



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

DIPARTIMENTO STEBICEF

**Dottorato di Ricerca in Biologia Cellulare**

(Biologia Cellulare e dello Sviluppo)

ANALISI DEI MECCANISMI ATTRAVERSO CUI RAS REGOLA LA  
PROLIFERAZIONE E L' APOPTOSI IN CELLULE DI  
ADENOCARCINOMA COLORETTALE HT-29

TESI DI

**Dott.ssa Maria Rita Saladino**

COORDINATORE DEL DOTTORATO

**Prof. Gabriella Sconzo**

TUTOR

**Prof. Ida Albanese**

Settore scientifico disciplinare

BIO 06

XXIV CICLO – TRIENNIO 2011-2013

---

DOTTORATO



## ABSTRACT

RAS is a family of small proteins with GTPase activity that regulate proliferation, differentiation and apoptosis in all cell types. The three major isoforms of RAS (H-, K- and N-RAS) differ only in the last 25 amino acids which are the site of different post-translational modifications that lead to diverse subcellular localization and efficiency of activation of alternative pathways of signal transduction. This might explain, at least in part, the different biological effects of the RAS isoforms in the cells. RAS mutations are a common event in tumorigenesis and in colorectal carcinomas the mutations in K-RAS are more frequent than mutations in H-RAS. In almost all cases, the genetic alteration is a point mutation in codons 12 or 13, and rarely in codon 61. These mutations lead to a constitutively active protein by inactivating its GTPase activity. However, data indicate in different primary and metastatic tumors that not only mutations of different isoforms of RAS, but also mutations in different codons or different mutations in the same codon of the same isoform of RAS may have diverse biological consequences. To shed more light on the molecular mechanisms responsible for the different effects of RAS mutations, we have used stable clones of HT-29 (a human colorectal adenocarcinoma cell line in which the endogenous RAS genes are wild type) transfected with cDNAs codifying: K-RASG12V (clone K12) and K-RASG13D (clone K13) under the control of a Mifepristone-inducible promoter. We found that the expression of each of these mutated RAS isoforms induces different effects on the growth rate. Cytofluorimetric analysis shows also a differential effect on the cell cycle. In particular, we observe a significant increase in the fraction of cells in the G2/M phase, more relevant in the K13 than in the K12 induced cells. For a better understanding of this phenomenon we investigated the p21<sup>CIP1/WAF1</sup> protein intracellular levels by western blot, identifying a similar increase in the amount of p21 in both clones upon induction of the mutated K-RAS isoforms. This increase persisted, and was actually enhanced, even in the presence of inhibitors of the two main signal transduction pathways operating downstream of RAS, the MEK inhibitor PD98059 and the PI3K inhibitor LY294002. B-RAF and RAF-1 expression is instead decreased by both the mutated isoforms of RAS, in growing as well as in starved cells. The two RAS mutations show the ability to differentially influence the pro-apoptotic (MST2-RASSF1A-LATS1) and anti-apoptotic (MST2-RAF-1) pathways. Cellular death was analyzed by propidium iodide and the caspase assay. The data show an increase in total cell

death rate in both induced clones, but K-RASG13D preferentially induced a significant increase in necrosis while K-RASG12V in apoptosis, with a less pronounced effect. The K-RASG13D interactome was also analysed and compared to that of unstimulated wild type K-RAS by mass spectrometry in Hke3 cells in starving condition (0% serum).

# INTRODUZIONE

## IL CARCINOMA DEL COLORETTO

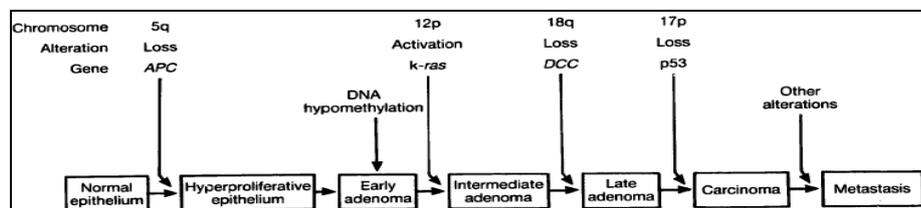
Il tumore è una patologia che coinvolge numerose caratteristiche biologiche come un'alterata proliferazione e adesione cellulare, la capacità di eludere l'apoptosi, l'alterata angiogenesi, la capacità di invadere i tessuti circostanti e di formare metastasi a distanza. Il processo della carcinogenesi prevede mutazioni attivanti di geni che regolano positivamente la proliferazione cellulare, come *ras*, *c-myc* e *bcr-abl*, detti proto-oncogeni, e/o mutazioni con effetto inattivante o anche delezioni di geni che regolano negativamente il ciclo cellulare, come *p53* e *apc*, detti onco-soppressori.

Il carcinoma coloretale (CRC) è una delle neoplasie più frequenti e a più alto tasso di mortalità in tutto il mondo, ma con una maggiore incidenza nei Paesi industrializzati, perchè oltre a fattori genetici, concorrono nello sviluppo del tumore anche fattori ambientali e comportamentali, come il consumo di grassi animali, una dieta ipercalorica, un eccessivo consumo di alcol e una ridotta attività fisica (Niemenen et al., 2012). Invece, un'alimentazione ricca di frutta e vegetali sembra svolgere un ruolo protettivo per l'alto contenuto di fibre e vitamine (Willet, 2001; Fujita et al., 2013).

Il CRC è tra le neoplasie più studiate, non solo a causa della sua elevata incidenza, ma anche perché i suoi stadi di sviluppo sono più facilmente identificabili rispetto ad altri tipi di tumori. Tre pathways di instabilità genetica sono stati associati con il CRC: l'instabilità dei microsatelliti (MSI) (Ionov et al, 1993), l'instabilità cromosomica (CIN) (Al-Sohaily et al., 2012; Armaghany et al., 2012) e l'ipermetilazione delle isole CpG (CIMP) (Berg et al., 2011). L'instabilità dei microsatelliti è stata riscontrata in più del 95% dei pazienti con sindrome di Lynch o carcinoma coloretale ereditario non poliposico (HNPCC) (Banno et al., 2012). I tumori MSI sono caratterizzati da un alto accumulo di mutazioni nelle sequenze dei microsatelliti, brevi sequenze nucleotidiche ripetute in tandem, che possono andare incontro a delezione o duplicazione durante la replicazione del DNA. L'accumulo di mutazioni è causato da un difetto nei geni del *mismatch repair* (MMR) come *hMLH1*, *hMLH3*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6* e *hPMS1*, *hPMS2* implicati nella riparazione dei danni del DNA (Cardoso et al., 2007) o nei geni che influenzano l'espressione dei geni MMR (Talseth-Palmer et al., 2013). La MSI può essere di grado elevato (MSI-H) se l'instabilità è riscontrata nel 30% dei markers o di basso grado (MSI-L) se l'instabilità riguarda il 10-29% dei marker (Armaghany et al.,

2012). Un'alta instabilità dei microsatelliti è stata riscontrata nel 12% dei tumori del colon sporadici che insorgono preferenzialmente in tarda età, nel sesso femminile, nel colon prossimale e si presentano scarsamente differenziati o con un fenotipo mucinoso (Jass et al., 2006). Mutazioni o ipermetilazione del promotore nei geni *hMLH1* e *hMSH2* sono la causa più comune di CRC sporadici MSI-H e del carcinoma coloretale ereditario non poliposico, mentre mutazioni negli altri geni MMR sono molto rare. Questo fenomeno potrebbe essere spiegato dal fatto che la perdita di *hMLH1* e *hMSH2* è associata con la completa inattivazione del complesso MMR.

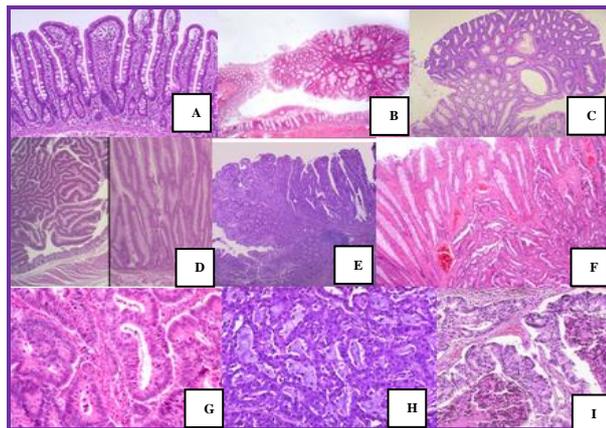
L'instabilità cromosomica porta alla perdita di alleli localizzati in diversi cromosomi (5q, 12q, 18q e 17p) (Jass et al., 2006) e si riscontra nella poliposi adenomatosa familiare (FAP), una malattia ereditaria autosomica dominante, in cui centinaia o migliaia di polipi adenomatosi (tubulari o tubulo-villosi) si sviluppano nel coloretto degli individui affetti, in cui l'alterazione alla base della patologia è una mutazione germinale nel gene *apc* (*Adenomatous Polyposis Coli*) (Kudo et al., 2013). La FAP si sviluppa seguendo un modello "multistep" proposto da Vogelstein e Fearon (Fearon et al., 1990; Vogelstein et al., 1993) che consta di tre stadi di progressione schematizzati in figura 1 in cui l'evoluzione morfologica del tessuto è correlata con una specifica alterazione genetica. Un'analoga modalità di progressione tumorale si osserva nei tumori sporadici di tipo CIN.



**Fig. 1.** Rappresentazione schematica del modello "multistep" della poliposi adenomatosa familiare (FAP) proposto da Vogelstein e Fearon (Fearon et al., 1990). Ad una specifica mutazione genetica corrisponde un ben definito fenotipo tissutale.

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 dell'oncosoppressore *apc*, formando una massa chiamata polipo o adenoma di tipo tubulare (Fig. 2B). Il gene *apc* è localizzato sul cromosoma 5 e codifica per una proteina che regola negativamente il pathway di WNT/ $\beta$ -CATENINA, implicato nell'adesione, nella motilità, nella proliferazione, nel differenziamento, nella sopravvivenza e nella morte cellulare. Nell'adenoma le mutazioni nel gene *apc* portano all'assenza della proteina o alla produzione di una proteina tronca, interferendo con il legame alla  $\beta$ -CATENINA e determinando

l'attivazione costitutiva del pathway di WNT (Syed et al., 2011). Il secondo stadio è l'adenoma intermedio o adenoma villosa caratterizzato da mutazioni che iperattivano il proto-oncogene *k-ras* localizzato nel cromosoma 12 (Fig. 2D). K-RAS iperattivo promuove la crescita iperplastica nell'epitelio del colon e riduce i contatti cellula-cellula (Takayama et al., 2001). La delezione dei geni *dcc* (*deleted in colon cancer*) e *smad* (*small mother against decapentaplegic*) 2/4, localizzati nel cromosoma 18 porta alla formazione di un adenoma tardivo (Fig. 2E). Il gene *dcc* codifica per una CAM coinvolta nelle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice; le proteine SMAD 2/4 sono implicate nel pathway anti-proliferativo mediato dal TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ). Infine, mutazioni e/o delezioni del gene *p53* nel cromosoma 17 portano al carcinoma *in situ* (Fig. 2G). 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 (Fig. 2I).



