-RAS. Per quanto riguarda le cellule C alle 24 ore, l’inibitore LY sembra indurre un aumento in fase G₀/G₁, con riduzione della percentuale di cellule in fase S, soprattutto alle 24 ore. Il trattamento con LY potenzia l’effetto del Cetuximab, che da solo non modifica la distribuzione delle cellule nel ciclo cellulare. Dopo 48 ore di trattamento, l’inibitore LY induce, invece, un aumento delle cellule in fase G₂/M ed una ulteriore riduzione della percentuale di cellule in fase S. Il PD sembra ridurre la percentuale di cellule in fase S soprattutto alle 48 ore, effetto analogo e leggermente aumentato per il campione C+CTX+PD. In quest’ultimo caso si evidenzia, inoltre, un significativo aumento delle cellule in fase G₀/G₁

alle 72 ore. Un effetto simile del PD si riscontra nelle cellule indotte. Nelle cellule indotte l'inibitore LY provoca, invece, un accumulo di cellule in fase G₂/M ed una riduzione in fase S alle 24 ore, e ulteriore aumento delle cellule in G₂/M e riduzione in fase G₀/G₁ dopo 48 ore. Il trattamento contemporaneo con Cetuximab ad LY provoca un blocco delle cellule in fase G₂/M, inferiore a quello che si evidenzia con il solo inibitore, ma nettamente superiore a quello che si osserva con il solo farmaco. Il Cetuximab sembra attenuare un pò tale effetto.

I risultati ottenuti dagli esperimenti condotti sulle cellule K12 e K13 indotte ad esprimere diverse isoforme mutate di KRAS sembrano, quindi, supportare l'ipotesi secondo cui mutazioni diverse di K-RAS influenzino in maniera differente la risposta delle cellule al trattamento con Cetuximab. In particolare questi risultati mostrano come la mutazione di K-RAS nel codone 13 renda le cellule sensibili al trattamento con questo farmaco, effetto visibile sia in termini di proliferazione, di vitalità e di blocco del ciclo cellulare. Inoltre, si può evidenziare per entrambe le linee cellulari come inibendo il pathway delle MAPK queste siano maggiormente sensibili all'effetto del farmaco.

5.3. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI PROTEINE COINVOLTE NELLA REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE IN CELLULE HT-29 DOPO TRATTAMENTI CON CETUXIMAB E/ O LY294002, E/O PD98059

Dopo avere effettuato le analisi sul ciclo cellulare delle cellule HT-29 e dei cloni K12 e K13 C e indotti (M), 24 e 48 ore dopo il trattamento con il Cetuximab e/o l'inibitore LY e/o l'inibitore PD ho effettuato saggi Western Blot per analizzare i livelli di espressione della proteina p21, coinvolta nel controllo del ciclo cellulare, e di proteine che direttamente o indirettamente ne regolano l'espressione, quale la proteina *tumor suppressor* p53 (totale e fosforilata in Serina392, indice di attivazione) ed il suo inibitore MDM2. I saggi sono stati condotti sui lisati preparati dagli stessi campioni da cui erano state prelevate le aliquote per condurre i saggi di proliferazione, di vitalità e le analisi citofluorimetriche.

In Figura 40 sono riportati i risultati ottenuti da un singolo saggio Western Blot condotto sui campioni HT-29 C e trattati con Cetuximab e/o l'inibitore PD e/o l'inibitore LY per 24 e 48 ore.

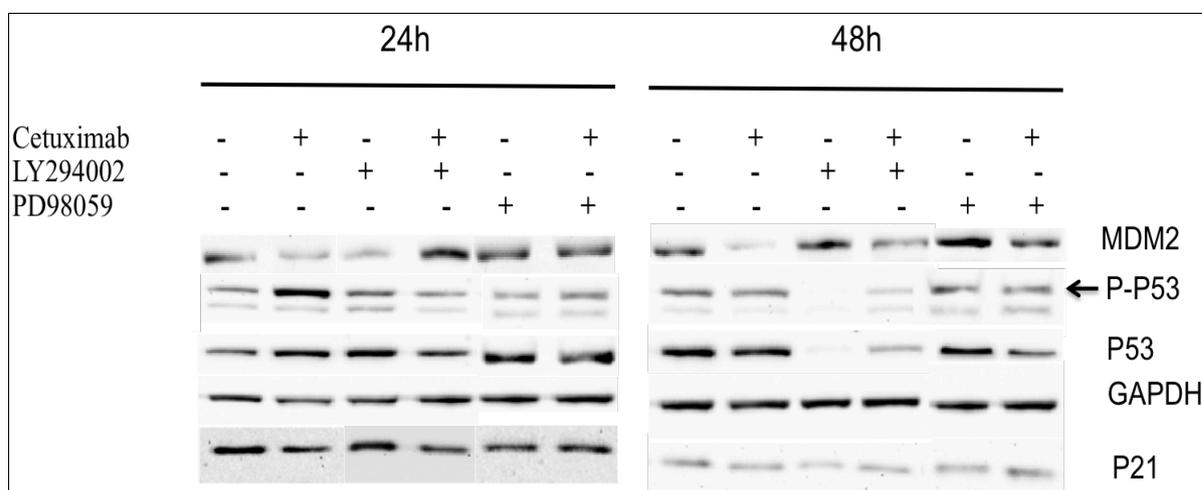


Figura 40. Saggi Western Blot condotti sulle cellule HT-29 per analizzare l'espressione delle proteine MDM2, p-p-53, p53 e p21 dopo 24 e 48 ore di trattamento con Cetuximab e/o LY e/o PD. La proteina GAPDH è stata utilizzata per normalizzare il caricamento. I filtri sono stati incubati con anticorpi secondari coniugati con HRP e sviluppati con Immun-Star WesternC Chemiluminescent kit.

In Figura 41 sono rappresentati gli istogrammi ottenuti riportando la media dei valori di intensità delle bande ottenuti in tre esperimenti effettuati in maniera indipendente tra loro.

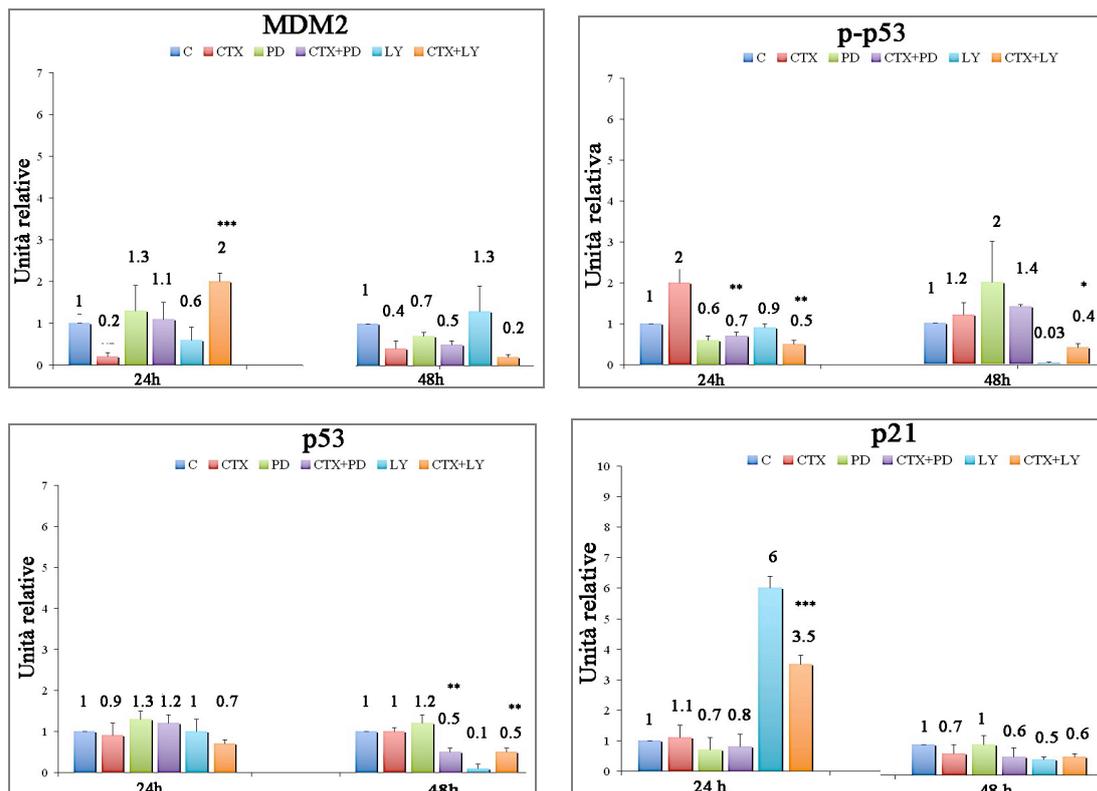


Figura 41. Rappresentazione grafica dell’espressione delle proteine indicate in cellule HT-29 controllo (C), e trattate con Cetuximab (CTX), trattate con l’inibitore PD o LY (LY o PD) e trattate con Cetuximab+inibitore PD o LY (CTX+PD o CTX+LY) a 24 e 48 ore. I livelli delle proteine sono normalizzati rispetto ai livelli della GAPDH per ciascun campione e indicati come percentuale dell’espressione nel campione controllo posto uguale ad 1. Gli istogrammi sono stati realizzati con il programma Microsoft Office Excel (2007) e rappresentano la media di 3 esperimenti. Il p value dei campioni trattati con il farmaco più gli inibitori delle 24 ore è calcolato in rapporto con il campione trattato con il solo Cetuximab delle 24 ore, e lo stesso per i campioni trattati alle 48 ore. *** $p \leq 0.0005$; ** $p \leq 0.005$; * $p \leq 0.05$.

In Tabella G sono riportate, la media della percentuale dei livelli di espressione delle singole proteine nel campione controllo (C) posto uguale ad 1 e per i campioni trattati con Cetuximab, con Cetuximab e PD, con Cetuximab e LY, l’aumento o la riduzione media della percentuale dell’espressione delle singole proteine

TABELLA G

	24h				48h			
	MDM2	p-p53	p53	p21	MDM2	p-p53	p53	p21
C	1	1	1	1	1	1	1	1
CTX	-0.8	+1	-0.1	+0,1	-0.6	+0.2	0	-0.3
PD+CTX	+0.1	+0.2	+0.2	+0.1	-0.5	+0.4	-0.5	-0.4
LY+CTX	+1	-0.5	-0.3	+1.5	-0.8	-0.6	-0.5	-0.4

Tabella G. Sono riportate la percentuale dei livelli di espressione delle proteine indicate poste pari a 1 per i campioni controllo (C) e per i campioni sottoposti ai diversi trattamenti le differenze tra le medie della percentuale dei livelli di espressione delle stesse proteine.

Dall'analisi di questi risultati si rileva che il trattamento con Cetuximab provoca invece un significativo decremento del livello di MDM2, inibitore di p53, soprattutto alle 24 ore. L'inibitore PD a 24 ore non sembra avere particolare effetto quando somministrato da solo ma annulla l'effetto del Cetuximab. Il livello di MDM2 è, invece, significativamente ridotto, sia nel campione trattato con PD che nel campione trattato con PD e Cetuximab per 48 ore. L'inibitore LY, invece, sembra provocare una riduzione a 24 ore sui livelli proteici ma non sembra avere effetti significativi a 48 ore. Il trattamento contemporaneamente con il Cetuximab provoca invece un drastico aumento dell'inibitore MDM2 a 24 ore, effetto fortemente contrastato alle 48 ore in cui si ha una significativa riduzione nei livelli della proteina.

Il trattamento con Cetuximab sembra, invece, provocare un aumento della proteina p53 nella sua forma attiva, fosforilata (p-p53) alle 24 ore di trattamento. Questo aumento è contrastato dal trattamento delle cellule contemporaneamente con Cetuximab e l'inibitore PD. Quest'ultimo sembra ridurre i livelli di p-p53 alle 24 ore e provocarne un aumento, invece, alle 48 ore. L'aumento di p-p53 provocato dal solo Cetuximab, alle 24 ore di trattamento, risulta contrastato dal trattamento delle cellule contemporaneamente con Cetuximab ed inibitore LY, nel qual caso il livello di p-p53 è addirittura dimezzato rispetto a quello osservato nei campioni C e LY.

Non sembra esserci effetto rilevante del Cetuximab, invece, sull'espressione della proteina p53. Anche l'inibitore PD non sembra avere particolare effetto sui livelli di questa proteina, che sono invece leggermente incrementati nelle cellule trattate sia con Cetuximab che con PD per 24 ore, e invece dimezzati dopo 48 ore. L'inibitore LY sembra, invece, provocare una notevole riduzione del livello di p53 a 48 ore. I campioni LY+CTX mostrano una leggera riduzione alle 24 ore, ma un sostanziale aumento alle 48 ore dei livelli della proteina rispetto ai campioni LY.

I livelli della proteina p21, target di p53, non sembrano subire particolari effetti da parte del Cetuximab se non una lieve riduzione alle 48 ore. L'inibitore PD sembra provocare una lieve riduzione dei livelli di questa proteina, solo alle 24 ore. I campioni PD+CTX mostrano invece una leggera riduzione alle 24 ore ed una riduzione maggiore alle 48 ore. L'inibitore LY provoca, invece, un sostanziale aumento dei livelli di p21 alle 24 ore di trattamento ed una riduzione alle 48 ore. L'aggiunta dell'LY al Cetuximab, rispetto al solo farmaco, determina un significativo aumento nei livelli di p21

I dati ottenuti in precedenza avremo hanno dimostrato che non vi è un effetto significativo del Cetuximab sul ciclo cellulare di queste cellule, ma i risultati di questi saggi Western Blot hanno messo in evidenza un suo possibile ruolo nell'espressione della proteina p21, e di altre proteine coinvolte in maniera diretta o indiretta nella sua regolazione come MDM2, p-p53 e p53. Il Cetuximab, infatti, influenza i livelli di espressione delle diverse proteine analizzate; effetto contrastato o potenziato dai due inibitori. I risultati ottenuti mostrano come questo farmaco riduca significativamente i livelli della proteina MDM2 ed aumenti i livelli di p-p53 soprattutto alle 24 ore di trattamento, ma i due inibitori agiscono contrastandone l'azione. Inoltre il farmaco non sembra avere particolare effetto sull'espressione delle proteine p53 e p21, laddove invece l'uso dell'inibitore PD nei campioni trattati con il farmaco induce un aumento dei livelli di p53 soprattutto alle 24 ore. L'inibitore LY influenza l'effetto del Cetuximab sui livelli di p21 soprattutto alle 24 ore.