**Fig. 2.** La figura mostra le alterazioni dell'epitelio del colon-retto durante la progressione adenoma-carcinoma. **A:** epitelio senza alterazioni; **B:** adenoma tubulare; **C:** adenoma tubulo-villoso; **D:** adenoma villosa; **E:** adenoma tardivo; **F:** adenocarcinoma; **G:** carcinoma *in situ*; **H:** cellule tumorali in attiva mitosi; **I:** carcinoma metastatico.

E' importante tener conto che la tumorigenesi del CRC non sempre può essere distinta sulla base di questi due pathways, infatti è stato dimostrato che un piccolo sottogruppo di CRC si sviluppa sia con MSI che CIN (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).

I tumori con fenotipo CIMP possono essere distinti in due classi: CIMP1 o CIMP-High (CINP-H) che mostrano instabilità dei microsatelliti e mutazioni in *b-raf* (*pV600E*) (Van

Roon et al., 2013) e CIMP2 o CIMP-Low (CINP-L) caratterizzati da alterazioni in *k-ras* e che raramente presentano instabilità dei microsattelliti 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 una tendenza all'ipometilazione del genoma, ma le isole CpG di alcuni promotori mostrano un incremento della metilazione che è associata 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  $p16^{\text{INK4a}}$  è associata con un fenotipo tumorale metastatico (Shima et al., 2011). L'E-CADERINA è una molecola di adesione  $\text{Ca}^{2+}$  dipendente quindi la ridotta espressione, in seguito alla metilazione del suo promotore, altera il meccanismo di adesione cellula-cellula. La proteina  $p16^{\text{INK4a}}$  è un inibitore delle chinasi ciclina dipendenti 4 e 6 e previene la fosforilazione di RB bloccando in fase G1 il ciclo cellulare. Inoltre, dati presenti in letteratura dimostrano che l'ipermetilazione del promotore di *rassf2a*, regolatore negativo di RAS, promotore dell'apoptosi e dell'arresto del ciclo cellulare, è un evento frequente nel CRC e positivamente correlato con la mutazione in *k-ras/b-raf* e MSI (Park et al., 2006).

L'eterogeneità molecolare del cancro coloretale è uno dei principali fattori responsabili delle differenti risposte dei pazienti ai trattamenti. Per questo motivo, lo sviluppo di test di *screening* che potrebbero permettere di identificare le alterazioni molecolari coinvolte nella carcinogenesi coloretale risulta di notevole importanza.

## **LA FAMIGLIA DEI PROTONCOGENI RAS**

Una famiglia genica frequentemente mutata nei tumori è quella delle proteine GTPasi monomeriche RAS che sono presenti in tutti gli eucarioti e sono regolatori critici di numerose funzioni fisiologiche quali la proliferazione, il differenziamento e la morte cellulare (Castellano et al., 2011). La presenza dei geni *ras* nel lievito e negli invertebrati ha permesso di analizzare le funzioni delle corrispondenti proteine in organismi che possono essere, più facilmente degli eucarioti superiori, geneticamente manipolati. La crescita di *Saccharomyces cerevisiae*, lo sviluppo vulvare in *Caenorhabditis elegans* e lo sviluppo dei fotorecettori in *Drosophila melanogaster* rappresentano processi *ras* dipendenti con fenotipi alterati facilmente riconoscibili.

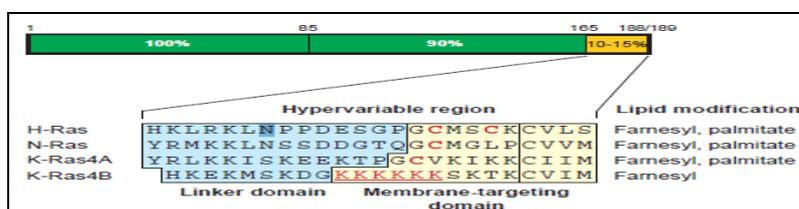
Nei mammiferi questa famiglia consta di tre principali protooncogeni, Harvey (H)-*ras*, Kirsten (K)-*ras* e Neuroblastoma (N)-*ras*, che sono stati identificati più di un quarto di secolo fa a

causa della loro frequente attivazione oncogenica in tumori umani e sono i membri fondatori della più ampia superfamiglia delle piccole proteine G monomeriche in cui sono incluse più di 150 piccole GTPasi, divise in almeno cinque sottofamiglie (RAS, RHO/RAC, RAB, ARF, e RAN) sulla base della sequenza primaria (Lowy et al., 1993).

Il gene *k-ras* codifica per *splicing* alternativo dell'esone 4 per due proteine, K-RAS4A e K-RAS4B. Il livello di mRNA codificanti per l'isoforma 4B è superiore a quello degli mRNA per l'isoforma 4A, per cui ci si riferisce a K-RAS4B come K-RAS. I tre geni *ras* umani hanno una struttura comune: un primo esone non codificante e quattro esoni codificanti. Gli introni differiscono sia per dimensioni che per sequenza ma possiedono siti di *splicing* conservati.

I promotori hanno a monte un alto contenuto in GC e mancano di TATA box.

Le proteine H-RAS, N-RAS e K-RAS hanno un peso molecolare di 21 kDa e contengono 189 aminoacidi, ad eccezione dell'isoforma K-RAS4A che invece possiede 188 aminoacidi (Lowy et al., 1993). I prodotti proteici presentano un'omologia di circa il 100% per i primi 165 aminoacidi N-terminali dove si trovano il sito catalitico e il dominio di interazione con gli effettori ma differiscono per i 25 residui C-terminali, che rappresentano la regione ipervariabile (HVR) (Fig. 3).

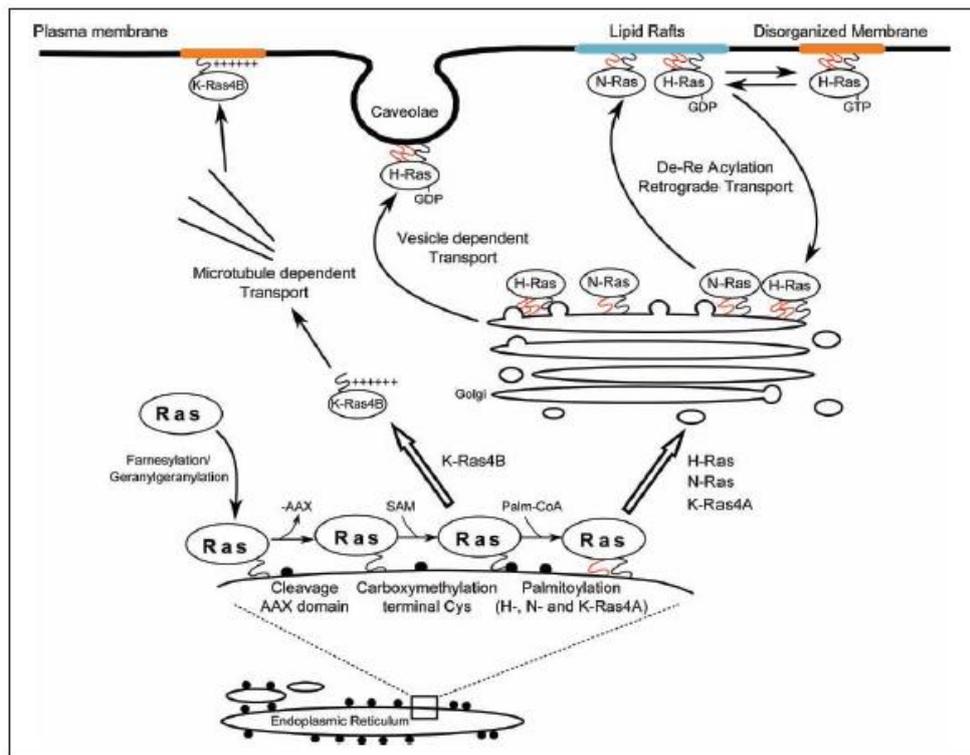


**Fig. 3.** Rappresentazione schematica della regione HVR delle diverse isoforme di RAS: H-RAS, N-RAS, K-RAS4A e K-RAS4B. Le cisteine che subiscono la palmitoilazione sono mostrate in rosso; il dominio polibasico è mostrato in rosso e sottolineato (Prior et al., 2001).