5.4. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI PROTEINE COINVOLTE NELLA REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE IN CELLULE K12 DOPO TRATTAMENTI CON CETUXIMAB E/O LY294002, E/O PD98059

Ho valutato l'espressione delle diverse proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare anche per il clone K12, 24 e 48 ore dopo il trattamento con Cetuximab e/o l'inibitore LY e/o l'inibitore PD, in presenza o assenza di Mifepristone. Anche in questo caso sono stati condotti saggi Western Blot.

In Figura 42 sono riportati i risultati ottenuti da un singolo saggio Western Blot condotto sui campioni K12 controllo (C) e indotti con Mifepristone (M), trattati con Cetuximab e/o l'inibitore PD e/o l'inibitore LY dopo 24 e 48 ore di trattamento.

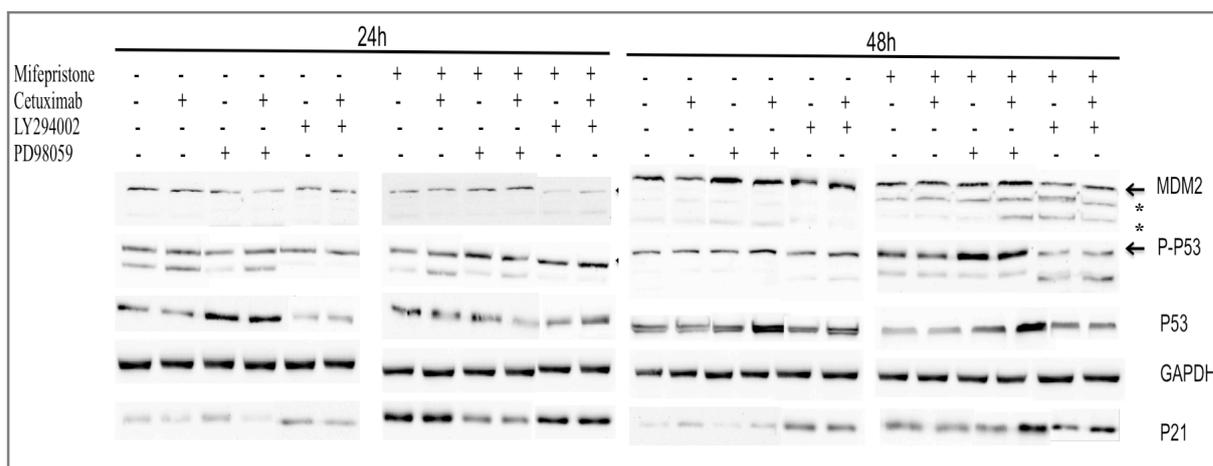


Figura 42. Saggi Western Blot condotti sulle cellule K12 per analizzare l'espressione delle proteine MDM2, p-p53, p53 e p21 dopo 24 e 48 ore di trattamento in cellule indotte (M) e non (C) con Cetuximab e/o LY e/o PD. La proteina GAPDH è stata utilizzata per normalizzare il caricamento. I filtri sono stati incubati con anticorpi secondari coniugati con HRP e sviluppati con Immun-Star WesternC Chemiluminescent kit.

* indicano le diverse isoforme di MDM2 (Rosso et al., 2014).

In Figura 43 sono rappresentati gli istogrammi ottenuti riportando la media dei valori ottenuti da tre esperimenti effettuati in maniera indipendente tra loro.

K12 C

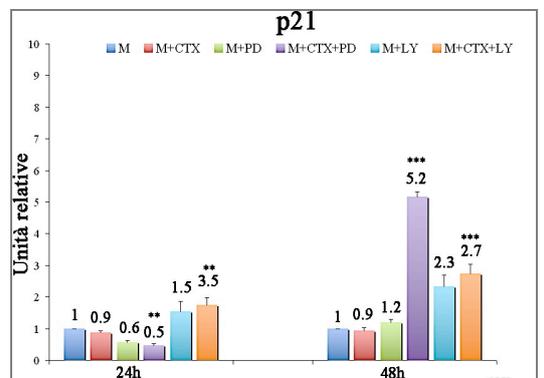
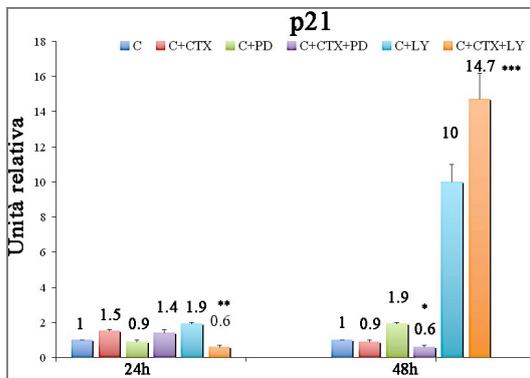
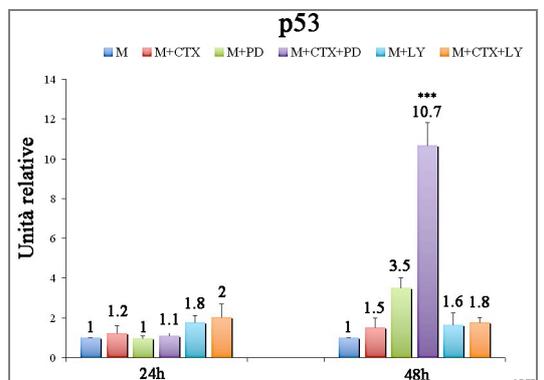
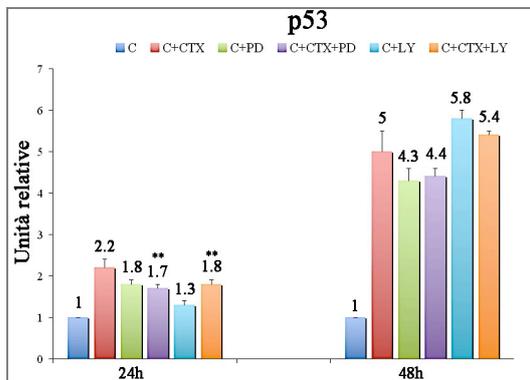
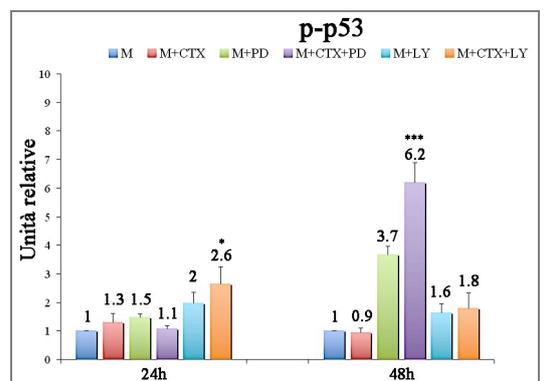
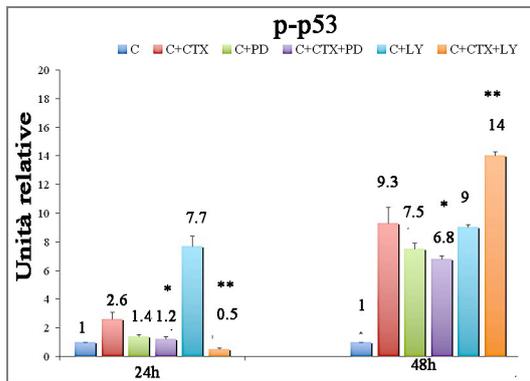
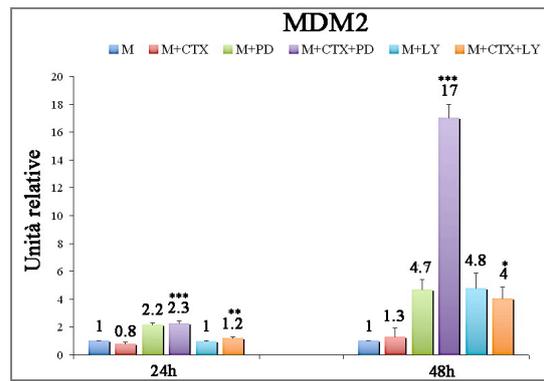
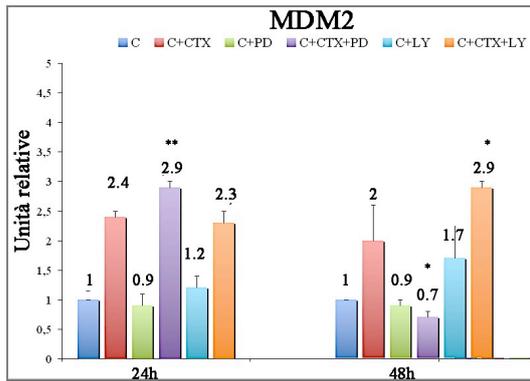


Figura 43. Rappresentazione grafica dell’espressione delle proteine indicate, in cellule K12, a 24 (blu) e 48 (rosso) ore. A *sinistra* gli istogrammi relativi alle cellule K12 controllo (C) e trattate; a *destra* quelle indotte (M) e trattate come descritto nel testo ed in figura. I livelli delle proteine sono normalizzati rispetto ai livelli della GAPDH per ciascun campione e indicati come percentuale dell’espressione nel campione controllo posto uguale a 1. Gli istogrammi sono stati realizzati con il programma Microsoft Office Excel (2007) e rappresentano la media di tre esperimenti. il p value dei campioni trattati con il farmaco più gli inibitori delle 24 ore è calcolato in rapporto con il campione trattato con il solo Cetuximab delle 24 ore, e lo stesso per i campioni trattati alle 48 ore. ***p ≤ 0.0005; **p ≤ 0.005; *p ≤ 0.05.

In Tabella H sono riportate, la media della percentuale dei livelli di espressione delle singole proteine posto uguale ad 1 nel campione controllo (C) e (M), per i campioni trattati con Cetuximab, con Cetuximab più PD e con Cetuximab più LY, l’aumento o la riduzione media della percentuale dell’espressione delle singole proteine.

TABELLA H

	24h				48h			
	MDM2	p-p53	p53	p21	MDM2	p-p53	p53	p21
C	1	1	1	1	1	1	1	1
C+CTX	+1.4	+1.6	+1.2	+0.5	+1	+8.3	+4	-0.1
C+PD+CTX	+1.9	+0.2	+0.7	+0.4	-0.3	+5.8	+3.4	-0.4
C+LY+CTX	+1.3	-0.5	+0.8	-0.4	+1.9	+13	+4.4	+13.7
	24h				48h			
	MDM2	p-p53	p53	p21	MDM2	p-p53	p53	p21
M	1	1	1	1	1	1	1	1
M+CTX	-0.2	+0.3	+0.2	-0.1	+0.3	-0.9	+0.5	-0.1
M+PD+CTX	+1.3	+0.1	+0.1	-0.5	+16	+5.2	+9,7	+4.2
M+LY+CTX	+0.2	+1.6	+1	+2.5	+3	+0.8	+0.8	+1.7

Tabella H. Sono riportate la percentuale dei livelli di espressione delle proteine indicate poste pari a 1 per i campioni K12 controllo (C) e M; per i campioni sottoposti ai diversi trattamenti le differenze tra le medie della percentuale dei livelli di espressione delle stesse proteine.

L’analisi dei dati ottenuti, per le cellule K12 C, mostra che il Cetuximab provoca un aumento dei livelli di MDM2 in queste cellule sia alle 24 ore, che alle 48 ore. L’inibitore PD sembra non avere particolare effetto sui livelli di MDM2 né alle 24 ore né alle 48 ore ma influenza l’azione del farmaco. Il trattamento simultaneo con Cetuximab e PD provoca una riduzione dei livelli di MDM2 rispetto al trattamento con il solo Cetuximab. L’inibitore LY sembra, anch’esso provocare un aumento dei livelli di MDM2 in queste cellule, e potenzia l’effetto del Cetuximab a 48 ore.

Nelle cellule K12 M, indotte ad esprimere la mutazione K-RAS, sembra che il Cetuximab non abbia particolare effetti sui livelli di MDM2, anche se a 48 ore sembra indurre un lieve aumento dei livelli di questa proteina. Anche in questo caso l'inibitore PD ne aumenta i livelli già a 24 ore e ancora di più alle 48 ore, quando potenzia l'azione del Cetuximab (campioni M+CTX+PD). In questo caso l'inibitore LY sembra provocare un aumento dei livelli di MDM2 sempre alle 48 ore di trattamento, effetto simile si ha dopo trattamento simultaneo con Cetuximab.

I livelli di p-p53 subiscono un aumento in cellule K12 C trattate con Cetuximab, soprattutto alle 48 ore, effetto parzialmente contrastato dall'aggiunta di PD (C+CTX+PD), sia alle 24 ore che alle 48 ore di trattamento. Effetto diverso ha l'inibitore LY che di per sé provoca un aumento dei livelli di p-p53, soprattutto alle 48 ore e potenzia l'effetto del Cetuximab alle 48 ore di trattamento ma lo contrasta alle 24 ore.

Nelle cellule K12 M il Cetuximab sembra provocare un lieve aumento dei livelli di p-p53 alle 24 ore ma nessun particolare effetto alle 48 ore di trattamento. Anche in questo caso l'inibitore PD provoca un aumento dei livelli di p-p53 ma soprattutto alle 48 ore, e l'aumento è maggiore nelle cellule trattate anche con il farmaco (M+CTX+PD). L'inibitore LY provoca un leggero aumento dei livelli di p-p53, soprattutto alle 24 ore, aumento che risulta leggermente potenziato nei campioni M+CTX+LY.

Per quanto riguarda le analisi dei livelli di p53, si evidenzia un aumento soprattutto dopo 48 ore, quando le cellule K12 C erano trattate con Cetuximab, effetto mitigato dall'inibitore PD. L'inibitore LY provoca una riduzione dei livelli di p53 alle 24 ore e sembra provocare un aumento alle 48 ore; l'inibitore LY riduce l'effetto del Cetuximab alle 24 ore, e lo potenzia parzialmente alle 48 ore di trattamento (campioni C+CTX+LY).

Nelle cellule K12 M, il Cetuximab provoca un lieve aumento dei livelli di p53 soprattutto alle 48 ore di trattamento, effetto che risulta potenziato dal trattamento simultaneo con Cetuximab e l'inibitore PD. Anche l'inibitore LY potenzia lievemente l'effetto del Cetuximab (M+CTX+LY).

Sui livelli della proteina p21 nelle cellule K12 C sembra esserci un leggero effetto da parte del farmaco, il quale provoca un aumento alle 24 ore di trattamento e non sembra esserci effetto alle 48 ore. L'effetto del Cetuximab alle 24 ore non sembra essere influenzato dagli inibitori (C+CTX+PD). Al contrario alle 48 ore il trattamento simultaneo con Cetuximab più inibitore PD provoca una riduzione dei livelli di p21. Il trattamento con Cetuximab e LY provoca invece un notevole aumento dei livelli di questa proteina alle 48 ore (C+CTX+LY).