La regione HVR termina con un motivo CAAX (C= cisteina, A= aminoacido alifatico e X= serina o metionina) che è sito di specifiche modifiche post-traduzionali necessarie per il legame della proteina, altrimenti solubile, ai microdomini della membrana plasmatica (Wright et al., 2006). La prima modifica post-traduzionale coinvolge la cisteina in posizione 185 che viene farnesilata da una proteina farnesil-transferasi nel citoplasma. Questo cambiamento aumenta l'idrofobicità nel dominio C-terminale e facilita il legame alla membrana del reticolo endoplasmatico rugoso, dove il motivo -AAX viene tagliato da RCE1. La cisteina farnesilata viene metilata da una isoprenil-cistein-carbossimetil-transferasi (ICMT). Il gruppo farnesile conferisce solo una debole affinità per la membrana, per cui sono necessarie ulteriori

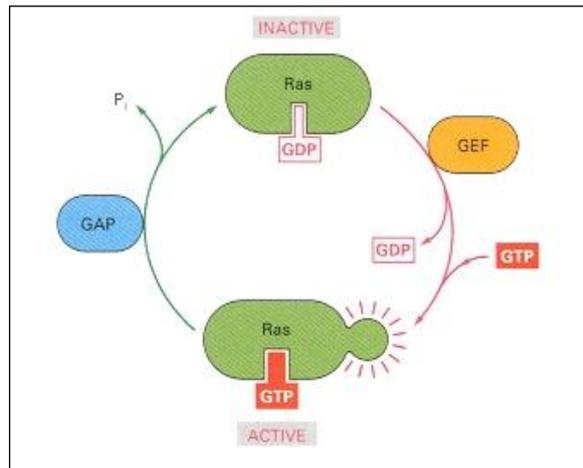
modifiche per la corretta localizzazione delle proteine (Jun et al., 2013). In particolare, la proteina H-RAS è palmitolata nelle cisteine 181 e 184, N-RAS e K-RAS4A sono monopalmitolate rispettivamente nelle cisteine 181 e 180. Per l'isoforma K-RAS4B è il dominio polibasico di sei lisine (175-180) nella regione HVR ad essere coinvolto nel controllo del traffico e nell'ancoraggio alla membrana attraverso interazioni elettrostatiche con i fosfolipidi anionici posizionati sul versante interno della membrana (Prior et al., 2001). Le tre isoforme di RAS si localizzano in specifici microdomini di membrana in base al tipo di ancora lipidica (Fig. 4). Questa localizzazione differenziale sulla base delle modifiche post-traduzionali ha importanti conseguenze sull'attivazione dei pathways a valle e di conseguenza potrebbe spiegare i differenti effetti biologici di RAS su proliferazione, sopravvivenza, differenziamento cellulare e modifiche del citoscheletro. I gruppi palmitoilici di H-RAS e N-RAS mediano una forte associazione con le *lipid rafts* che sono regioni di membrana caratterizzati da sfingolipidi, glicolipidi e colesterolo. Inoltre, sembra che H-RAS sia in un equilibrio dinamico tra *lipid rafts* e microdomini non *rafts* e che il legame della proteina con il GTP, e quindi la sua attivazione, sposti l'equilibrio a favore dell'associazione in queste ultime regioni di membrana. Questo cambiamento di localizzazione del dominio di membrana sembra essere necessario per l'attivazione degli effettori a valle (Prior et al., 2001). N-RAS, invece, sembra muoversi in direzione opposta rispetto a H-RAS quando è attivato (Castellano et al., 2011). K-RAS è normalmente localizzato al di fuori dei *rafts* lipidici e l'assenza di gruppi acilici idrofobici facilita il suo spostamento citosolico dagli organelli intracellulari alla membrana plasmatica, attraverso un meccanismo Golgi-indipendente (ancora non ben conosciuto), contrariamente a quanto avviene invece per H-RAS e N-RAS (Choy et al., 1999; Prior et al., 2001) (Fig. 4).

Il rilascio di K-RAS dalla membrana plasmatica è determinato da fosforilazioni in residui amminioacidici situati nella regione polibasica. In particolare, la fosforilazione nella serina 181 di questa regione, mediata dalla chinasi PKC, promuove la localizzazione della proteina nella membrana esterna dei mitocondri innescando l'apoptosi (Sung, et al., 2013). Queste modifiche postraduzionali sono importanti perché influenzano l'interazione delle diverse isoforme di RAS con gli effettori a valle e quindi da questo potrebbe dipendere la specifica funzione di ciascuna isoforma (Castellano et al., 2011).



**Fig. 4.** Rappresentazione del processamento, trasporto e localizzazione delle proteine K-RAS, H-RAS e N-RAS. Le differenze nella struttura primaria e nelle modifiche postraduzionali causano differenti trasporti intracellulari e una diversa localizzazione subcellulari delle tre proteine RAS (Castellano et al., 2011).

Tutte le proteine RAS condividono una comune capacità di legare e idrolizzare il GTP (guanosintrifosfato). La proteina RAS associata alla membrana è in uno stato inattivo quando lega il nucleotide guanilico GDP mentre è attiva quando lega il più abbondante GTP. Lo scambio avviene grazie al fattore di scambio del nucleotide guanilico (GEF) che stimola la dissociazione del GDP. La proteina RAS ha una debole attività GTPasi intrinseca che le permette di idrolizzare il GTP nuovamente in GDP; tale attività è accelerata notevolmente dalla proteina GAP (proteina attivante la GTPasi). Si viene a formare così un ciclo di attivazione e disattivazione (Fig. 5).



**Fig. 5.** Rappresentazione schematica dei meccanismi che regolano l'attivazione e l'inattivazione della proteina RAS ([http://www.molecularlab.it/public/data/GFPina/200611319058\\_Fig.%2015-54.JPG](http://www.molecularlab.it/public/data/GFPina/200611319058_Fig.%2015-54.JPG)).

Quando una molecola segnale si lega a un recettore tirosina chinasi come ad esempio il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) o il recettore del fattore di crescita derivato dalla piastrina (PDGFR), questo va incontro a dimerizzazione e ad attivazione della sua attività chinasi. Le tirosine fosforilate del recettore sono riconosciute dal dominio SH2 di una proteina adattatrice GRB2 che, a sua volta, recluta a livello della membrana una proteina GEF (*guanin nucleotide exchange factor*) tramite un dominio SH3. Sono state identificate diverse proteine GEFs fra cui CDC25 in *S. cerevisiae*, SOS in *D. melanogaster* e CDC25<sup>Mm</sup> nel topo (Lowy et al., 1993). Infine, GEF interagendo con RAS e stimolando lo scambio GDP/GTP ne modifica la conformazione rendendola capace di interagire con i suoi effettori, determinando così l'attivazione di numerosi pathways a valle.

Due sono gli effettori principali di RAS: la proteina RAF, che attiva a sua volta la cascata delle MAP-chinasi per regolare la proliferazione e il differenziamento cellulare, e la fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3K) per il controllo della sopravvivenza cellulare (Lowy et al., 1993). Queste due principali vie di trasduzione del segnale insieme con la differente localizzazione delle proteine RAS nei microdomini di membrana possono spiegare i differenti effetti cellulari osservati. Inoltre, le isoforme H-RAS e K-RAS sembrano avere una diversa affinità per le proteine RAF e PI3K. In particolare, è stato osservato che H-RAS attiva preferenzialmente il pathway della PI3K, mentre K-RAS sembra un attivatore migliore della cascata delle MAPK (Yan et al., 1998; Grewal et al., 2011). Tuttavia, questa distinzione non sembra essere assoluta, infatti in letteratura sono presenti delle eccezioni (Romano et al.,

2010; Matallanas et al., 2011). Infine, la specifica risposta cellulare all'attivazione di RAS dipende anche dall'intensità e dalla durata del segnale che l'ha provocata.

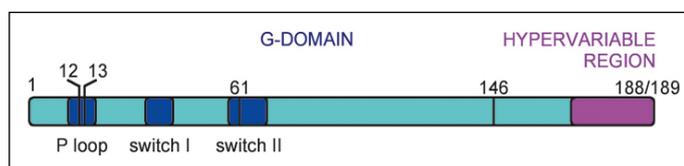
## **RUOLO DI RAS NELLA TUMORIGENESI DEI TUMORI UMANI**

La famiglia dei geni *ras* si trova frequentemente mutata nei tumori (Chow et al., 2012). Diversi studi dimostrano che l'incidenza di mutazione dei geni *ras* varia tra i diversi tipi tumorali. In particolare l'incidenza più alta si trova nei tumori del pancreas esocrino e del colon. Inoltre, è stata riscontrata una certa correlazione tra il tipo di tumore e l'isoforma di RAS mutata. L'oncogene *K-ras* è mutato nel 90% dei carcinomi del pancreas esocrino, nel 50% di quelli del colon, nel 30% dei tumori polmonari non a piccole cellule, nel 20% dei melanomi e solo occasionalmente nelle neoplasie dell'ovaio, dell'endometrio, della cervice uterina, del rene e del fegato. *H-ras* si trova più frequentemente mutato nei tumori della mammella e della vescica; ed infine alterazioni in *N-ras* sono coinvolte nei melanomi e nelle leucemie. Esistono tuttavia alcune eccezioni come il tumore alla tiroide in cui sembra esserci una mancanza di specificità (Bos, 1989; Wicki et al., 2010; Grewal et al., 2011).

Queste osservazioni sulla correlazione tra il tipo di tumore e l'isoforma trasformante di RAS coinvolta possono essere spiegate da studi *in vivo* su modelli murini. Gli animali che esprimono l'oncogene *k-ras* mutato sviluppano un'iperplasia diffusa in tutto l'epitelio del colon, diversamente dai topi che hanno *N-ras* mutato che, invece, sembra avere un ruolo nel sopprimere l'apoptosi. Quindi è possibile che le mutazioni in *N-ras* si verifichino in quei tumori che si sviluppano in un contesto di costante stimolo apoptotico, per esempio, nei CRC che originano in soggetti con un'inflammatione cronica del tratto gastrointestinale (Haigis, et al 2008).

Nel tumore al coloretto mutazioni del gene *K-ras*, localizzato nel cromosoma 12p12.1, sono state associate con l'inizio e la progressione del cancro. Le alterazioni in *K-ras*, una volta acquisite, vengono mantenute durante lo sviluppo del tumore e sono eccellenti *targets* per i test diagnostici. Le mutazioni oncogene nei geni *ras*, che sono sempre puntiformi e *missense*, interessano prevalentemente il codone 12 (GGT=glycine) e/o 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 sporgono nel sito catalitico e sono importanti per l'attività GTPasi che viene ridotta o inibita rendendo la proteina RAS iperattiva quando, per effetto delle mutazioni, si ha una sostituzione amminoacidica. 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 nucleotide guanilico trifosfato; 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 (Wicki et al., 2010) (Fig. 6).



**Fig. 6.** Rappresentazione schematica della localizzazione dei residui aminoacidici 12, 13 e 61. Il dominio altamente conservato (o G-domain) 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).

La maggior parte delle mutazioni osservate sono transizioni  $G > A$  e trasversioni  $G > T$  (Palmirotta et al., 2011). Le mutazioni di *k-ras* più comuni nel cancro al colon sono G12D, G12A, G12R, G12C, G12S, G12V e G13D, e fra queste le più frequenti sono la G12D (in cui la glicina in posizione 12 è sostituita da un aspartato), 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). Dati in letteratura associano la proteina oncogenica K-RASG12V con un aumento della letalità e del rischio di recidiva nei carcinomi del coloretto, rispetto alla proteina K-RASG12D (Mulla et al., 1999).

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 [anticorpo anti-recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR)] perché considerati refrattari alla terapia (Wicki et al., 2010). Tuttavia, *in vitro* e *in vivo* nei topi è stato dimostrato che solo le cellule che portano la mutazione nel codone 12 sono insensibili all'anticorpo anti-EGFR. Inoltre, recenti *trials* clinici retrospettivi su pazienti con CRC metastatico, con mutazione in posizione 13 di *K-ras* e che hanno ricevuto il trattamento con cetuximab mostrano un aumento della sopravvivenza. Quindi, la mutazione nel codone 13 di *K-ras* può essere considerata un biomarker predittivo nella risposta all'anticorpo (De Roock et al., 2010).

Pertanto, comprendere i differenti effetti molecolari che isoforme oncogeniche di RAS diverse inducono *in vitro* risulta essere una problematica di notevole importanza perché potrebbe consentire di individuare per singoli pazienti terapie più mirate e più adeguate al loro background genetico.

## I PATHWAYS ATTIVATI DA RAS

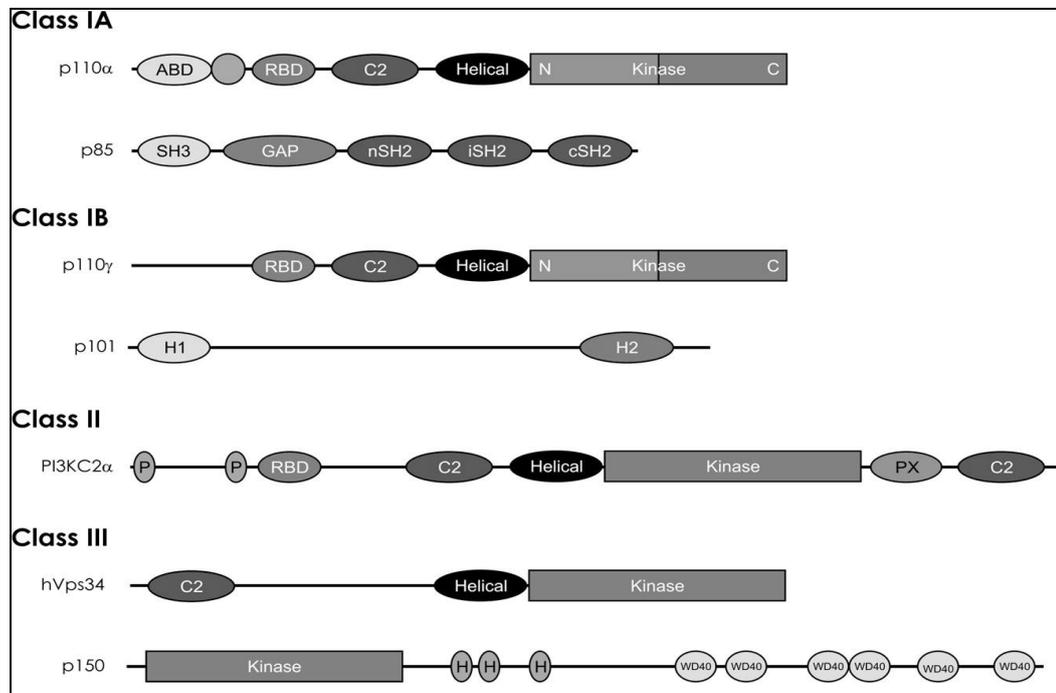
RAS legata al GTP è in grado di interagire con numerosi effettori e la localizzazione differenziale sulla base delle modifiche post-traduzionali ha importanti conseguenze sull'attivazione dei pathways a valle e di conseguenza potrebbe spiegare i differenti effetti biologici di RAS.

Il pathway a valle di RAS più studiato è quello delle proteine-serine/treonine chinasi chiamate MAPK (*mitogen-activated protein kinases*). L'interazione tra RAS e la MAPK chinasi chinasi (MAPKKK) inizia la cascata delle MAPK che prevede l'attivazione sequenziale per fosforilazione di altre proteine chinasi a valle, MAPK chinasi (MAPKK) e MAPK, che trasmettono un segnale mitogenico a fattori di trascrizione nucleari (Van Aelst et al., 1993). Nei mammiferi le MAPKKK sono una famiglia di proteine citoplasmatiche chiamate RAFs che comprende A-RAF, B-RAF e RAF-1 (C-RAF). RAF è una serina treonina chinasi che è attivata da una serie di complessi eventi: reclutamento alla membrana plasmatica per interazione con RAS (Yan et al., 1998); dimerizzazione delle proteine RAF; fosforilazione e defosforilazione su differenti residui aminoacidici (Fabian et al., 1993); dissociazione dalle proteine RKIP (*RAF kinase inhibitory protein*). RAF-1 fosforilata a livello delle serine (Ser-) 43, 259 e 621 è legata alla proteina 14- $\sigma$ -3-3 che la tiene in una conformazione inattiva; quando arriva un segnale di attivazione, la Ser- 621 viene defosforilata da una fosfatasi non ancora identificata, mentre la Ser-259 viene defosforilata dalla fosfatasi PP2A (proteina fosfatasi 2A) e RAF-1 si dissocia dalla proteina 14- $\sigma$ -3-3. Le successive fosforilazioni in Ser-338, tirosina (Tyr-) 340 e 341 da parte della famiglia di chinasi SRC attivano la proteina RAF-1. I residui Tyr-340 e -341 sono conservati anche nell'isoforma A-RAF (Tyr-299 e -300) ma sono sostituiti dall'acido aspartico in B-RAF (Asp-492 e -493) (Fabian et al., 1993). Il residuo aminoacidico Ser-338 di RAF-1 è conservato in tutte e tre le isoforme di RAF; tuttavia in B-RAF questo sito (Ser-445, equivalente a Ser-338) è costitutivamente fosforilato. I residui di acido aspartico e la costitutiva fosforilazione in serina 445 aumentano l'attività chinastica di B-RAF di 15-20 volte, rispetto alle altre proteine RAFs (Guan et al., 2000). Tutte e tre le isoforme di RAFs possono legare RAS a livello del loro dominio N-terminale, che contiene il dominio RBD (*RAS binding domain*), e fosforilare le MAPKK, chiamate MEK1/2, a livello del sito catalitico C-terminale; tuttavia recenti studi hanno dimostrato che l'isoforma B-RAF è più efficiente nell'attivare le proteine MEKs e sembra anche essere coinvolta nell'attivazione di RAF-1 attraverso un meccanismo ancora poco conosciuto (McCubrey et al., 2006). Entrambe le MEKs possono fosforilare le MAPKs in specifici residui di serina e

treonina. Nei mammiferi le MAPKs sono: ERK1/2, JNK 1/2/3 (dette anche SAPKs), p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$  chinasi e ERK5. Generalmente il pathway delle proteine ERKs è attivato da fattori di crescita, mentre i pathways di JNKs, p38 chinasi e ERK5 sono attivati da stress cellulare e fattori di crescita (Roberts, et al., 2007). Il pathway delle MAPK regola la proliferazione e il differenziamento cellulare, ma sembra anche essere implicato nell'inibizione della crescita cellulare. La proteina RAS, infatti, insieme a RAF o ad altre proteine, induce l'espressione degli inibitori delle CDK (proteine chinasi ciclina-dipendenti), provocando un arresto del ciclo cellulare attraverso almeno tre pathways: p19<sup>ARF</sup>/p53; p16<sup>INK4a</sup> (o p15<sup>INK4b</sup>)/Rb; e p21<sup>CIP/WAF1</sup> (Crespo et al., 2000; Lin et al., 1998). Il ruolo del pathway delle MAPK sembra dipendere dal tipo cellulare. In particolare, l'overespressione di RAFs in cellule ematopoietiche è associata a proliferazione, mentre nelle cellule di Schwann di ratto causa l'arresto del ciclo cellulare. Inoltre, l'effetto dell'attivazione del pathway delle MAPK sembra anche dipendere dall'isoforma di RAF che viene iperspressa: in fibroblasti NIH-3T3, A-RAF determina la progressione del ciclo cellulare aumentando l'espressione delle cicline D, cicline E, CDK2 e CDK4 e diminuendo l'espressione di p27; invece, B-RAF e RAF-1 portano ad un arresto del ciclo cellulare in fase G2/M aumentando i livelli di p21 (McCubrey et al., 2006). La proteina p21 può essere attivata in maniera p53 dipendente o indipendente e l'induzione di questo inibitore del ciclo cellulare sembra essere un importante indicatore di un arresto della crescita cellulare MAPK-dipendente. Recenti studi dimostrano che un'induzione p53-dipendente della proteina p21 e della ciclina D avviene nelle cellule che overesprimono RAF-1 (Oh et al., 2002). Le proteine MAPK risultano frequentemente mutate nella tumorigenesi ed in particolare le mutazioni in MEKs e in B-RAF si verificano più spesso rispetto alle mutazioni nelle chinasi ERKs. L'alterazione più comune in B-RAF è una mutazione al nucleotide 600 che sostituisce l'amminoacido valina con l'acido glutammico (V600E). Questa mutazione avviene nel 90% dei casi di melanoma e di tumori alla tiroide e porta ad una proteina costitutivamente attiva e di conseguenza causa una iperattivazione delle chinasi MEK/ERK a valle (Kern et al., 2011; McCubrey et al., 2006; Davies et al., 2002).

Un'altra importante via di segnalazione a valle di RAS è il pathway PI3K/AKT (proteina chinasi B). Le fosfoinositidi 3-chinasi (PI3Ks) sono una famiglia di enzimi che fosforilano il gruppo 3'-idrossile dell'anello inositolo dei lipidi fosfoinositidi di membrana. Questi lipidi fosforilati agiscono da secondi messaggeri e sono coinvolti in molti pathways di trasduzione del segnale che regolano numerosi processi biologici come crescita, differenziamento, apoptosi, organizzazione del citoscheletro, metabolismo glucidico e il pathway di endocitosi.

La famiglia di enzimi PI3Ks è conservata nell'evoluzione e il numero dei componenti aumenta lungo l'albero filogenetico (Engelman et al., 2006). Sulla base dell'omologia di sequenza e del substrato che fosforilano, le PI3Ks di mammifero possono essere suddivise in tre classi (Fig. 7).



**Fig. 7.** Rappresentazione dei domini strutturali, delle subunità catalitiche e regolatrici delle tre classe di PI3K (Hirsch et al., 2008).