In cellule K12 M non si rilevano particolari effetti del Cetuximab sui livelli di p21. Il trattamento contemporaneo con Cetuximab e PD provoca una riduzione dei livelli di p21 alle 24 ore e invece un elevato aumento dei suoi livelli alle 48 ore. Il trattamento con Cetuximab associato all'inibitore LY provoca, in questo caso un aumento dei livelli di p21 sia alle 24 che alle 48 ore di trattamento (M+CTX+LY).

Quindi sebbene non si fosse osservato un effetto rilevante del farmaco sul ciclo cellulare delle cellule K12 C risulta esserci un effetto sulla proteina p21 e sulle proteine che lo regolano p-p53, p53 e MDM2. In queste cellule, infatti, si evidenzia come il farmaco induca un aumento dei livelli soprattutto delle proteine MDM2, p-p53 e p21 sia alle 24 ore che alle 48 ore di trattamento, effetto che risulta potenziato nel momento in cui si inibisce la via delle MAPK con il PD, mentre risposte diverse si hanno inibendo la via della PI3K.

L'induzione della mutazione K-RASG12V sembra fare perdere gli effetti del farmaco; questo, infatti, non sembra avere minore effetto sulle proteine MDM2, p53 p-p53 e p21 anche in questo caso sembra influenzato dall'azione degli inibitori.

5.5. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI PROTEINE COINVOLTE NELLA REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE IN CELLULE K13 DOPO TRATTAMENTI CON CETUXIMAB E/O LY294002, E/O PD98059

Anche per le cellule K13 ho valutato l'espressione delle diverse proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, 24 e 48 ore dopo il trattamento con Cetuximab e/o l'inibitore LY e/o l'inibitore PD, in presenza o assenza di Mifepristone. Allo scopo di evidenziare se mutazioni diverse in K-RAS provochino una risposta diversa al farmaco sia da solo che in associazione con gli inibitori dei pathway PI3K e MAPK rispettivamente.

In Figura 44 sono, riportati i risultati ottenuti da un singolo saggio Western Blot condotto sui campioni K13 controllo (C) e indotti con Mifepristone (M), trattati con Cetuximab ed i due inibitori dopo 24 e 48 ore di trattamento.

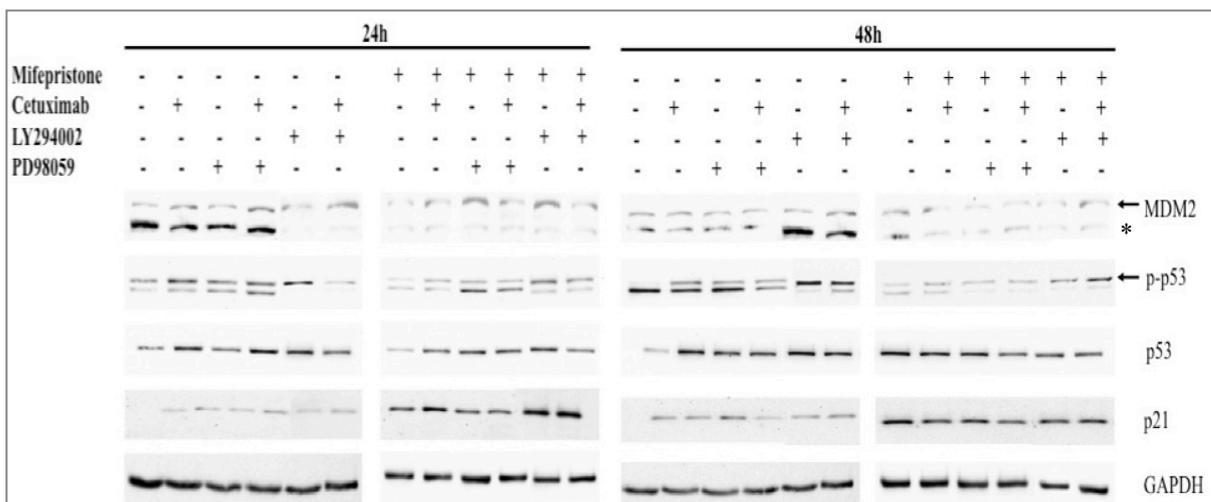


Figura 44. Saggi Western Blot condotti sulle cellule K13 per analizzare l'espressione delle proteine MDM2, p-p53, p53 e p21 dopo 24 e 48 ore di trattamento in cellule indotte (M) e non (C) con Cetuximab e/o LY e/o PD. La proteina GAPDH è stata utilizzata per normalizzare il caricamento. I filtri sono stati incubati con anticorpi secondari coniugati con HRP e sviluppati con Immun-Star WesternC Chemiluminescent kit.

* indicano le diverse isoforme di MDM2 (Rosso et al., 2014).

In Figura 45 sono rappresentati gli istogrammi costruiti riportando la media dei valori ottenuti in due esperimenti effettuati ed in maniera indipendente tra loro.

K13 C

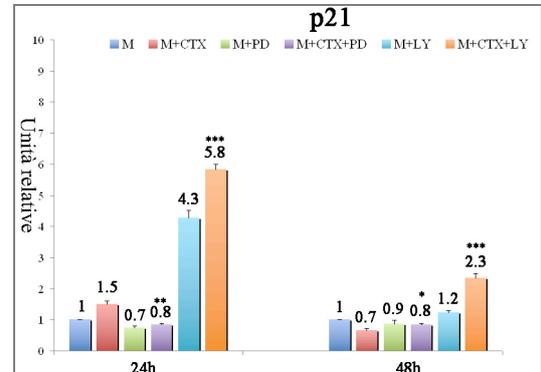
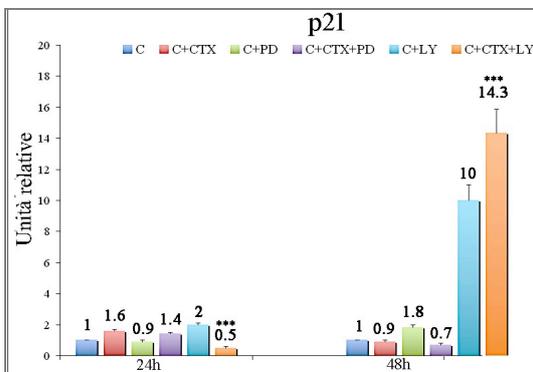
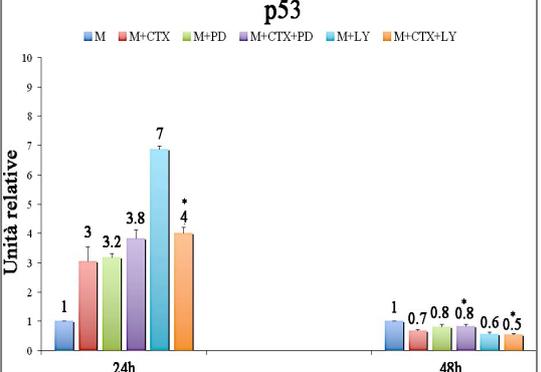
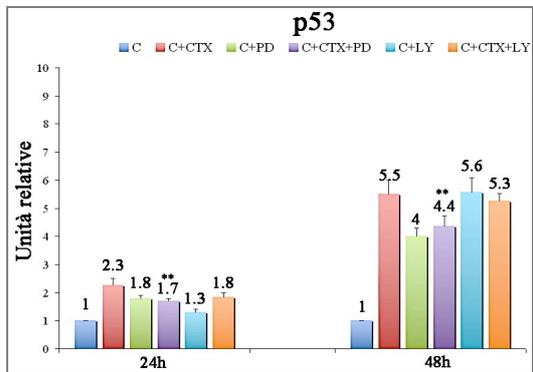
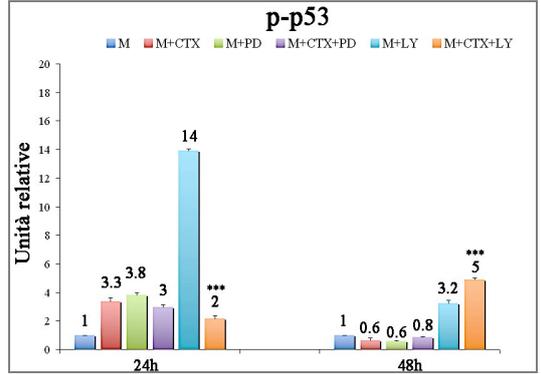
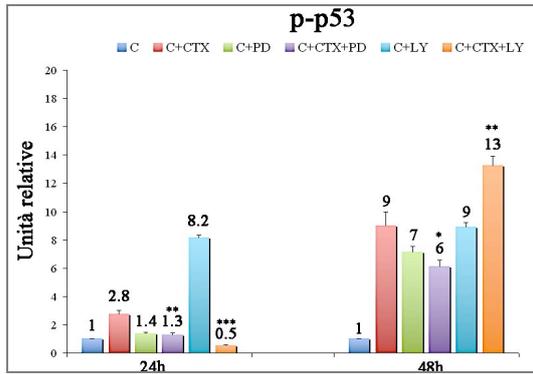
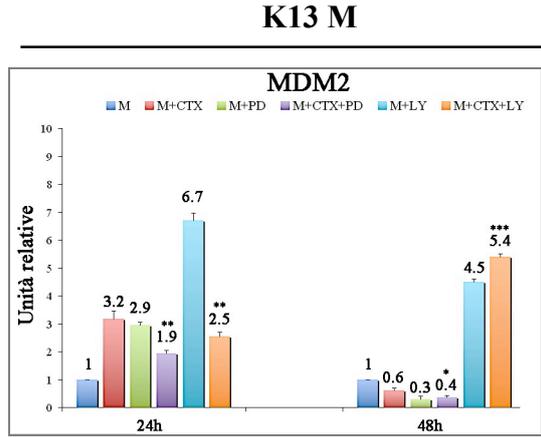
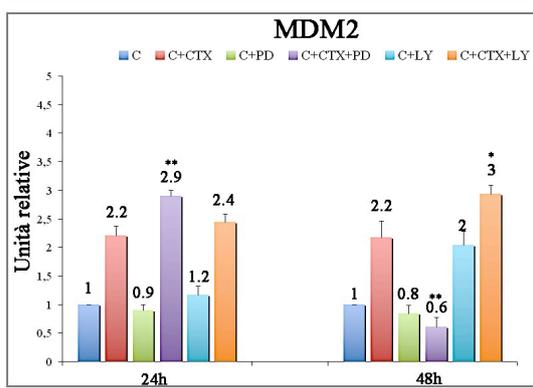


Figura 45. Rappresentazione grafica dell’espressione delle proteine indicate, in cellule K13, a 24 (blu) e 48 (rosso) ore. A *sinistra* gli istogrammi relativi alle cellule K13 controllo (C) e trattate; a *destra* quelle indotte (M) e trattate come descritto nel testo ed in figura. I livelli delle proteine sono normalizzati rispetto ai livelli della GAPDH per ciascun campione e indicati come percentuale dell’espressione nel campione controllo posto uguale a 1. Gli istogrammi sono stati realizzati con il programma Microsoft Office Excel (2007) e rappresentano la media di due esperimenti. Il p value dei campioni trattati con il farmaco più gli inibitori delle 24 ore è calcolato in rapporto con il campione trattato con il solo Cetuximab delle 24 ore, e lo stesso per i campioni trattati alle 48 ore. *** $p \leq 0.005$; ** $p \leq 0.005$; * $p \leq 0.5$.

In Tabella I sono riportate, la media della percentuale dei livelli di espressione delle singole proteine posto uguale ad 1 nel campione controllo (C) e (M), per i campioni trattati con Cetuximab, con Cetuximab più PD e con Cetuximab più LY, l’aumento o la riduzione media della percentuale dell’espressione delle singole proteine.

TABELLA I

	24h				48h			
	MDM2	p-p53	p53	p21	MDM2	p-p53	p53	p21
C	1	1	1	1	1	1	1	1
C+CTX	+1.2	+1.8	+1.3	+0.6	+1	+8	+4.5	-0.1
C+PD+CTX	+1.9	+0.3	+0.7	+0.4	-0.4	+5.1	+3.4	-0.3
C+LY+CTX	+1.4	-0.5	+0.8	-0.5	+2	+12	+4.3	+12.3
	24h				48h			
	MDM2	p-p53	p53	p21	MDM2	p-p53	p53	p21
M	1	1	1	1	1	1	1	1
M+CTX	+2.2	+2.3	+2	+0.5	-0.4	0	-0.3	-0.3
M+PD+CTX	+0.9	+2	+2.8	-0.2	-0.6	-0.2	-0.2	-0.2
M+LY+CTX	+1.5	+1.2	+3	+4.8	+4.4	+3.9	-0.5	+1.3

Tabella I. Sono riportate la percentuale dei livelli di espressione delle proteine indicate poste pari a 1 per i campioni K13 controllo (C) e M, per i campioni sottoposti ai diversi trattamenti le differenze tra le medie della percentuale dei livelli di espressione delle stesse proteine

Dall’analisi dei dati ottenuti, per le cellule K13 C, si evidenzia che il Cetuximab provoca, in queste cellule, un aumento di MDM2 sia alle 24 che alle 48 ore. L’inibitore PD da solo non sembra avere particolare effetto sui livelli della proteina, laddove invece i campioni C+CTX+PD mostrano, un aumento dei livelli di MDM2 alle 24 ore di trattamento leggermente più elevato di quello causato dal solo Cetuximab, ed una riduzione dei livelli di questa proteina alle 48 ore. L’inibitore LY non sembra invece influenzare in modo significativo i livelli di MDM2 in queste cellule, alle 24 ore, ma ne provoca invece un

significativo aumento dopo 48 ore. Questo inibitore in associazione con il Cetuximab ne aumenta gli effetti sui livelli di questa proteina sia alle 24 che alle 48 ore di trattamento.

Nelle cellule K13 M, indotte ad esprimere la mutazione K-RAS, sembra che il Cetuximab provoca un significativo aumento dei livelli di MDM2 alle 24 ore di trattamento ed una sua successiva riduzione alle 48 ore. I campioni M+CTX+PD mostrano effetti simili a quelli provocati dai singoli trattamenti. L’inibitore LY, al contrario, sembra provocare un sostanziale aumento dei livelli di MDM2 per tutto il periodo di trattamento. Il trattamento contemporaneo delle cellule K13 indotte con il Cetuximab e l’inibitore della PI3K provoca invece una diminuzione di MDM2 alle 24 ore, per provocarne un aumento alle 48 ore.

Anche i livelli di p-p53 subiscono un aumento in cellule K13 C trattate con Cetuximab, soprattutto alle 48 ore, effetto mitigato dall’aggiunta di PD (C+CTX+PD), il quale da solo provoca comunque un incremento di p-p53. Effetto analogo ha l’inibitore LY che di per sé provoca un aumento dei livelli di p-p53. Il trattamento simultaneo delle cellule con LY e Cetuximab dimezza invece il livello di p-p53 alle 24 ore, provocando, invece, un notevole aumento alle 48 ore (campioni C+CTX+LY) maggiore di quello provocato da LY e Cetuximab somministrati singolarmente.

Nelle cellule K13 M il Cetuximab sembra provocare un aumento nei suoi livelli di p-p53 solo alle 24 ore. Effetto analogo ha l’inibitore PD, il quale, in questo caso, non sembra influenzare in maniera significativa l’azione del Cetuximab. Seppure l’LY provoca un aumento significativo nei livelli della forma attiva di p53 soprattutto alle 24 ore, il trattamento contemporaneo di Cetuximab ed LY provoca una riduzione di p-p53 alle 24 ore, rispetto al trattamento con il solo Cetuximab. Alle 48 ore, al contrario, si osserva un significativo aumento di p-p53.

Per quanto riguarda le analisi dei livelli di p53, si evidenzia un aumento soprattutto dopo 48 ore, in cellule K13 C trattate con Cetuximab, effetto parzialmente contrastato dall’inibitore PD. L’inibitore LY provoca un aumento dei livelli di p53 alle 24 e ancora più alle 48 ore; livelli analoghi si osservano nei campioni trattati con LY e Cetuximab.

Nelle cellule K13 M, il Cetuximab induce un aumento dei livelli di p53 già alle 24 ore, effetto che sembra potenziato dal PD (campioni M+CTX+PD). Il contemporaneo trattamento delle cellule K13 M con Cetuximab ed LY anche in questo caso provoca un aumento dei livelli di p53 alle 24 ore. A 48 ore, nelle cellule K13 M trattate con Cetuximab e PD, non si osservano differenze significative rispetto alle cellule trattate con il solo Cetuximab. Il trattamento

contemporaneo con Cetuximab ed LY provoca, invece, una riduzione del livello di p53 rispetto maggiore rispetto alle cellule trattate con solo Cetuximab.

In cellule K13 C non si rilevano particolari effetti del Cetuximab sui livelli di p21, se non un lieve aumento alle 24 ore, effetto che non è influenzato dall'inibitore PD (C+CTX+PD). Il trattamento simultaneo delle cellule con Cetuximab ed LY provoca una riduzione dei livelli di p21, alle 24 ore, maggiore di quella provocata dal solo Cetuximab. Il trattamento con Cetuximab associato con l'inibitore LY provoca, alle 48 ore, un aumento dei livelli di questa proteina, al contrario di quello che avviene con il solo Cetuximab.

Per quanto riguarda i livelli della proteina p21 nelle cellule K13 M sembra esserci un lieve effetto da parte del farmaco, il quale induce un leggero aumento alle 24 ore di trattamento. L'effetto del Cetuximab sembra influenzato dall'inibitore PD, il quale tende a ridurre lievemente i livelli di questa proteina (M+CTX+PD). L'effetto del Cetuximab risulta maggiore, provocando un elevato aumento dei livelli di p21 dopo 24 quando le cellule sono trattate anche con l'inibitore LY.

In cellule K13 C, quindi, sembra che il Cetuximab abbia l'effetto di indurre un aumento dei livelli delle diverse proteine sia alle 24 ore che alle 48 ore, aumento maggiore per le proteine p-p53 e p53 alle 48 ore. Questi effetti risultano maggiori nel momento in cui si inibiscono le vie della MAPK e di PI3K.

Nelle cellule indotte ad esprimere l'isoforma mutata K-RASG13D, sembra che l'induzione amplifichi gli effetti del Cetuximab sui livelli delle diverse proteine alle 24 ore e ne riduca gli effetti alle 48 ore. In queste cellule l'inibitore LY sembra potenziare gli effetti del Cetuximab su p53 e p21 contrastandolo invece su MDM2 e p-p53 alle 24 ore; anche alle 48 ore di trattamento sembra che questo inibitore contrasti l'effetto del Cetuximab sulle diverse proteine tranne che su p53. Inibendo, invece la via delle MAPK con il PD non si riscontrano particolari cambiamenti nell'azione del farmaco, su p53 e p-p53. Si ha, invece, un contrasto tra l'effetto del Cetuximab e quello del PD su p21 ed MDM2; il farmaco tende, infatti, ad aumentarne i livelli, mentre il PD tende a diminuirli.

6. CONCLUSIONI

Le mutazioni nei geni *ras* si verificano spesso nei primi stadi dello sviluppo tumorale a causa dell'importante ruolo che le proteine RAS (H-, K- e N-RAS) svolgono nella regolazione dei meccanismi di proliferazione e di morte cellulare. Nel cancro al colon, si verificano frequentemente alterazioni nel gene *k-ras*, come mutazioni puntiformi e *missense* ed interessano prevalentemente il codone 12 e/o 13. I residui amminoacidici (glicine) che corrispondono nella proteina a questi codoni, sporgono nel sito catalitico e sono importanti per l'attività GTPasica che viene ridotta o inibita rendendo la proteina RAS costitutivamente attiva quando, per effetto delle mutazioni, si ha una sostituzione amminoacidica. Tuttavia, dati statistici mostrano che pazienti con mutazioni differenti nella stessa isoforma di K-RAS, sviluppano un tumore più o meno aggressivo e hanno una maggiore o minore possibilità di andare incontro allo sviluppo di metastasi ed a recidive (Mulla et al., 1999).

I pazienti con CRC metastatico che hanno K-RAS mutato, nel codone 12 o 13, sono attualmente esclusi dalle terapie che prevedono l'uso del Cetuximab (Wicki et al., 2010). Tuttavia, *in vitro* e *in vivo* in modelli murini, hanno dimostrato che solo le cellule che portano la mutazione nel codone 12 sono refrattari a questo tipo di trattamento (Karapetis et al., 2008). Studi clinici recenti retrospettivi su pazienti con CRC metastatico, con mutazione in posizione 13 di K-RAS, hanno mostrato inoltre un aumento della sopravvivenza in seguito a trattamento con Cetuximab. Quindi, la mutazione nel codone 13 di K-RAS potrebbe essere considerata un biomarker predittivo della risposta all'anticorpo (De Roock et al., 2010).

Sulla base di tali osservazioni, scopo di questo progetto è stato studiare i meccanismi di risposta di cellule CRC caratterizzate da diverse mutazioni nelle stessa isoforma di RAS (K-RAS) al trattamento con il Cetuximab.

In particolare, gli esperimenti sono stati condotti utilizzando la linea cellulare HT-29 in cui K-RAS è wt, e due cloni derivati da essa, K12 e K13, in cui l'espressione di RAS mutata, K-RASG12V e K-RASG13D, è indotta con l'ormone Mifepristone.

Dai risultati ottenuti si riscontra una risposta differenziale delle diverse cellule al trattamento con Cetuximab.

In particolare si dimostra che il Cetuximab non ha effetto sulla proliferazione, sulla vitalità e sul ciclo cellulare delle cellule HT-29, non essendoci quasi alcuna differenza significativa tra il campione controllo C ed il campione trattato CTX. Questo risultato porterebbe ad ipotizzare che lo stato mutazionale di K-RAS non debba essere considerato come unico biomarker negativo della risposta a questo tipo di terapia. Le cellule HT-29, infatti, non hanno mutazioni a livello di K-RAS ma sono caratterizzate dall'aver mutazioni in BRAF, ed in particolare la

mutazione V600E. Mutazioni a livello di BRAF, in particolare la mutazione nella valina in posizione 600 (V600E), ricorrono nel 7% dei tumori umani, di cui il 20% sono rappresentati da CRC (Davies et al., 2002). BRAF è una proteina chinasi attivata in risposta a segnali mitogenici attraverso la via di segnalazione attivata da RAS. La mutazione V600E porta ad un'attivazione costitutiva di BRAF con conseguente fosforilazione di MEK ed ERK e quindi un'attivazione continua del pathway delle MAPK in maniera RAS-indipendente (Wan et al., 2004). Nel CRC la mutazione di BRAF è associata con un decorso clinico negativo, infatti pazienti con tale mutazione riportano metastasi ed una mortalità superiore al 70% se paragonati a pazienti con CRC caratterizzati da BRAF wt (Hutchins et al., 2011).

Sulla base di questi dati di letteratura, ho quindi voluto valutare se nella resistenza delle HT-29 al trattamento con Cetuximab fossero implicati specifici pathway molecolari, in particolare la via della PI3K ed il pathway di RAS. A questo scopo ho condotto degli esperimenti inibendo il pathway delle MAPK a valle di RAS, attraverso l'inibitore PD98059 (PD, inibitore delle MEK1-2), e inibendo la PI3K attraverso l'inibitore LY294002 (LY). I risultati ottenuti rivelano che i due inibitori influenzano l'effetto che il farmaco ha sulla proliferazione, sulla vitalità delle cellule HT-29 e sulla loro distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare. In particolare, il PD sembra sensibilizzare le cellule alle 24 ore di trattamento con Cetuximab provocando un blocco della proliferazione ed una maggiore mortalità (Figura 25); inoltre, si evidenzia come questo inibitore provochi un accumulo delle cellule trattate con il farmaco in fase G₀/G₁ e con una conseguente riduzione della percentuale di cellule in fase S del ciclo cellulare (campioni CTX+PD) (Figura 27). Il simultaneo trattamento delle cellule con Cetuximab e con l'inibitore LY, provoca un significativo incremento della mortalità (Figura 25), senza particolari effetti sulla loro distribuzione nelle varie fasi del ciclo cellulare.

L'inibizione della via delle MAPK sembra quindi che influenzi l'azione del Cetuximab soprattutto sul ciclo cellulare provocando un blocco in fase G₀/G₁ delle cellule alle 24 e 48 ore di trattamento; l'inibizione della via della PI3K invece influenza l'azione del farmaco sulla proliferazione e sulla vitalità cellulare, inducendo una maggiore mortalità cellulare.

Gli esperimenti relativi alle cellule K12 e K13 mostrano che, in seguito ad induzione delle due differenti isoforme mutate di K-RAS, queste cellule rispondono in modo diverso al trattamento con Cetuximab.

Come già osservato in studi precedenti, l'induzione dell'espressione di K-RASG12V provoca di per se un modesto rallentamento del tasso di proliferazione rispetto alle cellule controllo (C) a 24, 48 e 72 ore (Figura 28); mentre l'espressione di K-RASG13D provoca, un blocco

della proliferazione e morte cellulare nelle prime 48 ore (Figura 34).

Il trattamento con Cetuximab non sembra avere alcun effetto sulla proliferazione, sulla vitalità e sulla distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare delle cellule K12 e K13 non indotte ad esprimere le isoforme mutate di K-RAS, come dimostrato dai saggi di vitalità e dalle analisi citofluorimetriche (Figure 28 e 32; Figure 34 e 38).

Gli esperimenti condotti su cellule K12 M, cioè indotte, ad esprimere l'isoforma K-RASG12V, dimostrano che queste cellule non risentono dell'effetto del Cetuximab sia in termini di proliferazione, di vitalità che di variazione del ciclo cellulare, se non un lieve blocco della proliferazione alle 24 ore di trattamento (Figure 28 e 33). I dati relativi agli esperimenti sulle cellule K13 M, indotte ad esprimere l'isoforma K-RASG13D, mostrano, invece, che queste cellule risentono dell'effetto del farmaco che provoca una ridotta proliferazione ed una progressiva mortalità per tutto l'intervallo di trattamento (Figura 34), ma non sono evidenti effetti significativi sul loro ciclo cellulare (Figura 39).

Risultati diversi per le cellule K12 e K13 sono stati ottenuti anche dopo inibizione delle vie della PI3K ed il pathway delle MAPK. Sulle cellule K12, sia controllo che indotte, l'inibizione di queste vie ha un effetto citotossico. Inoltre, l'inibizione del pathway delle MAPK con il PD sensibilizza le cellule K12 al trattamento con Cetuximab, soprattutto quando indotte ad esprimere l'isoforma K-RASG12V, provocando un blocco della proliferazione ed un'elevata mortalità alle 48 e 72 ore di trattamento (Figura 28 e 29). Al contrario di quanto avviene con il PD, il trattamento con LY e Cetuximab non ha effetti addizionali rispetto a quelli provocati dal solo inibitore della PI3K, LY, che di per sé induce mortalità e blocco della proliferazione (Figura 28 e 29).

Gli inibitori, PD ed LY, inoltre nelle cellule K12, indotte e non ad esprimere l'isoforma mutata di K-RAS, provocano un aumento delle cellule in fase G₀/G₁ con conseguente riduzione delle cellule in fase S, soprattutto a 24 e 48 ore di trattamento. In particolare, il trattamento contemporaneo del Cetuximab con l'inibitore PD aumenta gli effetti del farmaco, mentre l'LY non sembra avere nessun effetto sulla distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare (Figura 33).

Per quanto riguarda le cellule K13 C, il Cetuximab da solo non ha nessun effetto, un effetto citotossico si osserva invece quando al Cetuximab si associa l'inibitore PD. Un effetto citotossico, ma minore, si osserva anche con LY (Figura 34 e 35). L'induzione dell'espressione di K-RASG13D, oltre a sensibilizzare le cellule al trattamento con il farmaco, sembra renderle più sensibili anche al trattamento con i due inibitori. Il trattamento

contemporaneo delle cellule con Cetuximab più PD o LY riduce la vitalità rispetto al solo Cetuximab (Figura 34 e 35).

Dall'analisi dei dati citofluorimetrici si è evidenziato che anche se il Cetuximab non sembra influenzare il ciclo cellulare delle cellule K13, indotte o meno ad esprimere l'isoforma mutata di K-RAS, esso provoca degli effetti se somministrato insieme all'uno o all'altro inibitore. In particolare, nelle K13 C l'inibitore LY alle 24 ore induce un blocco in fase G_0/G_1 con riduzione della percentuale di cellule in fase S. Il PD invece ha un effetto analogo all'LY, ma con un'efficienza minore soprattutto alle 48 ore. Effetto simile del PD e del Cetuximab si riscontra nelle cellule indotte. In queste cellule, invece, l'LY provoca un accumulo di cellule in fase G_2/M ed una riduzione della fase S già alle 24 ore (Figura 38 e 39).