Gli enzimi della classe I funzionano come eterodimeri composti da una subunità regolatrice/adattatrice e da una subunità catalitica di 110 kDa detta p110. Esistono quattro geni chiamati *pik3ca*, *pik3cb*, *pik3cd* e *pik3cg*, che codificano per quattro subunità catalitiche altamente omologhe dette p110 $\alpha$  (PI3K $\alpha$ ), p110 $\beta$  (PI3K $\beta$ ), p110 $\delta$  (PI3K $\delta$ ) e p110 $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ). Questa classe può essere suddivisa in due sottogruppi, IA e IB, in base alla subunità regolatrice e alla subunità catalitica. La classe IA PI3Ks è composta dalle subunità catalitiche p110- $\alpha$ , - $\beta$  e - $\delta$  associate con la famiglia p85 di proteine adattatrici (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p55 $\gamma$ , p55 $\alpha$  o p50 $\alpha$ ) ed è attivata principalmente da recettori tirosina chinasi (RTKs). Recentemente è stata dimostrata anche un'attivazione da parte della subunità  $\beta\gamma$  della proteina G trimerica (G $\beta\gamma$ ) della subunità p110 $\beta$ , che quindi potrebbe funzionare da collegamento tra il segnale GPCR (recettore accoppiato a proteina G) e RTK (Murga et al., 2000). Le tre isoforme p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  e p55 $\gamma$  sono codificate da tre geni detti *pik3r1*, *pik3r2* e *pik3r3*; inoltre, *pik3r3* codifica anche per due isoforme più piccole, p55 $\alpha$  e p50 $\alpha$ , attraverso un alternativo sito di inizio di

trascrizione. Le subunità regolatrici hanno la regione di legame a p110 (p110-binding) tra due domini SH2 (*Src homology domain 2*) che riconoscono le tirosine fosforilate del recettore tirosina chinasi. La classe IB ha un solo membro chiamato PI3K $\gamma$  attivato esclusivamente dal recettore accoppiato a proteina G (GPCR). PI3K $\gamma$  è costituita dalla subunità catalitica p110 $\gamma$  codificata dal gene *pik3cg* associata all'adattatore-regolatore p101. La subunità p110 $\gamma$  interagisce con la subunità G $\beta\gamma$  delle proteine G eterotrimeriche ma non con la subunità  $\alpha$  (G $\alpha$ ) (Stephens et al., 1997). Studi recenti hanno dimostrato che la subunità catalitica p110 $\gamma$  può essere legata anche dal regolatore p84 che incrementa la capacità di G $\beta\gamma$  di attivare la PI3K $\gamma$  (Suire et al., 2005). Questa classe I di enzimi fosforila *in vitro* il fosfatidilinositolo 4-fosfato (PtdIns[4]P) in fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (Ptdins[4,5]P<sub>2</sub>) detto PIP2 che *in vivo* è il substrato preferito degli enzimi di classe I; la successiva fosforilazione di PIP2 genera un secondo messaggero conosciuto come fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato (Ptdins[3,4,5]P<sub>3</sub>) o PIP3 (Petiot et al., 2000). La classe II PI3Ks consta di tre differenti geni detti *pik3c2a*, *pik3c2b* e *pik3c2c* che codificano per una subunità catalitica p110-like che non si associa ad una proteina regolatrice (Hirsch et al., 2008). La classe II fosforila *in vitro* Ptdins[4]P ma non Ptdins[4,5]P<sub>2</sub>. La classe III PI3Ks comprende un solo enzima chiamato Vps34 (*vacuolar protein-sorting defective 34*) omologo a Vps34p di *Saccharomyces cerevisiae* che produce solo fosfatidilinositolo 3-fosfato Ptdins[3]P. Nel lievito Vps34p forma un complesso con una serina-treonina chinasi Vps15p che controlla il traffico vescicolare, mentre nell'uomo la subunità catalitica Vps34 forma un complesso con p150, una serina chinasi. Vps34 e p150 sono codificate rispettivamente dai geni *pik3c3* e *pik3r4* (Petiot et al., 2000).

Le subunità catalitiche degli enzimi di classe I hanno quattro regioni omologhe (HR): il dominio catalitico (HR1) coinvolto nel legame all'ATP e al substrato; il dominio elicoidale (HR2) per le interazioni proteina-proteina; il dominio C2 (HR3) che lega i lipidi di membrana; il dominio di legame a RAS (RBD) (HR4). Le PI3Ks di classe II hanno a livello N-terminale due ( $\alpha$  e  $\gamma$  isoforme) o più ( $\beta$  isoforme) motivi ricchi in prolina (P), il dominio RBD, un dominio C2, un dominio elicoidale, il dominio catalitico, un dominio C-terminale detto PX (*phox homology domain*) che permette l'associazione dell'enzima alla membrana e un secondo dominio C2. Vps34, invece, manca del dominio RBD, ma presenta un dominio elicoidale tra il dominio C2 e quello chinasico. Le isoforme di classe I hanno anche un dominio ABD (*adaptor binding domain*) N-terminale, responsabile del legame alla proteina adattatrice della famiglia p85. L'adattatore p85 ha un dominio SH3, una regione omologa alle proteine GAP, un dominio SH2 (iSH2) che interagisce con p110 e altri due domini SH2

(nSH2 e cSH2) a livello C-terminale. Gli adattatori della famiglia p101 hanno due regioni dette H1 e H2, mentre la proteina p150 a cui si lega Vps34 è formata da un dominio chinamico seguito da domini *heat* (H) e *aspartic/tryptofan 40* (WD40) (Hirsch et al., 2008).

PI3K di classe I reclutata a livello della membrana fosforila il fosfatidilinositolo PIP2 in PIP3 che interagisce con le proteine a valle di PI3K. I domini PH (*pleckstrin homology*) rappresentano i migliori elementi di legame ai lipidi prodotti per fosforilazione dalla proteina PI3K, e sono stati ritrovati nel dominio N-terminale della serina-treonina chinasi PKB/AKT (proteina chinasi B/ proteina serina-treonina chinasi), nella proteina BTK (*Bruton's tyrosine kinase*) e nella chinasi PDK1 (fosfatidil-inositolo chinasi 1) (Hirsch et al., 2008). PDK1 e BTK sono attivate direttamente dal legame ai lipidi, mentre AKT è attivata per fosforilazione dalla PDK1. BTK è una proteina chinasi della famiglia TEC che interviene nello sviluppo delle cellule B umane e murine e svolge un ruolo nella regolazione del ciclo cellulare. PDK1 attiva parzialmente la proteina chinasi PKB/AKT fosforilandola a livello della Thr-308 nel dominio chinamico (Lee et al, 2000). La completa attivazione di AKT richiede una seconda fosforilazione nel dominio regolatorio C-terminale sulla Ser-473, che avviene attraverso una chinasi che non è stata ancora identificata. Tuttavia, è stato dimostrato che la fosforilazione di AKT in serina e in treonina indotta dall'insulina può essere impedita dall'inibizione di PI3K, suggerendo che la Ser-473 potrebbe essere fosforilata da un'altra proteina PDK (PDK2) (Alessi et al., 1997; Han et al., 2007).

Nei mammiferi esistono tre isoforme della proteina chinasi B chiamate AKT1 (PKB $\alpha$ ), AKT2 (PKB $\beta$ ) e AKT3 (PKB $\gamma$ ). AKT2 e AKT3 hanno un'omologia rispettivamente del 81 e 83% con la sequenza aminoacidica di AKT1. Queste tre proteine hanno una struttura omologa: un dominio PH (*pleckstrin homology domain*) N-terminale, un dominio chinamico e un dominio regolatorio C-terminale. La chinasi AKT è in grado di fosforilare un ampio range di proteine che controllano la crescita cellulare, la progressione del ciclo cellulare e la sopravvivenza. Per questi motivi la proteina AKT è overespressa in molti tipi di tumori umani come il cancro alla prostata, al polmone, al seno, all'ovario, all'utero, al colon e alla tiroide. In particolare, AKT impedisce l'attivazione della cascata caspasi inibendo direttamente la CASPASI 9 e indirettamente fosforilando ed inattivando BCL-2 e BAD (Lee et al., 2000). Tali proteine sono i regolatori della cascata delle caspasi ed appartengono alla famiglia BCL-2 che include sia proteine anti-apoptotiche come BCL-2 e BCL-x<sub>L</sub> che pro-apoptotiche come BAD, BID, BIK, BAX e BAK. Il complesso BCL-2/BCL-x<sub>L</sub> lega APAF-1 (fattore attivante le proteasi) non permettendo la formazione del complesso APAF-1/CASPASI-9 e la conseguente attivazione

della cascata apoptotica. Il pathway delle caspasi è anche attivato dal citocromo c che, quando rilasciato dal mitocondrio, attiva APAF-1 che a sua volta taglia e attiva la CASPASI-9. AKT sembra capace di prevenire il rilascio del citocromo c attraverso un meccanismo non conosciuto, contribuendo ulteriormente alla sopravvivenza cellulare (Kennedy et al., 1999). AKT svolge un ruolo anti-apoptotico attivando anche fattori di trascrizione come NF- $\kappa$ B (Hirsch et al., 2008). Il pathway PI3K/AKT regola la proliferazione cellulare inattivando la serina-treonina chinasi GSK-3 $\beta$  (chinasi glicogeno sintasi 3) e la famiglia FOXO di fattori di trascrizione (*forkhead box class O*) (AFX [FOXO4], FKHR [FOXO1], e FKHR-L1 [FOXO3a]) sequestrandoli, in seguito a fosforilazione, nel citoplasma. Nelle cellule la GSK-3 $\beta$  è costitutivamente attiva e per fosforilazione inibisce la glicogeno sintasi (GS) che regola il metabolismo glucidico e la  $\beta$ -CATENINA non permettendo la trascrizione 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 *Forkhead* controllano la progressione del ciclo cellulare a livello della transizione G1/S, regolando la trascrizione di geni che codificano per gli inibitori delle chinasi ciclina dipendenti (ICDK) come p27<sup>kip1</sup> e p21<sup>waf-1</sup> (Kops et al., 2002). Pertanto, cellule che presentano una proteina AKT costitutivamente attiva hanno difficoltà ad arrestarsi a livello del *checkpoint* G0/G1. Studi recenti hanno dimostrato che AKT regola anche la progressione del ciclo cellulare in fase G2/M in risposta al danno al DNA, sequestrando nel citoplasma il fattore di trascrizione FOXO3a e riducendo l'espressione della proteina GADD45A (*growth arrest and DNA damage 45a*). AKT può anche fosforilare direttamente p21 e p27, in particolare: p21 è fosforilato in treonina 145 e serina 146 che si trovano all'interno del segnale di localizzazione nucleare (NLS) e al sito di legame all'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA), mentre p27 viene fosforilato nella treonina 157 del sito NLS. Dati presenti in letteratura dimostrano che la fosforilazione di p21 e p27 sequestra queste proteine nel citoplasma dove non possono svolgere il loro ruolo anti-proliferativo (Liang et al., 2003; Osaki et al., 2004). Inoltre, la fosforilazione in serina 146 di p21 sembra aumentare la stabilità della proteina (Li et al., 2002). AKT inoltre promuove la crescita cellulare controllando la sintesi proteica agendo sulla proteina mTOR e fosforila sulla serina 186 la proteina MDM2 (*murine double minute 2*) aumentando l'ubiquitinazione di p53 e la sua degradazione (Ogawara et al., 2002). Il pathway della PI3-K è regolato negativamente da due tipi di fosfatasi: PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) e SHIP (SH2-contenente inositolo 5-fosfato) che defosforila PIP3 riducendo il segnale a valle della