I risultati ottenuti dagli esperimenti condotti sulle cellule K12 e K13 indotte ad esprimere le diverse isoforme mutate di KRAS sembrano, quindi, supportare l'ipotesi secondo cui mutazioni diverse di K-RAS influenzino in maniera differente la risposta delle cellule al trattamento con il Cetuximab. In particolare, questi risultati mostrano come la mutazione di K-RAS nel codone 13 renda le cellule sensibili al trattamento con questo farmaco, effetto visibile soprattutto in termini di proliferazione, ma non distribuzione nelle fasi del ciclo cellulare.

Nonostante i dati citofluorimetrici ottenuti hanno dimostrato che non vi è un effetto significativo del Cetuximab sul ciclo cellulare delle diverse cellule, saggi Western Blot hanno messo in evidenza un suo possibile ruolo nell'espressione della proteina regolatrice del ciclo cellulare, p21, e di proteine coinvolte in maniera diretta o indiretta nella sua regolazione di, come p53, p-p53 ed MDM2.

Gli esperimenti di Western Blot condotti sui lisati cellulari di cellule HT-29 sottoposte a trattamenti con Cetuximab mostrano un suo effetto sui livelli di espressione delle diverse proteine. I risultati mostrano, infatti, come il farmaco riduca significativamente i livelli della proteina MDM2 ed aumenti i livelli di p-p53 (Figura 41) soprattutto alle 24 ore di trattamento, effetto più o meno contrastato dall'azione dei due inibitori. Il farmaco da solo, invece, non sembra avere particolare effetto sull'espressione delle proteine p53 e p21; ma in presenza dell'inibitore PD induce una riduzione di p53 alle 48 ore di trattamento. L'LY al contrario provoca un aumento significativo nei livelli di p21.

Dagli esperimenti condotti sui lisati cellulari di cellule K12 C, si evidenzia come il farmaco alle 48 ore di trattamento induca un aumento dei livelli di tutte le proteine analizzate. Tale effetto sulle proteine p-p53, p53 e p21 risulta contrastato nel momento in cui inibiamo la via

delle MAPK con il PD, ma su MDM2 risulta potenziato. Risposte variabili si hanno in base alla proteina presa in considerazione inibendo la via della PI3K (Figura 43).

L'induzione della mutazione K-RASG12V sembra fare perdere gli effetti del farmaco. Il Cetuximab da solo, infatti, non sembra avere alcun effetto significativo sui livelli di espressione delle proteine MDM2, p53, p-p53 e p21. In presenza di PD, invece, esso stimola notevolmente l'espressione di tutte e quattro le proteine, a 48 ore. Il trattamento contemporaneo con LY mostra un comportamento analogo al PD con l'unica differenza che i livelli di aumento sono minori.

In cellule K13 C il Cetuximab ha l'effetto di indurre un aumento dei livelli delle diverse proteine; l'aumento maggiore si osserva per le proteine p-p53 e p53 dopo 48 ore di trattamento anche in presenza di PD che, invece, sempre a 48 ore annulla l'effetto del farmaco su MDM2. L'inibizione di PI3K fa sì che il Cetuximab stimoli ancora di più l'espressione di p-p53, MDM2 (Figura 45).

Nelle cellule indotte ad esprimere l'isoforma mutata K-RASG13D, il Cetuximab ha degli effetti amplificati sui livelli delle diverse proteine alle 24 ore e ne riduce i livelli alle 48 ore. In queste cellule l'inibitore LY sembra potenziare gli effetti del Cetuximab su p21 contrastandoli invece su MDM2 e p-p53 alle 24 ore; anche alle 48 ore di trattamento sembra che questo inibitore contrasti l'effetto del Cetuximab sulle diverse proteine tranne che su p53. Inibendo, invece la via delle MAPK, con il PD, si ha un'attenuazione degli effetti del Cetuximab (Figura 45).

In conclusione possiamo dire che, dai risultati ottenuti in questo studio, cellule di CRC caratterizzate da un pattern di mutazioni differente rispondono in maniera diversa al trattamento con farmaci anti-EGFR. Si evidenzia come non solo lo stato mutazionale di K-RAS possa essere predittivo di risposta negativa al trattamento, ma anche lo stato di BRAF è fondamentale per stabilire la resistenza al farmaco. Cellule HT-29, infatti, caratterizzate da K-RAS wt e BRAF mutato, risultano essere resistenti al farmaco.

Si evidenzia, inoltre, come cellule con mutazioni differenti in K-RAS rispondono al Cetuximab in modo diverso. In particolare, cellule con la mutazione nel codone 13 risultano essere sensibili al trattamento con Cetuximab (effetto citostatico), mentre cellule con la mutazione nel codone 12 sono resistenti al farmaco. Inoltre, varia anche la risposta in maniera mutazione dipendente in presenza di inibitori che vanno a bloccare i pathway delle MAPK e della PI3K (PD ed LY rispettivamente). In particolare,

L'aggiunta di entrambi gli inibitori al Cetuximab induce un effetto citostatico in cellule con mutazione K-RASG12V con un blocco in G₀/G₁. In cellule con mutazione K-RASG13D il PD aumenta l'effetto citostatico del Cetuximab, con cellule che risultano essere bloccate in fase G₀/G₁, ma si assiste anche all'insorgenza di un effetto citotossico. Anche l'LY provoca un blocco nel ciclo cellulare ma questa volta in fase G₂/M, e si assiste all'aumento dell'effetto citotossico.

Per spiegare gli effetti riscontrati sia con il Cetuximab da solo che in associazione con i due inibitori sono stati valutati i livelli di espressione di alcune proteine che possono essere coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, p21, p53 ed MDM2.

In cellule K12 indotte il PD fa aumentare i livelli di MDM2 che impedisce l'attivazione di p53 e contemporaneamente si osservano variazioni nei livelli di p21. È quindi possibile ipotizzare che il blocco in fase G₀/G₁ evidenziato sia p21 dipendente. Anche l'inibitore l'LY fa aumentare i livelli di MDM2 con una conseguente riduzione nei livelli di p53 attiva ed un contemporaneo aumento dei livelli di p21. Queste variazioni potrebbero giustificare il blocco evidenziato sia in fase G₀/G₁ che in fase G₂/M.

Nelle cellule K13 indotte, invece, il PD non modifica i livelli di MDM2 con un conseguente aumento di p-p53, i livelli di p21 restano più o meno costanti e quindi anche in questo caso è possibile ipotizzare che il blocco osservato in G₀/G₁ sia p21 indipendente. Il trattamento con LY al contrario di quanto avviene in cellule K12 indotte provoca un aumento nei livelli di MDM2 nonostante il quale aumentano i livelli di p-p53 con conseguente considerevole aumento nei livelli di p21 che è probabilmente responsabile del blocco osservato in fase G₂/M.

Questo studio, quindi, potrebbe essere importante come base per successive indagini biomolecolari che possano consentire di individuare, per singoli pazienti, terapie più mirate e più adeguate al loro background genetico.

7. MATERIALI E METODI

7.1. COLTURE CELLULARI

La linea cellulare CaCo2 è stata messa in coltura alla temperatura costante di 37°C e a una pressione parziale di CO₂ del 5% nel terreno DMEM, (DMEM High Glucose, Pyruvate, 1x Gibco by Life Technologies) supplementato mediante l’aggiunta di siero fetale bovino (FBS) (Gibco by Life Technologies) al 10%, glutammina 2 mM (Gibco by Life Technologies), antibatterici e antimicotici: penicillina 10 U/ml e streptomina 10 mg/ml (Pen Strep, Gibco by Life Technologies). La linea HT-29 ed i cloni cellulari K13 e K12 sono stati messi in coltura alla temperatura costante di 37°C e a una pressione parziale di CO₂ del 5% nel terreno McCoy’s (McCoy’s 5A Medium 1X, Gibco by Life Technologies) supplementato mediante l’aggiunta di siero fetale bovino (FBS) (Gibco by Life Technologies) al 10%, glutammina 2 mM (Gibco by Life Technologies), antibatterici e antimicotici, penicillina 10 U/ml e streptomina 10 mg/ml, (Pen Strep Gibco by Life Technologies). Per mantenere la selezione dei cloni K12 e K13, contenenti i plasmidi pSwitch e pGene/V5-His, sono stati aggiunti al terreno gli antibiotici Igromicina e Zeocina (Life Technologies) rispettivamente alla concentrazione finale di 400 µg/ml e 100 µg/ml. Per realizzare l’induzione dell’espressione di K-RasG13D nelle cellule K13 e di K-RasG12V nelle cellule K12, è stato aggiunto al terreno l’ormone Mifepristone (Life Technologies) alla concentrazione finale di 10⁻⁸M. I cloni K13 e K12, erano stati precedentemente ottenuti, nel nostro laboratorio, utilizzando il sistema GeneSwitchTM System (Invitrogen) (Figura 48) che comprende due tipi di vettori plasmidici: il plasmide regolatore pSwitch e il plasmide d’espressione inducibile pGene/V5-His nel quale è stata clonata la sequenza di cDNA codificante per la specifica isoforma mutata della proteina RAS.

L’espressione del gene clonato è sotto il controllo di un promotore ibrido costituito dalle UAS (*upstream activating sequences*) con cui interagisce il DBD (*DNA binding domain*) del fattore di trascrizione GAL4 del lievito *Saccharomyces Cerevisiae*, legate alla sequenza TATA box del gene E1b di adenovirus. Questo plasmide contiene il gene per la resistenza all’antibiotico Zeocina. Il plasmide pSwitch che contiene il gene per la resistenza all’Igromicina esprime la proteina di fusione GeneSwitch di 73 KDa costituita da: il DBD del fattore GAL4, un dominio tronco di legame (LBD) del recettore per il progesterone umano (hPR) incapace di legare gli ormoni steroidei endogeni, il dominio di attivazione (AD) della subunità p65 del fattore di trascrizione umano NF-κB.

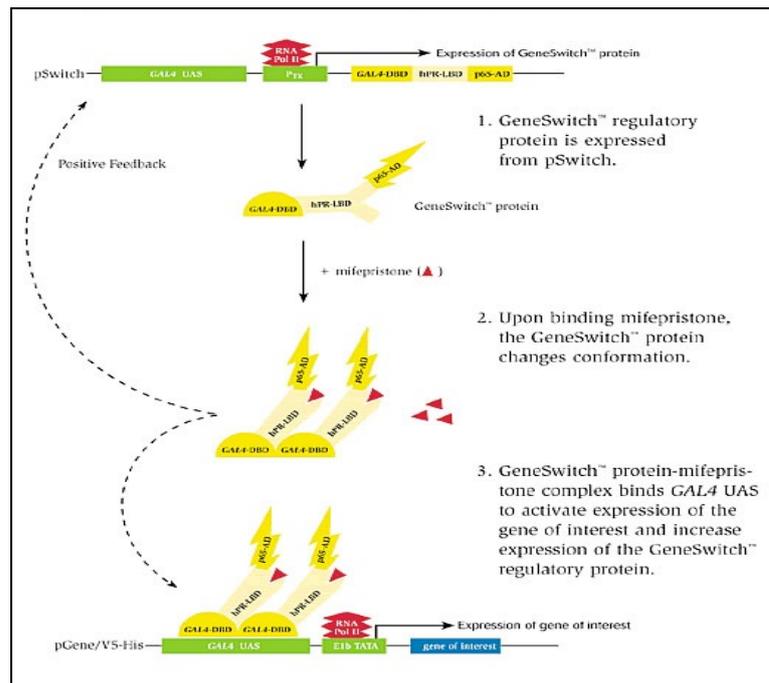


Figura 48. Rappresentazione schematica del Gene-Switch™ System (Invitrogen). (<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/gallery/thumb/2007.jpg>).

La sequenza codificante questo fattore di trascrizione si trova sotto il controllo di un promotore ibrido che comprende 4 copie delle UAS, a cui si lega il DBD di GAL 4, legate al promotore minimo del gene per la TIMIDINA chinasi (PTK) dell’Herpes Simplex Virus. In assenza dell’induttore, cioè dell’ormone Mifepristone, la proteina GeneSwitch è espressa a bassi livelli a partire dal PTK ed è localizzata prevalentemente nel nucleo come forma inattiva. Il Mifepristone è un ormone steroideo sintetico capace di legarsi con alta affinità al dominio hPR-LBD della proteina GeneSwitch e, in questo modo, causare in essa un cambiamento conformazionale che porta alla sua dimerizzazione e quindi alla conversione nella sua forma attiva. Gli omodimeri GeneSwitch complessati con Mifepristone interagiscono con le UAS di GAL4 presenti sia in pGene/V5-His che in pSwitch, attivando così mediante il dominio AD la trascrizione del gene clonato nel vettore d’espressione ma anche quella del gene regolatore codificante la proteina GeneSwitch. In questo modo si instaura un loop autoregolatore a *feedback* positivo che intensifica l’espressione del fattore GeneSwitch e di conseguenza attiva fortemente la trascrizione del gene di nostro interesse.

7.2. TRIPSINIZZAZIONE

Per recuperare le cellule si elimina il terreno di coltura e si procede con due lavaggi in PBS (DPBS, Dulbecco's Phosphate buffer solution, w/o Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺, Gibco by Life Technologies) per eliminare ogni traccia di siero. In seguito, si aggiunge una quantità opportuna di una soluzione di Tripsina 5% ed EDTA (acido etilendiamminotetracetico) 2% (Gibco by Life Technologies) diluita 1:10. Si lascia agire la miscela Tripsina-EDTA per circa cinque minuti a 37 °C. Si procede, quindi, bloccando l'azione della tripsina con l'aggiunta di un opportuno volume di terreno (completo, pari al doppio del volume di miscela Tripsina-EDTA utilizzato) e la sospensione cellulare viene centrifugata a 1000 rpm (centrifuga ALC 4232, rotore ALCT120) per cinque minuti. Eliminato il supernatante, si risospende il pellet in terreno completo e le cellule vengono trasferite in piastre nuove (100mmx20mm, treated, nonpyrogenic; Sigma) o comunque utilizzate per successivi esperimenti.

7.3. CONGELAMENTO CELLULARE

Le cellule appena raggiunta la confluenza di circa il 60%, si recuperano seguendo il protocollo di tripsinizzazione, precedentemente descritto. Dopo la centrifugazione a 1000 rpm per cinque minuti, il pellet viene risospeso in una soluzione di DMSO (DimetilSulfossido) al 10% in siero e questa sospensione viene aliquotata in criotubi da 1 ml, in modo da avere circa 4x10⁶ cellule per ml. I criotubi vengono tenuti per 24 ore a -80°C e successivamente vengono conservati in azoto liquido, il quale raggiunge una temperatura di circa -180 °C.

7.4. SCONGELAMENTO DI CELLULE CONSERVATE IN AZOTO LIQUIDO

I criotubi prelevati dall'azoto liquido vengono tenuti per 1 minuto a temperatura ambiente e poi 1-2 minuti a 37 °C. Dopo avere aggiunto 0.5 ml di terreno le cellule vengono trasferite in una provetta nella quale vengono aggiunti 5 ml di terreno completo. La sospensione cellulare viene, quindi, centrifugata a 1000 rpm per 5 minuti ed il pellet risospeso in terreno fresco e infine, la sospensione viene trasferita in 2 o 3 pozzetti di piastre multiwell da sei pozzetti. Il terreno viene sostituito con terreno fresco dopo 24 ore, eliminando così le cellule non sopravvissute al processo di congelamento/scongelo.

7.5. INIBIZIONE DEI PATHWAY PI3K/AKT E RAF/MAPK

Per inibire la proteina PI3K è stato utilizzato l'inibitore LY294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1benzopyran-4-one, Cayman) risospeso in DMSO che inibisce in maniera specifica le tre classi di PI3K legandosi reversibilmente al sito di legame per l'ATP (Vlahos et al., 1994; Mallawaarachy et al., 2012). Per l'inibizione del pathway di RAF/MAPK è stato utilizzato l'inibitore PD98059 (2'-Amino-3'-methoxyflavone, Cayman) risospeso in DMSO, capace di inibire le chinasi MEK 1 e 2 (Alessi et al., 1995; Lin et al., 1998). Per il trattamento con gli inibitori una quantità opportuna di cellule è stata piastrata in piastre (100mmx20mm, treated, nonpyrogenic; Sigma) e il giorno seguente, alcuni campioni sono stati trattati con l'inibitore LY904002 (25 μ M) o con l'inibitore PD98059 (20 μ M) e/o con Mifepristone (per quanto riguarda i cloni K12 e K13) per 24, 48 e 72 ore. I campioni a cui non sono stati aggiunti gli inibitori sono stati utilizzati come controllo e ad essi è stata aggiunta una quantità di DMSO uguale alla quantità di inibitori utilizzata. Le cellule così trattate sono state utilizzate per i saggi di proliferazione, per i test di vitalità, per le analisi citofluorimetriche e per i saggi Western Blot.

7.6. ANALISI CITOFUORIMETRICHE CON PROPIDIO IODURO

L'analisi citofluorimetrica consente di conoscere la distribuzione di una popolazione cellulare attraverso il ciclo cellulare.

Per gli esperimenti aliquote opportune di cellule HT-29, K12 E K13 sono state piastrate in piastre da 100mmx20mm (treated, nonpyrogenic; Sigma); dopo 24 ore alcune piastre di cellule HT-29 sono stati trattati con Cetuximab alla concentrazione finale di 50 μ g/ml e/o con LY294002 (concentrazione finale 25 μ M) e/o PD98059 (concentrazione finale 20 μ M) per 24h, 48h o 72h ed altre tenute come controllo; dopo 24 ore alcune aliquote di cellule K12 e K13 sono state trattate con Mifepristone (concentrazione finale 10⁻⁸M) e/o con il farmaco Cetuximab alla concentrazione finale di 50 μ g/ml, e/o con LY294002 e/o PD98059 per 24h, 48h o 72h. Agli intervalli di tempo le cellule vengono tripsinizzate e contate (come descritto in seguito). Si raccolgono quindi aliquote di 4x10⁵ cellule, che vengono centrifugate a 1000 rpm per cinque minuti e lavate, in 1 ml di PBS (il resto del pellet è stato utilizzato per il saggio di proliferazione, test di vitalità cellulare, e saggi Western Blot eseguiti come di seguito descritto). Per calibrare il citofluorimetro, valutando l'autofluorescenza delle cellule, i

pellet ottenuti dopo un'ulteriore centrifugazione, sono stati risospesi in 0.5 ml di una soluzione contenente Na-citrato 0.1% (w/v) e Nonidet-P40 (nonylphenoxypolyethoxyethanol, NP40) 0.1% in H₂O. In questo modo, sono stati settati i parametri di SSC (*side scatter*), FCS (*forward scatter*) e di PE (ficoeritrina), che per le nostre cellule sono rispettivamente 330, 82 e 407. Per le analisi del ciclo cellulare i pellet sono stati risospesi in 0.5 ml di una soluzione contenente Na-citrato 0.1% (w/v), Propidio Ioduro 1mg/ml, RNasi A 10 mg/ml e NP40 0.1% in acqua. Dopo un'incubazione al buio di 45 minuti a temperatura ambiente i campioni sono stati analizzati mediante il citofluorimetro BD FACSCantoTM (BD Biosciences) e i dati sono stati processati mediante il software BD FACSDiva.

7.7. SAGGI DI PROLIFERAZIONE E DI VITALITÀ CELLULARE

Per condurre saggi di proliferazione e vitalità cellulare aliquote di cellule sono state prelevate dalle piastre preparate per i saggi di citofluorimetria. Dopo 24 ore sono state raccolte alcune aliquote di cellule (tempo 0). Dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento aliquote di cellule prelevate dai campioni preparati per le analisi citofluorimetriche, sono state raccolte e lavate in 200 µl di PBS. Il pellet così ottenuto è stato risospeso in una soluzione di 150 µl di PBS e 150 µl di Trypan blue solution 0.2% (Sigma). Il Trypan blue è un colorante in grado di colorare di blu selettivamente le cellule morte che, non avendo una membrana integra, permettono al colorante di penetrare nel citoplasma. Dopo un'incubazione di dieci minuti a temperatura ambiente si è eseguita la conta utilizzando la camera di Thoma, da ciascun campione sono stati prelevati 10 µl di sospensione cellulare. I saggi di proliferazione e vitalità cellulare sono stati eseguiti in triplicato e i risultati ottenuti sono stati analizzati con il programma Microsoft Office Excel (2007) per ottenere le curve di proliferazione e i grafici rappresentativi della percentuale di mortalità cellulare.

7.8. PREPARAZIONE DEI LISATI PROTEICI TOTALI

Per preparare i lisati totali sono stati utilizzati i pellets ottenuti da cellule cresciute in piastre dopo aver eventualmente prelevato le aliquote da analizzare al citofluorimetro. I pellets sono stati lavati due volte in una opportuna quantità di PBS e conservati a -80°C. Le cellule sono state risospese e lisate aggiungendo 1 volume di Buffer di lisi composto da Hepes 20 mM (pH 8), EDTA 0.2 mM, NaCl 0.4 M, glicerolo 10%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM e 100 µl/ml di

protease inhibitor cocktail 1X (Sigma). Il campione è stato sottoposto a 3 cicli di congelamento e scongelamento (30 secondi in azoto liquido e 5 minuti a 37°C) e centrifugato a 17000 rpm, per 35 minuti a 4°C (centrifuga Sorvall RC6 PLUS, rotore SS34). Le concentrazioni delle proteine totali presenti nel supernatante sono state determinate con il metodo Bradford, come segue: 5 µl di campione diluito 1:10 sono stati aggiunti in 250 µl di liquido di Bradford (100 mg di Coomassie brilliant blue G-250 sciolti in 50 ml di etanolo 95%, 100 ml di acido fosforico 85% e 850 ml di H₂O) e 745 µl di H₂O. Dopo 5 minuti è stata effettuata la lettura alla spettrofotometro (Beckman Coulter Du 730) alla lunghezza d'onda di 595 nm. Allo stesso modo sono stati preparati cinque campioni di BSA (albumina sierica bovina) a concentrazioni note (0.125 mg/ml; 0.25 mg/ml; 0.5 mg/ml; 1 mg/ml; 1.4 mg/ml) usati come standard per costruire una curva di calibrazione. Confrontando i valori di assorbanza degli standard a concentrazioni note con l'assorbanza del campione, è stata determinata la concentrazione proteica del lisato. È stato preparato un campione, utilizzato come bianco, con 250 µl di liquido di Bradford in 750 µl di H₂O. I campioni sono poi stati opportunamente aliquotati e utilizzati, per saggi di western blot, o conservati a -80°C.

7.9. ELETTROFORESI MONODIMENSIONALE E WESTERN BLOT

Uguali quantità di estratto proteico sono state frazionate mediante la tecnica di SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) in un gel di acrilamide/bisacrilamide (soluzione 30% acrilamide/bisacrilamide, 29:1, Bio-Rad) al 10%. A 3,3 ml della soluzione di acrilamide/bisacrilamide sono stati aggiunti per il resolving gel: 4 ml di H₂O, 2.5 ml di Tris pH 8.8 (C.f. 0.37 M), 0.1 ml di SDS (sodio dodecil solfato) 10% (C.f. 0.1%), 0,1 ml di APS (ammonio persolfato) 10% (C.f. 0.1%) e 4 µl di TEMED (N, N, N, N'-tetrametilendiammina). Per lo stacking gel, invece, a 0.5 ml di soluzione di acrilamide/bisacrilamide sono stati aggiunti: 2.1 ml di H₂O, 0.38 ml di 1 M di Tris pH 6.8 (C.f. 0.12 M), 0.03 ml di SDS 10% (C.f. 0.1%), 0.03 ml di APS 10% (C.f. 0.1%) e 3 µl di TEMED. Il gel è stato preparato all'interno di due lastre di vetro (10x7.3 cm) separate da due spaziatori di 1 mm e inserite in un apparecchio per l'elettroforesi verticale (Bio-Rad). Prima del caricamento, a ciascun campione è stato aggiunto 1/4 di volume di SB 4X (Sample Buffer: Tris HCl, pH 6.8, 50 mM; β-mercaptoetanolo 5%; SDS 2%; blu di bromofenolo 0.1%; glicerolo 10%) portando a volume di 25 µl con SDS 0.1%. I campioni sono stati quindi posti a 100°C per 5 minuti, trasferiti poi in ghiaccio per 5 minuti e infine caricati su gel. La corsa è

stata condotta per 1h e 20 minuti, a 100 V, a temperatura ambiente e in un tampone di scorrimento costituito da Tris 0.05 M (pH 8.3), glicina 0.38 M, SDS 0.1%. Insieme ai campioni sono stati caricati su gel 5 µl di marker (SeeBlue Plus2 Prestained, Invitrogen) come riferimento per i pesi molecolari. Una volta terminato lo scorrimento, il gel è stato sottoposto a due lavaggi, da 15 minuti ciascuno, con un tampone di trasferimento preparato con Tris 0.025 M (pH 8.3), glicina 0.19 M, metanolo 20%, e quindi è stato eseguito il blotting.

Il blotting è stato fatto utilizzando un apparato Mini-PROTEAN (Bio-Rad), su una membrana di nitrocellulosa con porosità 0.45 µm (Hybond, Amersham) a 200 mA, a 4 °C, per un'ora nel tampone di trasferimento.

Per osservare l'efficienza del trasferimento sono stati colorati sia il gel che il filtro. La membrana è stata colorata con il Rosso Ponceau (0.2% di Rosso Ponceau e 3% di acido tricloroacetico in acqua distillata) per 5 minuti e decolorata in TBS-T 1X (Tris 100 mM, pH 8; NaCl 150 mM; Tween 20 0,05%), mentre il gel è stato colorato con Blue di Coomassie (0.116 g di Blue di Coomassie R250, 25% di metanolo e 8% di acido acetico) *over night* (o.n.) e il giorno seguente decolorato in una opportuna quantità di soluzione decolorante (500 ml di metanolo, 100 ml di acido acetico e 400 ml di acqua distillata).

Successivamente il filtro è stato incubato per due ore, in agitazione lenta, in una soluzione di *blocking* (soluzione saturante) costituita dal 5% di latte in polvere (*non-fat dry milk*, Euroclone) sciolto in TBS-T 1X per prevenire le interazioni non specifiche tra l'anticorpo e la membrana. Il filtro è poi stato incubato sempre in agitazione lenta, a 4°C o.n. con gli anticorpi primari diluiti in una soluzione costituita dal 5% di *non-fat dry milk* sciolto in TBS-T 1X:

- anti-p21, anticorpo rabbit policlonale C-19 (1:400, Santa Cruz Biotechnology);
- anti-GAPDH, anticorpo rabbit policlonale FL-335 (1:1500, Santa Cruz Biotechnology);
- anti-p-p53, anticorpo rabbit policlonale pSer392 (1:1200, Sigma-Aldrich);
- anti-p53, anticorpo mouse monoclonale DO-1 (1:2000, Santa Cruz Biotechnology);
- anti-MDM2, anticorpo rabbit AB166 (1:700, Sigma-Aldrich);

Il giorno seguente la membrana è stata lavata 3 volte, per 10 minuti, con TBS-T 1X per eliminare l'eccesso di anticorpo primario non legato, e poi è stata incubata in agitazione lenta a temperatura ambiente (t.a.) per un'ora, con gli anticorpi anti-mouse o anti-rabbit, secondo quale anticorpo primario si è utilizzato, IgG coniugati con perossidasi di rafano (HRP) (Promega) diluiti 1:2500 in una soluzione costituita dal 5% di *non-fat dry milk* sciolto in TBS-T 1X oppure in una soluzione di BSA al 5% in TBS-T 1X. Al termine dell'incubazione, sono

stati eseguiti 3 lavaggi, da 10 minuti ciascuno, in TBS-T 1X e 2 lavaggi, da 10 minuti ciascuno, in TBS 1X (Tris 100 mM, pH 8; NaCl 150 mM).

Il filtro è stato quindi sviluppato per incubazione con i reattivi dell'Immun-Star WesternC Kit (*enhanced luminol based chemiluminescent substrate for the detection of horseradish peroxidase, HRP*) (Biorad), seguendo le indicazioni del kit e le bande sono state visualizzate mediante lo strumento Varsadoc (Biorad). I dati sono stati rappresentati in istogrammi costruiti riportando la media dei valori ottenuti in tre (per HT-29 e K12) o in due (per K13) esperimenti effettuati in maniera indipendente tra loro, analizzando l'intensità delle bande del filtro di nitrocellulosa con il programma Quantity One (v4.6.3 BioRad) e normalizzandola rispetto alla GAPDH. La significatività delle differenze osservate è stata valutata calcolando il p-value. Il valore di p value è stato calcolato con il programma Graphpad riportando ogni campione trattato con il rispettivo controllo. In particolare il p value dei campioni trattati con il farmaco più gli inibitori delle 24 ore è calcolato in rapporto con il campione trattato con il solo Cetuximab delle 24 ore, e lo stesso per i campioni trattati alle 48 ore.