PI3K anche se il prodotto che si forma, PIP2, è ancora in grado di mediare la risposta PI3K-dipendente (Hirsch et al., 2008). Le mutazioni attivanti del gene *pik3ca*, che codifica per la subunità catalitica p110 $\alpha$  della proteina PI3K sono state trovate in molti tumori come il carcinoma gastrico (25%), coloretale (32%), alla mammella (8%), al polmone (4%) e nei glioblastomi (27%) (Samuels et al., 2004). Nei carcinomi coloretali le mutazioni PIK3CA si verificano frequentemente in associazione con mutazioni attivanti K-RAS e B-RAF nelle lesioni non maligne del coloretto, pertanto rappresentano un evento importante nell'indurre la progressione tumorale. (Oda et al., 2008; Velho et al., 2008).

Numerosi studi evidenziano l'esistenza di un cross-talk tra il pathway di PI3K/AKT e la via di RAF/MAPK (Oh, et al., 2002; Bouali et al., 2009). L'attività della chinasi RAF-1 è regolata per fosforilazione della Ser-259 nel dominio regolatorio N-terminale. La fosforilazione di questa serina media il legame alla proteina 14-3-3, risultando in una inattivazione di RAF. AKT sembra capace di fosforilare la serina 259 inibendo l'attività di RAF-1 e la fosforilazione di ERK. Inoltre, AKT sembra capace di fosforilare B-RAF non solo a livello della Ser-364 (equivalente a Ser-259) ma anche in altri due residui aminoacidici, Ser-364 e -428, inattivando la sua attività chinasi (McCubrey et al., 2006; Guan et al., 2000; Rommel et al., 1999). Molecole inibitrici della PI3K come LY294002 aumentano l'attività chinasi di RAF-1 e quindi incrementano l'attivazione di ERK, suggerendo che AKT ha un ruolo nell'inibizione del pathway delle MAPK (Moelling et al., 2002; Zimmermann et al., 1999). Inoltre, entrambi i pathways agiscono fosforilando e inattivando la CASPASI 9 indicando che il cross-talk tra RAF/MEK/ERK e AKT potrebbe, almeno in parte, inibire l'apoptosi (McCubrey et al., 2006).

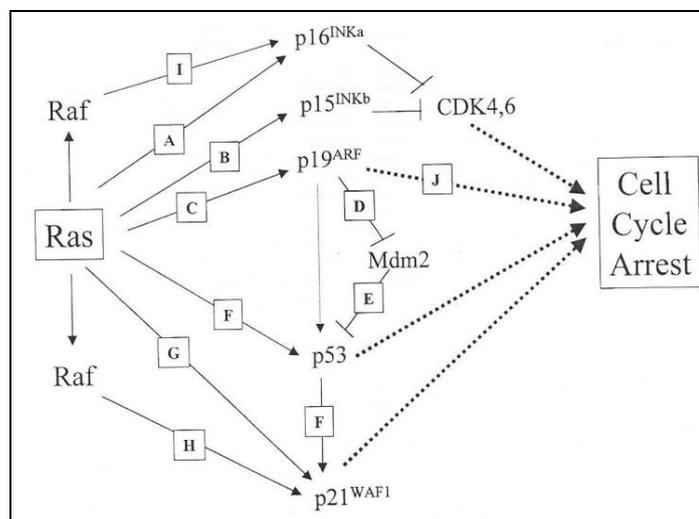
Lo studio di questi due principali pathways a valle di RAS, RAF/MAPK e PI3K/AKT è dunque di notevole importanza per il ruolo che svolgono nel modulare numerosi processi cellulari. Queste vie di trasduzione del segnale sono considerate i principali targets delle terapie antitumorali in diversi tipi di cancro e sono spesso la causa della resistenza tumorale ai chemioterapici. Inoltre, i pathways di RAS e PI3K lavorano parallelamente e/o attraverso cross-talk, così che un beneficio terapeutico ottimale può essere raggiunto solo attraverso l'inibizione di entrambe le vie con specifici inibitori di AKT e MEK.

## **LA PROTEINA RAS E IL CONTROLLO DEL CICLO CELLULARE**

Il corretto verificarsi dei processi all'interno del ciclo cellulare è alla base di una corretta proliferazione. Il ciclo cellulare è un'ordinata serie di eventi che si verificano in risposta a

stimoli mitogeni esterni. La divisione cellulare consta principalmente di due fasi: l'interfase e la fase M o mitosi, di minore durata. L'interfase comprende la fase G1 o 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 o GAP 2, in cui la cellula si prepara per la mitosi. In fase G1 le cellule, in risposta a stimoli esterni, possono oltrepassare il cosiddetto *restriction point* e venire irreversibilmente avviate alla divisione, oppure andare verso una quiescenza reversibile, in una fase detta G0, per rientrare successivamente nel ciclo cellulare in risposta a stimoli proliferativi. La transizione da una fase all'altra del ciclo cellulare avviene in maniera ordinata e altamente regolata da proteine chinasi ciclina-dipendenti (CDKs) e dalle cicline. Le CDKs sono una famiglia di serina/treonina chinasi espresse in maniera costante durante tutto il ciclo cellulare, al contrario delle cicline. Le cicline D sono sintetizzate in risposta a fattori di crescita attraverso l'attivazione di RAS e la loro concentrazione declina alla fine dello stimolo. RAS induce l'espressione delle cicline D attraverso il pathway di ERK, tuttavia dati in letteratura indicano che PI3K potrebbe avere un ruolo nella regolazione dell'espressione e della stabilità di tali cicline (Crespo et al., 2000). Queste cicline legano le CDK4 e CDK6 formando un complesso necessario per l'ingresso in fase G1 poichè 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, bloccando la transizione G1/S, mentre 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). Tale fase è regolata da un complesso costituito dalla ciclina E e la CDK2 che fosforila ulteriormente pRB instaurando un *feedbeek* positivo, che contribuisce all'irreversibilità del processo e promuove la replicazione del DNA. Durante la fase G2, invece, la ciclina A lega 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). Errori durante la replicazione del DNA o nella segregazione dei cromosomi sono alla base del processo di tumorigenesi, pertanto sono necessari punti di controllo o *checkpoints* che si attivano in risposta a danni al DNA o a stimoli proliferativi aberranti. I regolatori chiave in questi punti di controllo sono gli inibitori delle CDK (CKIs) distinti in due famiglie: CIP/KIP e INK4. La prima famiglia include tre membri, p21<sup>CIP1/WAF1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> e p57<sup>KIP2</sup>, i quali sono

inibitori non specifici sia delle CDK che delle cicline. La famiglia INK4 è costituita da quattro membri,  $p16^{INK4a}$ ,  $p15^{INK4b}$ ,  $p18^{INK4c}$  e  $p19^{INK4d}$ , che sono inibitori specifici delle chinasi ciclina D-dipendenti (CDK4 e CDK6) (LaRue et al., 1998). RAS agisce come oncogene trasformante, tuttavia recenti studi evidenziano come in cellule primarie, insieme a RAF o ad altri effettori, induce l'espressione degli inibitori delle CDK, provocando un arresto del ciclo cellulare attraverso almeno tre pathways schematizzati in figura 8:  $p19^{ARF}/p53$ ;  $p16^{INK4a}$  (o  $p15^{INK4b}$ )/Rb; e  $p21^{CIP1/WAF1}$ . La delezione di uno di questi pathways provoca l'immortalizzazione in fibroblasti embrionali murini (MEFs) (Crespo et al., 2000; Kortum, et al., 2006; Delgado et al., 2000).



**Fig. 8.** La proteina RAS attraverso la via di segnalazione di RAF o ad altri effettori induce l'arresto della crescita cellulare attivando differenti pathways che sono stati identificati in cellule primarie (fibroblasti umani e murini) (Crespo et al., 2000).

In particolare, RAS up-regola i livelli della proteina p53 in modo  $p19^{INK4d}$  ( $p14^{ARF}$  in cellule umane) dipendente o indipendente. Successivamente,  $p19^{INK4d}$  inattiva MDM2 con conseguente stabilizzazione di p53 che regola 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, alterazioni nell'adesione cellulare, ipossia e stress ossidativo. La perdita di espressione di p53 causa instabilità genomica e favorisce la progressione tumorale (Kelly-Spratt et al., 2004). La proteina RAS può anche indurre l'espressione dell'inibitore  $p16^{INK4a}$  (o  $p15^{INK4b}$ ) bloccando la fosforilazione di pRB e la progressione attraverso G1 (Serrano, et al., 1996). Infine, dati presenti in letteratura dimostrano che gli oncogeni H-, K-, e N-*ras* inducono l'arresto della crescita attivando p21 sia attraverso p53 che in maniera p53 indipendente (Saiz-Ladera et al., 2013). Inoltre, sembra che H-RAS abbia un effetto più potente nell'indurre senescenza

(Delgado et al., 2000). Dati presenti in letteratura dimostrano che elevati livelli di p21 sono in grado di determinare uno stato di senescenza in fibroblasti umani (HDFs) inibendo i complessi ciclina D/CDK4 responsabili della fosforilazione di pRb. La proteina p21 non sembra essere sufficiente per il mantenimento di tale stadio, infatti in una fase tardiva di senescenza la sua espressione diminuisce e aumentano i livelli di p16<sup>INK4a</sup> che ha un effetto inibitorio sulle CDK4/6 (Stein, et al., 1999).

In conclusione, un'alterazione in uno dei meccanismi di controllo sopra descritti può dare inizio ad un'iperproliferazione che potrebbe, infine, condurre la cellula verso una trasformazione tumorale.

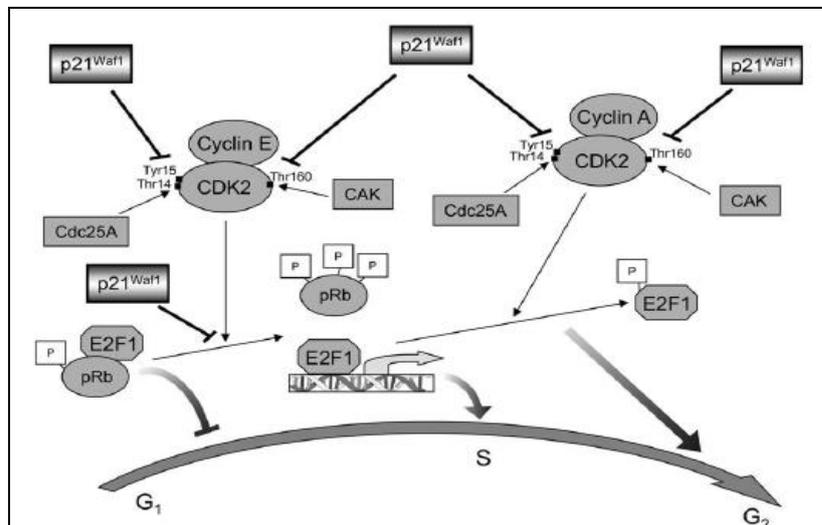
## **LA PROTEINA p21<sup>CIP1/WAF1</sup>**

Alterazioni nei geni i cui prodotti proteici sono importanti nella regolazione dei *checkpoints* del ciclo cellulare, 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 il più studiato è la proteina p21, che ha funzioni di *tumor suppressor*, infatti oltre ad essere un diretto regolatore dei complessi ciclina/CDK, è in grado di inibire direttamente la sintesi del DNA attraverso l'inattivazione dell'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA) (Dotto, 2000). Per queste sue funzioni l'aumento di espressione della proteina p21 nel cancro al colon e in altri tipi di tumori è associata all'arresto della crescita della massa tumorale e a una migliore prognosi per il paziente (Kim et al., 2013).

L'inibitore p21 è stato scoperto dal ricercatore Xiong nel 1993 che tramite immunoprecipitazione aveva identificato una proteina di 21 kDa legata alle cicline D1 e D3 e a PCNA (Xiong et al., 1993). Per la sua associazione alle CDK questa proteina è stata chiamata "proteina 1 che interagisce con CDK" (CIP1) (Harper et al., 1993). La proteina p21 è stata anche identificata nel nucleo come il prodotto di un gene regolato dal fattore trascrizionale p53, ed è stata chiamata "frammento 1 attivato dal gene p53 *wild-type*" (WAF1) (el-Deiry et al., 1993). Infine, p21 è stato identificato come un inibitore della sintesi del DNA e definito "inibitore 1 derivato da cellule senescenti" (SDI1) (Noda et al., 1994). La proteina p21 è capace di inibire la proliferazione sia nelle cellule normali che in quelle tumorali, provocando un arresto in fase G0/G1 o in fase G2/M del ciclo cellulare collaborando con altre proteine come GADD45 e 14-3-3σ per inibire le cicline A o E legate a CDK2 e le CDK4 legate alle cicline D1 o D2 (Zhang et al., 2013; Hernandez et al., 2013). L'effetto inibitore di

p21 si basa sul suo legame con i complessi chinasi-ciclina, così da schermare il residuo Thr-160 delle CDKs dalla fosforilazione attivante della chinasi CAK e sull'inibizione della defosforilazione attivante Thr-14 e in Tyr-15 delle CDKs da parte della fosfatasi CDC25A (Romanov et al., 2012) (Fig. 9).



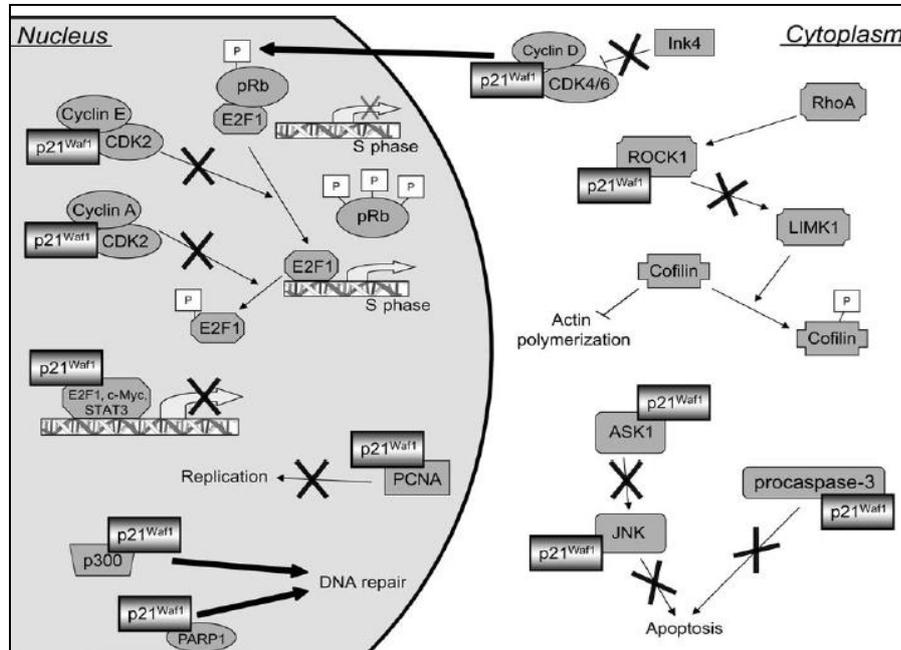
**Fig. 9.** L'effetto inibitorio di p21 si basa sulla competizione con CAK e CDC25A per legare i complessi ciclina-CDK (Romanov et al., 2012).

Paradossalmente la proteina p21 sembra però avere anche un ruolo nel favorire la formazione dei complessi ciclina D-CDK4/6 e quindi, la progressione del ciclo cellulare. Il ruolo di p21 come attivatore o inibitore dei complessi CDK/ciclina dipende dal suo livello di espressione: a basse concentrazioni favorisce il ciclo cellulare, mentre ad alte si comporta da inibitore (Harper et al., 1993; LaBaer et al., 1997; Kim et al., 2012).

Indipendentemente dall'inattivazione dei complessi CDK-ciclina, p21 è in grado di inibire il ciclo cellulare legandosi e inibendo i fattori trascrizionali E2F, STAT3 e c-MYC e il co-attivatore trascrizionale p300/CBP. La proteina p21 è anche in grado di inibire direttamente la sintesi del DNA attraverso l'inattivazione dell'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA) e 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 localizzazione nucleare di p21, questa proteina svolge altre funzioni quando si trova nel citoplasma. Nel citoplasma p21 sembrerebbe controllare la riorganizzazione del citoscheletro, la migrazione cellulare, inibire l'attivazione delle caspasi e inibire la proteina pro-apoptica JNK.

Pertanto, 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) (Fig. 10).



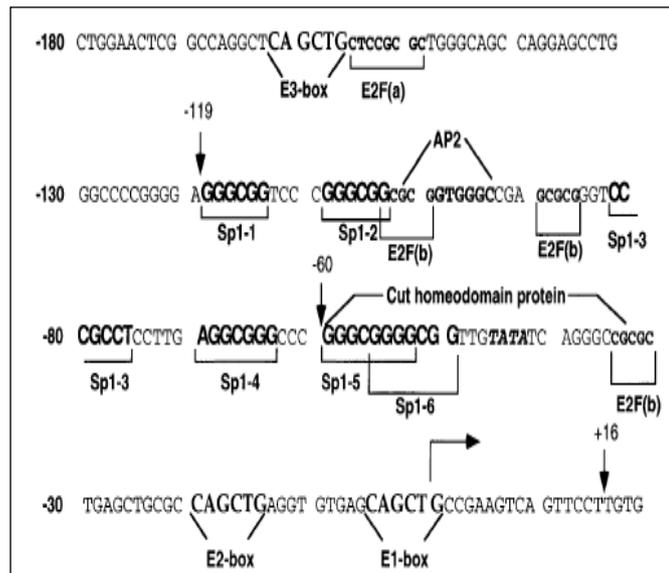
**Fig. 10.** Funzioni nucleari e citoplasmatiche della proteina p21 (Romanov et al., 2012).

L'espressione della proteina p21 è direttamente regolata dal *tumour suppressor* p53, ed è considerata tra i più importanti e potenti effettori di questo fattore trascrizionale. Il *tumour suppressor* p53 è un fattore trascrizionale che regola molti geni coinvolti nel controllo della crescita cellulare e nel cancro al colon 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 due elementi di risposta a p53 che sono altamente conservati nell'uomo, nel topo e nel ratto (Woods et al., 1997).

RAS è in grado di regolare p21 in modo p53 dipendente e indipendente attraverso l'attivazione di RAF1. È stato riportato che in cellule di adenocarcinoma coloretale 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; Dvory-Sobol et al., 2006). 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; Hermanová 2003; D'Orazi et al., 2000, Zhao et al., 1999; Jia et al, 2012).