7.10. SAGGI DI IMMUNOFLUORESCENZA PER LOCALIZZAZIONE EGFR

1×10^5 cellule sono state piastrate su vetrini posti all'interno dei pozzetti di una piastra multiwell da 6. Dopo 24 ore le cellule HT-29 sono state trattate con Cetuximab alla concentrazione finale di $50 \mu\text{g/ml}$; le cellule K12 e K13 sono state trattate con Mifepristone (concentrazione finale 10^{-8}M) e/o con il Cetuximab. Dopo le 24 ore di trattamento i vetrini sono stati lavati con PBS 1X (DPBS, Dulbecco's Phosphate buffer solution, w/o Ca^{++} e Mg^{++} , Gibco by Life Technologies) e le cellule sono state, fissate in formaldeide (3.7% in PBS 1X) per 15 minuti. I vetrini, quindi, sono stati sottoposti a 3 lavaggi da 10 minuti ciascuno con PBS 1X. In seguito le cellule sono state permeabilizzate con una soluzione di TRITON X-100 (0.1% in PBS 1X più 3% di BSA) per 5 minuti a t.a. I vetrini sono stati sottoposti ad un primo lavaggio con PBS 1X per 5 minuti ed uno con acqua distillata ed infine trasferiti su vetrini portaoggetto. I vetrini sono stati incubati, con anticorpo primario anti-EGFR (anticorpo rabbit monoclonale (D38B1) XP®, Cell Signalling Technology) diluito in BSA (diluizione 1:50), o.n. a 4°C ed in camera umida. Sono stati preparati dei vetrini sottoposti ad uguale protocollo, ma non incubati con anticorpo primario, utilizzati come controllo negativo. Il giorno successivo i vetrini sono stati sottoposti a 5 lavaggi da 5 minuti ciascuno con PBS 1X ed incubati quindi con anticorpo secondario (anti-rabbit Ig, fluoresceina-coniugato; Amersham

Biosciences) diluito in BSA (1:50) per 1 ora a t.a., al buio. In seguito, dopo 3 lavaggi da 5 minuti con PBS 1X, i vetrini sono stati incubati con una soluzione di HOECHST 3342 (10mg/ml) diluito 1:1000, a t.a. per 5 minuti, al buio. Infine, dopo un lavaggio in PBS 1X per 5 minuti ed un lavaggio in acqua distillata, i vetrini sono stati montati su un vetrino portaoggetto su cui sono stati aggiunti precedentemente 10 μ l di DABCO. I vetrini sono stati infine osservati al microscopio a fluorescenza, utilizzando laser a diverse lunghezze d'onda: 580 nm (nel verde) e 450 nm (nel blu).

8. RINGRAZIAMENTI

Il lavoro di tesi di Dottorato è uno dei più impegnativi, non tanto per la sua estensione nel tempo o per i costanti sforzi intellettuali e fisici che richiede, piuttosto perché è il frutto di un percorso formativo nel quale si sceglie di mettersi personalmente in gioco. In un tale percorso l'accrescimento professionale rappresenta solo una delle sfide in quanto è opportuno anche saper sviluppare una serie di capacità trasversali necessarie per confrontarsi con realtà e situazioni, accademiche e non accademiche, mutevoli ed incerte.

Desidero, quindi, al termine di questi tre anni di dottorato, ringraziare tutti coloro che a vario titolo mi hanno accompagnato in questo percorso.

Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Fabiana Geraci, per il suo aiuto costante durante questi anni, per il suo incoraggiamento nei momenti più difficili e per aver speso parte del suo tempo per leggere, discutere e correggere le bozze di questo lavoro. Senza di lei questa tesi non esisterebbe.

Ringrazio tutti i colleghi e amici dottorandi con cui ho condiviso lezioni, impegni, preoccupazioni e frustrazioni, oltre a idee e soddisfazioni, senza di loro questo dottorato non sarebbe stato lo stesso.

Ringrazio la Prof.ssa Ida Albanese per aver messo a disposizione il proprio laboratorio ed avermi dato la possibilità di lavorare a questo progetto di ricerca.

Un grazie va alla mia famiglia, per avermi incoraggiato e sopportato durante questi tre anni di dottorato. Un ringraziamento speciale va sicuramente al mio fidanzato, Emanuele, per aver condiviso con me questi anni, per la sua pazienza durante il periodo di stesura di questa tesi e per il suo supporto anche tecnico a questo lavoro.

Per ultima ma non meno importante ringrazio me stessa, per essere riuscita a raggiungere questo nuovo traguardo, affrontando e superando le tante difficoltà incontrate.

9. BIBLIOGRAFIA

- Abukhdeir A.M., Park B.H. “**p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance**”. Expert Reviews in Molecular Medicine, 1:10-e19. (2008)
- Alessi D.R., Cuenda A., Cohen P., Dudley D.T., Saltiel A.R. “**PD0980059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein Kinase Kinase in vitro and in vivo**”. Journal of Biological Chemistry, 270(46):27489-94. (1995)
- Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJ. “**Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes**”. Nature biotechnology, 29: 341-345. (2011)
- Al-Sohaily S., Biankin A., Leong R., Kohonen-Corish M., Warusavitarne J. “**Molecular pathways in colorectal cancer**”. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 27(9):1423-31. (2012)
- Armaghany T., Wilson JD., Chu Q., Mills G. “**Genetic alterations in colorectal cancer**”. Gastrointestinal Cancer Research, 1:19-27. (2012)
- Bauer J., Sporn J. C., Cabral J., Gomez J., Jung B. “**Effects of Activin and TGF β on p21 in Colon Cancer**”. PLoS One, 7:6 e39381. (2012)
- Berg M., Soreide K. “**Genetic and epigenetic traits as biomarkers in colorectal cancer**”. International Journal of Molecular Sciences, 12:9426-39. (2011)
- Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S. “**An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors**”. Molecular cell, 12(3):541-52. (2003)
- Caby, M. P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., Bonnerot, C., “**Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma**”. International immunology, 17: 879-887. (2005)
- Camp ER, Summy J, Bauer TW, Liu W, Gallick GE, Ellis LM. “**Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor**”. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 397-405. (2005)
- Cantin, R., Diou, J., Belanger, D., Tremblay, A. M., Gilbert, C., “**Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants**”. Journal of Immunology, Methods, 33: 21-30. (2008)
- Castellano E. e Santos E. “**Functional Specificity of Ras Isoforms: So Similar but So Different**”. Genes and Cancer, 2(3): 216–231. (2011)
- Celis JE, Moreira JM, Cabezón T, Gromov P, Friis E, Rank F, Gromova I. “**Identification of extracellular and intracellular signaling components of the mammary adipose tissue and its interstitial fluid in high risk breast cancer patients: toward dissecting the molecular circuitry of epithelial-adipocyte stromal cell interactions**”. Molecular And Cell Proteomics, 4(4): 492-522. (2005)
- Ciardiello F., Tortora G., “**A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor**”. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 2958-70. (2001)
- Chow L., Lin P.C., Chang J.S., Chu P.Y., Lee P.K., Chen S.N., Cheng Y.M., Lee J.C., Crespo P. e Leòn J. “**Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation**”. Cellular and Molecular Life Sciences, 8. (2000)
- Crespo P., Leòn J. “**Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation**”. Cellular and Molecular Life Sciences, 57:1613-36. (2000)

- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA “**Mutations of the BRAF gene in human cancer**”. *Nature*, 417:949–54. (2002)
- Fearon E.R. “**Molecular Genetics of Colorectal Cancer**”. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6:479-507. (2011)
- Fischer M., Grundke I., Sohr S., Quaas M., Hoffmann S., Knörck A., Gumhold C., Rother K. “**P53 and cell cycle dependent transcription of kinesin family member 23 (KIF23) is controlled via a CHR promoter element bound by DREAM and MMB complexes**”. *PlosOne*, 8:e63187. (2013)
- Gaikwad S.M., Ray P. “**Non-invasive imaging of PI3K/Akt/mTOR signalling in Cancer**” *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2(4):418-431. (2012)
- Gayet J., Zhou X.P., Duval A., Rolland S., Hoang J.M., Cottu P., Hamelin R. “**Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines**”. *Oncogene*, 20:5025-5032. (2001)
- Gilmore R, Blobel G, Walter P. “**Protein translocation across the endoplasmic reticulum**”. *The Journal Of The Cell Biology*, 38 (1): 5-8. (1984)
- Giri D.K., Ali-Seyed M., Li L.Y., Lee D.F., Ling P., Bartholomeusz G., Wang S.C., Hung M.C., “**Endosomal transport of ErbB-2:mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor**”. *Molecular and Cellular Biology*, 11005-18. (2005)
- Grewal T., Koese M., Tebar F., e Enrich C. “**Differential Regulation of RasGAPs in Cancer**”. *Genes and Cancer*, 2(3): 288-297. (2011)
- Guix M., Faber A.C., Wang S.E., Olivares M.G., Song Y., Qu S., Rinehart C., Seidel B., Yee D., Arteaga C.L., Engelman J.A., “**Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins**”. *The Journal of Clinical Investigation*, 2609-19. (2008)
- Haigis K.M., Kendall K.R., Wang Y., Cheung A., Haigis C., Glickman J.N., Niwa-Kawakita M., Sweet-Cordero A., Sebolt-Leopold J., Shannon K.M., Settleman J., Giovannini M., Jacks T. “**Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon**”. *Nature genetics*, 40:5. (2008)
- Hammoud S.S., Cairns B.R., Jones D.A. “**Epigenetic regulation of colon cancer and intestinal stem cells**”. *Current Opinion in Cell Biology*, 25: 177-83 (2013).
- Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K., Elledge S.J. “**The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases**”. *Cell*, 75: 805-16. (1993)
- Hemmings B. A. e Restuccia D. F. “**PI3K-PKB/AKT Pathway**” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9):a011189. (2012)
- Hernandez A.M., Colvin E.S., Chen Y.C., Geiss S.L., Eller L.E., Fueger P.T. “**Upregulation of p21 activates the intrinsic apoptotic pathway in β -cells**”. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 304:E1281-90. (2013)

- Héron-Milhavet L., Franckhauser C., Rana V., Berthenet C., Fisher D., Hemmings B.A., Fernandez A., Lamb N.J. **“Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding”**. Molecular and Cellular Biology, 26:8267-80. (2006)
- Hirsch E., Ciraolo E., Ghigo A., Costa C. **“Taming the PI3K team to hold inflammation and cancer at bay”**. Pharmacological Therapy, 118(2):192-205. (2008)
- Hoff G., Dominitz J.A. **“Contrasting US and European approaches to colorectal cancer screening: which is best?”**. Gut BMJ Journal, 59:407-14. (2010)
- Hosseini-Beheshti E., Pham S., Adomat H., Li N., Tomlinson Guns E.S. **“Exosomes as biomarker enriched microvesicles: characterization of exosomal proteins derived from a panel of prostate cell lines with distinct AR phenotypes.”** Molecular and cellular proteomics, 11: 863-885. (2012)
- Hubbard S.R., Mohammadi M., Schlessinger J., **“Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases”**. The Journal of Biological Chemistry, 273(20):11987-90. (1998)
- Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, Richman S, Chambers P, Seymour M, Kerr D, Gray R, Quirke P. **“Value of mismatch repair, K-RAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer”**. Journal of Clinical Oncology, 29: 1261–70. (2011)
- Ionov Y., Peinado M.A., Malkhosyan S., Shibata D., Perucho M. **“Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis”**. Nature, 363:558-61. (1993)
- Jackstadt R., Jung P., Hermeking H. **“AP4 directly downregulates p16 and p21 to suppress senescence and mediate transformation”**. Cell Death and Disease, 4:e775. (2013)
- Jass J.R. **“Colorectal Cancer: A Multipathway Disease”**. Oncogenesis, 12(3-4):273–287 (2006)
- Jia S., Zhao L., Tang W., Luo Y. **“The gain of function of p53 mutant p53S in promoting tumorigenesis by cross-talking with H-RasV12”**. International Journal of Biological Science, 8:596-605. (2012)
- Jimenez C.R., Knol J.C., Meijer G.A., Fijneman R.J.A. **“Proteomics of colorectal cancer: overview of discovery studies and identification of commonly identified cancer-associated proteins and candidate CRC serum markers”**. Journal of Proteomics, 73:1873-95. (2010)
- Jung, Y.S., Qian Y., Chen, X. **“Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity”**. Cellular Signalling, 22:1003-1012. (2010)
- Kanthan R., Senger J.L., Kanthan S.C. **“Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review”**. Pathology Research International, 4:239. (2012)
- Karapetis C.S., Khambata-Ford S., Jonker D.J., O’Callaghan C.J., Tu D., Tebbutt N.C., Simes R.J., Chalchal H., Shapiro J.D., Robitaille S., Price T.J., Shepherd L., Au H.J., Langer C., Moore M.J., Zaloberg J.R. **“K-ras mutations and benefit from Cetuximab in advanced colorectal cancer”**. New England Journal of The Medicine, 1757-65. (2008)
- Kawai K., Carrie Viars C., Karen Arden K., David Tarin D., Virginia Urquidi V., Steve Goodison S. **“Comprehensive Karyotyping of the HT-29 Colon Adenocarcinoma Cell Line”**. Genes, Chromosomes & Cancer, 34:1-8. (2002)

- Kelly-Spratt K.S., Gurley K.E., Yasui Y., Kemp C.J. **“P19Arf suppresses growth, progression and metastasis of Hras-driven carcinomas through p53-dependent and independent pathways”**. PLoSOne Biology, 2:E242. (2004)
- Kim A.J., Jee H.J., Song N., Kim M., Jeong S.Y., Yun J. **“p21(WAF1/CIP1) deficiency induces mitochondrial dysfunction in HCT116 colon cancer cells”**. Biochemical Biophysical Research Communications, 430:653-8. (2013)
- Kim K., Kim D.H., Chae S.W., Shin J.H., Kim H.J., Do S.I., Lee H.J., Koo J.H., Pyo J.S., Sohn J.H. **“Expression of Cell Cycle-Related Proteins, p16, p53 and p63 as Important Prognostic Markers in Gallbladder Adenocarcinoma”**. Pathology Oncology Research, 1:7. (2013)
- Kim S.M., Kim J.S., Kim J.H., Yun C.O., Kim E.M., Kim H.K., Solca F., Choy S.Y., Cho B.C., **“Acquired resistance to Cetuximab is mediated by increased PTEN instability and leads cross-resistance to gefitinib in HCC827 NSCLC cells”**. Cancer Letters 150-9. (2010)
- Koster R., Di Pietro A., Timmer-Bosscha H., Gibcus JH., van den Berg A., Suurmeijer AJ., Bischoff R., Gietema JA., De Jong S. **“Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer”**. The Journal of Clinical Investigations, 120:3594-605. (2010)
- Kudo S., Sugihara Y., Kida H., Ishida F., Miyachi H., Mori Y., Misawa M., Hisayuki T., Kodama K., Wakamura K., Hayashi T., Wada Y., Hamatani S. **“Depressed-Type Colonic Lesions and “De Novo” Cancer in Familial Adenomatous Polyposis: A Colonoscopist’s Viewpoint.”** Gastroenterology, 2013:838134. (2013)
- Kulasingam, V., Diamandis, E.P., **“Tissue culture-based breast cancer biomarker discovery platform”**. International Journal of Cancer 123 (9) (2007-2012)
- La Baer J., Garrett M.D., Stevenson L.F., Slingerland J.M., Sandhu C., Chou H.S., Fattaey A., Harlow E. **“New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors”**. Genes and Development, 11:847-62. (1997)
- La Rue K.E.A., Bradbury E.M. and Freyer J.P. **“Differential regulation of cyclin-dependent Kinase inhibitors in monolayer and spheroid cultures of tumorigenic and nontumorigenic fibroblasts”**. Cancer research, 58:1305-1314. (1998)
- Lee J.H., Lee J.S., Kim S.E., Moon B.S., Kim Y.C., Lee S.K., Lee S.K., Choi K.Y. **“Tautomycin inhibits growth of colorectal cancer cells through p21cip/WAF1 induction via the extracellular signal-regulated kinase pathway”**. Molecular Cancer Therapeutics, 5:3222-31. (2006)
- Levidou G., Sietta A.A. Gigelou F., Karlou M., Papanastasiou P., Stamatelli A., Kavantzias N., Michalopoulos N.V., Agrogiannis G., Patsouris E., Korkolopoulou P. **“ERK/pERK expression and Braf mutation in colon adenocarcinomas: correlation with clinico pathological characteristics”**. World Journal of Surgical Oncology, 10:47. (2012)
- Lin S.Y., Makino K., Xia W., Matin A., Wen Y., Kwong K.Y., Bourguignon L., Hung M.C., **“Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor”**. Nature Cell Biology, 3:802–8. (2001)
- Loboda A., Nebozhyn M., Klinghoffer R., Frazier J., Chastain M., Arthur W., Roberts B., Zhang T., Chenard M., Haines B., Andersen J, Nagashima K., Paweletz C., Lynch B., Feldman I., Dai H., Huang P. e Watters J. **“A gene expression signature of RAS pathway dependence predicts response to PI3K**

- and RAS pathway inhibitors and expands the population of RAS pathway activated tumors*” BMC Medical Genomics 3:26. (2010)
- Lukas J., Lukas C., Bartek J. “*Mammalian cell cycle checkpoints: signaling pathways and their organization in space and time*”. DNA Repair (AMST) 3:997-1007. (2004)
 - Mallawaaratchy D.M., Mactier S., Kaufman K.L., Blomfield K., Christopherson R.I. “*The phosphoinositide 3-kinase inhibitor LY294002, decreases aminoacyl-tRNA synthetases, chaperones and glycolytic enzymes in human HT-29 colorectal cancer cells*”. Journal of proteomics, 75:1590-1599. (2012)
 - Markman B., Javier Ramos F., Capdevila J., Tabernero J., “*EGFR and K-RAS in colorectal cancer*”. Advance in Clinical Chemistry, 51:71-119; (2010)
 - Massersmith W.A. and Hidalgo M., “*Panitumumab, a monoclonal anti-Epidermal Growth Factor receptor antibody in colorectal cancer: another one or the one?*”. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 13:4664-4666. (2007)
 - Matallanas D., Romano D., Al-Mulla F., O'Neill E., Al-Ali W., Crespo P., Doyle B., Nixon C., Sansom O., Drosten M., Barbacid M., Kolch W. “*Mutant K-Ras activation of the proapoptotic MST2 pathway is antagonized by wild-type K-Ras*”. Molecular Cell, 44:893-906. (2011)
 - Mathivanan, S., Ji, H., Simpson, R. J., “*Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication*”. Journal of Proteomics, 73:1907-1920. (2010)
 - Mathivanan, S., “*Quest for cancer biomarkers: assaying mutant proteins and RNA that provides the much needed specificity*”. Journal of Proteomics and Bioinformatics, 5:13-17. (2012)
 - McCubrey J.A., Steelman L.S., Abrams S.L., Lee J.T., Chang F., Bertrand F.E., Navolanic P.M., Terrian D.M., Franklin R.A., D'Assoro A.B., Salisbury J.L., Mazzarino M.C., Stivala F., Libra M. “*Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/ AKT pathways in malignant transformation and drug resistance*”. Advances in Enzyme Regulation, 46:249-279. (2006)
 - Mignatti P., Morimoto T., Rifkin D.B. “*Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex*”. Journal of Cellular Physiology, 151 (1):81e93. (1992)
 - Miranda E., Destro A., Malesi A., Balladore E., Bianchi., Baryshnikona E., Franchi G., Morengi E., Laghi., Gennari L. and Roncalli. “*Genetic and epigenetic changes in primary metastatic and nonmetastatic colorectal cancer*”. British Journal of Cancer, 95:1101-1107. (2006)
 - Mitomi H., Ohkura Y., Fukui N., Kanazawa H., Kishimoto I., Nakamura T., Yokoyama K., Sada M., Kobayashi K., Tanabe S., Saigenji K. “*P21 WAF1/CIP1 expression in colorectal carcinomas is related to K-RAS mutations and prognosis*”. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 19:883-9 (2007).
 - Charles G. Moertel, M.D., Thomas R. Fleming, Ph.D., John S. Macdonald, M.D., Daniel G. Haller, M.D., John A. Laurie, M.D., Phyllis J. Goodman, M.S., James S. Ungerleider, M.D., William A. Emerson, M.D., Douglas C. Tormey, M.D., John H. Glick, M.D., Michael H. Veeder, M.D., and James A., Mailliard M.D. “*Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma*”. The New England Journal of Medicine, 322:352-8. (1990)

- Morán A., Ortega P., De Juan C., Fernández-Marcelo T., Frías C., Sánchez- Pernaute A., Torres A.J., Díaz Rubio E., Iniesta P., Benito M. **“Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance”** World Journal of Gastrointestinal Oncology, 2(3):151-15 (2010)
- Mueller M.M., Fusenig N.E., **“Friends or foes e bipolar effects of the tumour stroma in cancer”**. Nature Reviews Cancer, 4(11):839-849. (2004)
- Mulla F., Milner-White E.J., Going J.J. and Birnie G.D. **“Structural differences between valine-12 and aspartate 12 ras proteins may modify carcinoma aggression”**. Journal of Pathology, 187:433-438. (1999)
- Normanno N., Bianco C., De Luca A., Salomon DS., **“The role of EGF-related peptides in tumor growth”**. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 6:685-707. (2001)
- Oda K., Okada J., Timmerman L., Rodriguez-Viciana P., Stokoe D., Shoji K., Taketani Y., Kuramoto H., Knight Z.A., Shokat K.M., McCormick F. **“PIK3CA cooperates with other phosphatidylinositol 3'-kinase pathway mutations to effect oncogenic transformation”**. Cancer Research, 68:8127-36. (2008)
- Ohshima H., Tazawa H., Sylla BS., Sawa T. **“Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes”**. Mutation Research, 591(1-2): 10-22. (2005)
- Palmirotta R., Savonarola A., Ludovici G., Laura De Marchis M.L., Covelto R., Ettore G.M., Ialongo C., Guadagni F. **“Concurrent mutation in exons 1 and 2 of the K-ras oncogene in colorectal cancer”** Folia Histochemica et Cytobiologica, 49 (4) 729-733. (2011)
- Pancione M., Remo A., Colantuoni V. **“Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression”**. Pathology Research International, 2012:509348. (2012)
- Park H.W., Kang H.C., Kim I.J., Jang S.G., Kim K., Yoon H.J., Jeong S.Y., Park J.G. **“Correlation between hypermethylation of the RASSF2A promoter and K-ras/BRAF mutations in microsatellite-stable colorectal cancers”**. International Journal of Cancer, 120:7-12. (2006)
- Patai A.V., Molnár B., Tulassay Z., Sipos F. **“Serrated pathway: alternative route to colorectal cancer”**. World Journal of Gastroenterology, 19:607-15. (2013)
- Romano D., Maccario H., Doherty C., Quinn N.P., Kolch W., Matallanas D. **“The differential effects of wild-type and mutated K-Ras on MST2 signaling are determined by K-RAs activation kinetics”**. Molecular and Cellular Biology, 33:1859-68. (2013)
- Romanov V.S., Pospelov V.A., Pospelova T.V. **“Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis”**. Biochemistry (Mosc), 77:575-84. (2012)
- Rosso M., Okoro D.E., Bargonetti J. **“Splice Variants of MDM2 in Oncogenesis”** Subcellular Biochemistry, 85:247-261. (2014)
- Rubartelli A., Cozzolino F., Talio M., Sitia R. **“A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence”**. Embo Journal, 9(5):1503-1510. (1990)
- Rupp A.K., Rupp C., Keller S., Brase J.C., Eehalt R., Fogel M., Moldenhauer G., Marmé F., Sültmann H., Altevogt P., **“Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: role of proteolytic cleavage.”** Gynecologic oncology, 122:437-446. (2011)

- Saltz L.B, Rubin M., Hochster H., “*Cetuximab (IMC-C225) plus irinotecan (CPT-11) is active in CPT-11 refractory colorectal cancer (CRC) that expresses epidermal growth factor receptor (EGFR)*”. Proceedings of Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, p.3. (2001)
- Samuels Y., Wang Z., Bardelli A., Silliman N., Ptak J., Szabo S., Yan H., Gazdar A., Powell S. M., Riggins G. J., Riggins J. K.V., Markowitz S., Kinzler K. W., Vogelstein B., Velculescu V.E. “*High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers*”. Science, 304. (2004)
- Sartore-Bianchi A., Martini M., Molinari F., Veronese S., Nichelatti M., Artale S., Di Nicolantonio F., Saletti P., De Dosso S., Mazzucchelli L., Frattini M., Siena S., Bardelli A. “*PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies.*” Cancer Research, 1851-1857. (2009)
- Scartozzi M., Giampieri R., Maccaroni E., Mandolesi A., Biagetti S., Alfonsi S., Giustini L., Loretelli C., Faloppi L., Bittoni A., Bianconi M., Del Prete M., Bearzi I., Cascinu S. “*Phosphorylated AKT and MAPK expression in primary tumours and in corresponding metastases and clinical outcome in colorectal cancer patients receiving irinotecan-Cetuximab*” Journal of Translational Medicine, 10:71 (2012)
- Schirle M, Bantscheff M, Kuster B. “*Mass Spectrometry-Based Proteomics in Preclinical Drug Discovery*”. Chemistry and Biology 19:72-84. (2012)
- Seoane J., Le H.V., Massagué J. “*Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage*”. Nature, 419:729-34. (2002)
- Serrano M., Lee H. W., Chin L., Cordon-Cardo C., Beach D., DePinho R.A. “*Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality*”. Cell, 85:27-37 (1996).
- Sevignani C., Wlodarski P., Kirillova J., Mercer W.E., Danielson K.G., Iozzo R.V., Calabretta B. “*Tumorigenic conversion of p53-deficient colon epithelial cells by an activated Ki-ras gene*”. Journal of Clinical Investigation, 101(8):1572-80. (1998)
- Shin D.Y., Sung Kang H., Kim G.Y., Kim W.J., Yoo Y.H., Choi Y.H. “*Decitabine, a DNA methyltransferases inhibitor, induces cell cycle arrest at G2/M phase through p53-independent pathway in human cancer cells*”. Biomed Pharmacotherapy, 67:305-11 (2013).
- Skriner, K., Adolph, K., Jungblut, P. R., Burmester, G. R., “*Association of citrullinated proteins with synovial exosomes*”. Arthritis and rheumatism. 3809-3814. (2006)
- Sobin L, Hermanek P. “*International Union Against Cancer (UICC): TNM classification of malignant tumours 4th edition*”. (1987)
- Talseth-Palmer B.A., Holliday E.G., Evans T.J., McEvoy M., Attia J., Grice D.M., Masson A.L., Meldrum C., Spigelman A. e Scott R.J. “*Continuing difficulties in interpreting CNV data: lessons from a genome-wide CNV association study of Australian HNPCC/Lynch syndrome patients*”. BMC Medical Genomics, 6:10. (2013)
- Tan C., Du X. “*K-RAS mutation testing in metastatic colorectal cancer*”. World Journal of Gastroenterology 18(37):5171-5180. (2012)
- Tarakji B., Baroudi K., Hanouneh S., Nassani M.Z., Alotaibi A.M., Kharma M.Y., Azzeghaiby S.N. “*Expression of p21 is dependent or independent of p53 in carcinoma ex pleomorphic adenoma (undifferentiated and adenocarcinoma type)*”. Polish Journal of Pathology, 63:286-91. (2012)

- Van Cutsem E., Oliveira J., “*On behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Primary colon cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up*”. *Annals of Oncology: Oxford Journals, Medicine and Health*, 20:iv49-50. (2009)
- Van Cutsem E., Nordlinger B., Cervantes A., “*On behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for treatment*”. *Annals of Oncology: Oxford Journals, Medicine and Health*, 21:v93-7. (2010)
- Van Roon E.H., Boot A., Dihal A.A., Ernst R.F., van Wezel T., Morreau H., Boer J.M. “*RAF mutation-specific promoter methylation of FOX genes in colorectal cancer*”. *Clinical Epigenetics*, 5:2. (2013)
- Vincenzi B., Zoccoli A., Pantano F., Venditti O., Galluzzo S., “*Cetuximab: from bench to bedside*”. *Current Cancer Drug Targets*, 80-9. (2010)
- Vlahos C.J., Matter W.F., Hui K.Y., Brown R.F. “*A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-Kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4one (LY294002)*”. *Journal of Biological Chemistry*, 269(7):5241-8. (1994)
- Yokota T., “*Are K-RAS/BRAF mutations potent prognostic and/or predictive biomarkers in colorectal cancers?*” *Anti-cancer Agents Medicinal Chemistry*, 12(2):163-71. (2012)
- Yuen S.T., Davies H., Chan T.L., Ho J.W., Bignell G.R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Tsui W.W., Chan A.S., Futreal P.A., Stratton M.R., Wooster R., Leung S.Y. “*Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and K-RAS mutations in colorectal neoplasia*”. *Cancer Research*, 6451-5. (2002)
- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, “*Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF*”. *Cell*, 116: 855-867. (2004)
- Wicki A., Herrmann R., Christofori G. “*K-RAS in metastatic colorectal cancer*”. *Swiss Medical Wkly*. 140:13112. (2010)
- Woods D., Parry D., Cherwinski H., Bosch E., Lees E., McMahon M. “*Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1*”. *Molecular and Cellular Biology*, 17:5598-5611. (1997)
- Zhang Z., Wang C.Z., Du G.J., Qi L.W., Calway T., He T.C., Du W., Yuan C.S. “*Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via ATM/p53-dependent pathway in human colon cancer cells*”. *International Journal of Oncology*, 43:289-96. (2013)