Nella regione di 120 bp a monte del sito di inizio della trascrizione nel promotore di p21 ci sono sei siti di legame per i fattori Sp1/Sp3 (Sp1-1, Sp1-2, Sp1-3, Sp1-4, Sp1-5, Sp1.6) che fanno parte di una famiglia multigenica capace di legare il DNA con motivi C-terminali a dita di zinco (Fig. 11 e 12)

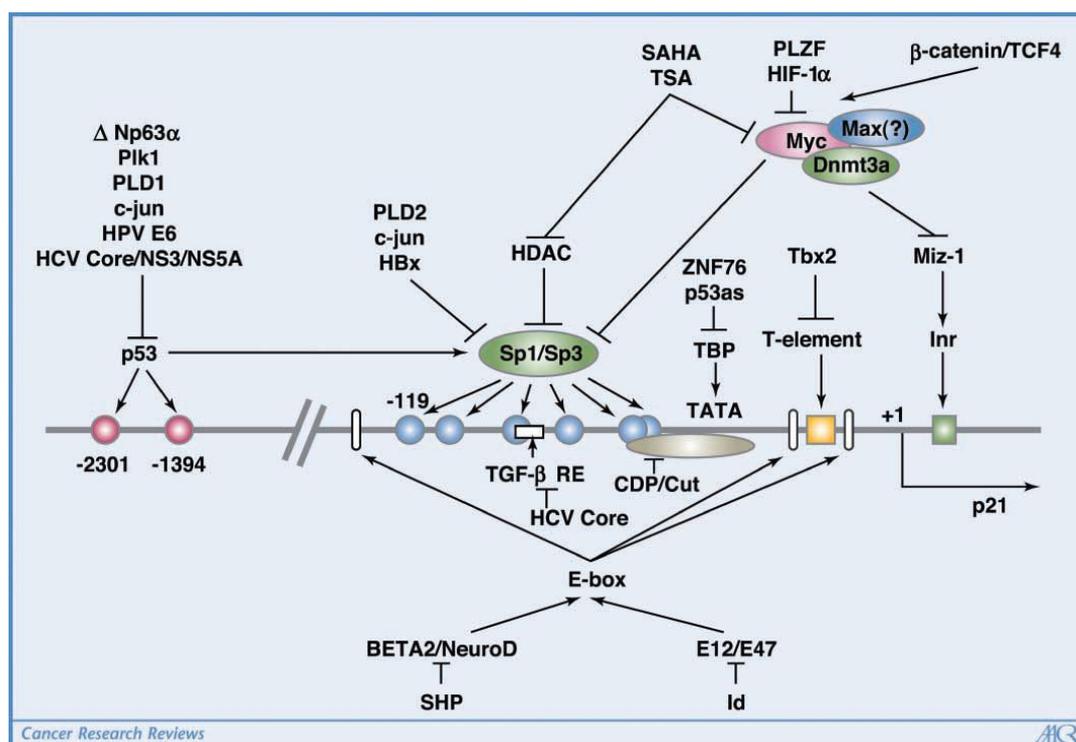


**Fig. 11.** La figura mostra una rappresentazione schematica della regione compresa tra il sito di inizio della trascrizione e 180 bp a monte del promotore di p21. In particolare sono mostrati i sei siti di legame per Sp1 (Sp1-1 a Sp1-6), tre E boxes e altri elementi che sono localizzati 180 bp a monte del sito di inizio della trascrizione (Gartel et al., 1999).

I siti Sp sul promotore proximale di p21 sono importanti perché permettono la regolazione trascrizionale di p21 anche da parte di altri fattori e in modo p53-indipendente (Bellucci et al., 2013).

Nel cancro al colon p21 è un gene target del TGF-β e dell'ACTIVINA (un membro della superfamiglia del TGF-β) che trasducono segnali intracellulari tramite SMAD2 e SMAD3. Il TGF-β ha un forte effetto upregolatore su p21 ed è un potente soppressore della crescita, mentre l'ACTIVINA provoca un lieve decremento dei livelli di p21 ed è un più potente induttore dell'apoptosi. Nel tumore coloretale di tipo MSI-H sia la segnalazione del TGF-β che dell'ACTIVINA sono abrogate da mutazioni *frameshift* nei recettori di superficie di tipo 2, ACVR2 e TGFBR2, e queste mutazioni sono 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. MYC è un fattore trascrizionale che eterodimerizza con 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). MYC è anche capace di legare e inibire le proteine TFII-I che si legano all'inziatore (INR) sul promotore di p21 per stimolare la trascrizione basale del gene (Gartel et al., 2001). La figura 12 mostra una rappresentazione schematica del promotore di p21 e la sua complessa regolazione.

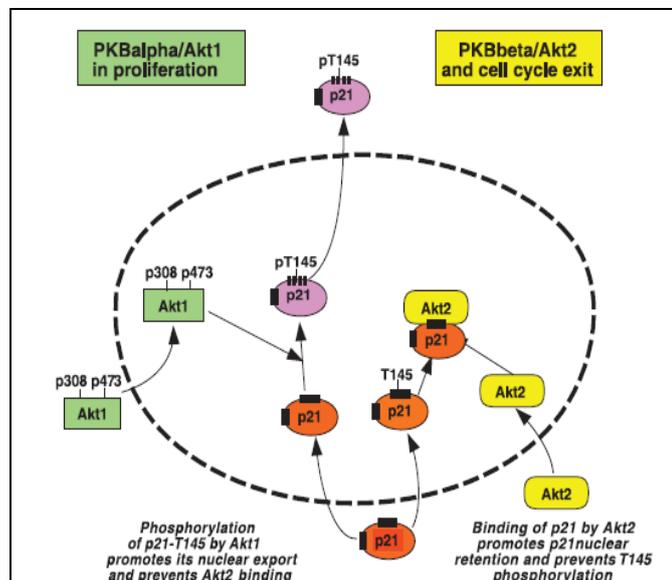


**Fig. 12.** La figura mostra la complessa regolazione dell'espressione del gene p21 (Gartel et al., 2005).

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

LATS2 (*large tumor suppressor 2*) è un membro della famiglia di chinasi AGC serina/treonina. LATS2 attivato in risposta a danni al DNA da raggi UV è capace di fosforilare p21 in serina 146 inducendone la degradazione nel citoplasma. In questo modo p21 non può legare e inibire la CASPASI 3 e quindi nella cellula si attiva l'apoptosi (Suzuki et al., 1013). 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

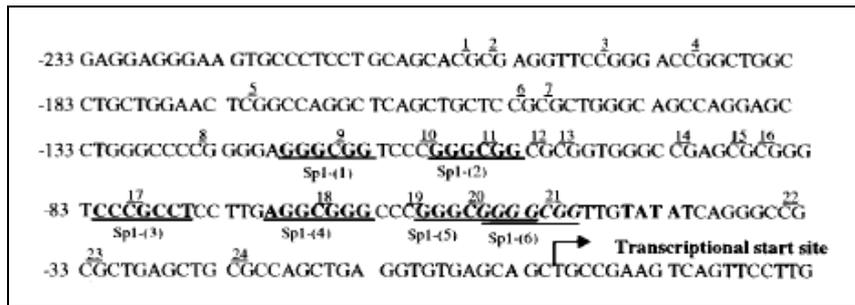
in entrambi i siti riduce il legame di p21 a PCNA e la stabilità della proteina. La fosforilazione solo sulla treonina 145 da parte di AKT1 porta ad una traslocazione di p21 dal nucleo al citoplasma, dove non può svolgere il suo ruolo anti-proliferativo, mentre la fosforilazione solo a livello della serina 146 ne aumenta la stabilità (Abukhdeir et al., 2008). La chinasi AKT2 sembra svolgere un ruolo opposto a AKT1 sulla regolazione di p21, infatti AKT2 si lega 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) (Fig. 13).



**Fig. 13.** Le due isoforme delle proteine chinasi AKT, AKT1 e AKT2, hanno un ruolo diverso nel modulare la proliferazione e p21 (Héron-Milhavet et al., 2006).

Dati presenti in letteratura riportano che per inattivare le proteine CIP/KIP (p21, p27 e p57) sono importanti due meccanismi epigenetici: la metilazione del promotore e la deacetilazione degli istoni (Fang et al., 2002; Milutinovic et al., 2000). Il promotore di p21 è ricco in regioni CpG che si trovano ipermetilati in molti tipi di cancro (Romano-Gomez et al., 2002; Xu et al., 2004). Queste regioni si trovano nel promotore prossimale all'interno dei siti Sp e la loro metilazione inibisce il legame di Sp1/Sp3 al promotore di p21 (Zhu et al., 2003) (Fig. 14).

Inoltre, sembra che la metilazione del promotore di p21 sia promossa dall'oncogene MYC che recluta a livello delle isole CpG la proteina DNA metiltransferasi 3 A (DNMT3A) e contemporaneamente lega e inibisce le proteine Sp1/Sp3 (Brenner et al., 2005).



**Fig.14.** Rappresentazione delle isole CpG nel promotore di p21. Queste regioni si trovano tra la posizione -233 e 17 dal sito di inizio della trascrizione e sono all'interno dei siti Sp (Zhu et al., 2003).

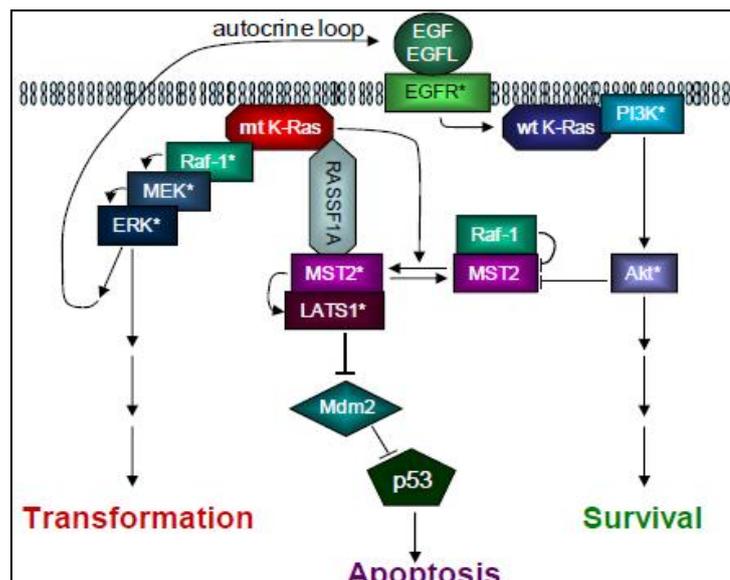
## K-RAS REGOLA I PATHWAYS RASSF1A-MST2-LATS1 E RAF1-MST2

L'apoptosi è un meccanismo di protezione dalla trasformazione neoplastica attivato dalle cellule che ricevono uno stimolo di proliferazione aberrante. Per questo motivo i pathways pro-apoptotici risultano spesso silenziati nei tumori e ciò è associato a una cattiva prognosi. Un importante pathway pro-apoptotico regolato da RAS è RASSF1A (*RAS association domain-containing protein 1 A*)-MST2 (*Mammalian sterile twenty 2*)-LATS1 (*Large tumor suppressor homolog 1*).

RASSF1A è spesso inattivato nel CRC e in altri tumori per ipermetilazione del promotore. Questa proteina regola molti processi biologici come il ciclo, la migrazione cellulare, l'apoptosi e la stabilità dei microtubuli. In cellule tumorali, inoltre, RASSF1A promuove l'apoptosi interagendo con le serina-treonina chinasi MST1/2. RASSF1A interagisce con MST1/2 a livello di un dominio chiamato "SARAH domain" e questo legame causa la dimerizzazione delle chinasi MST permettendo la loro attivazione per trans-fosforilazione a livello della treonina 180 (MST2) o 183 (MST1) che si trovano nel dominio chinamico. Le proteine MST1/2 possono essere attivate anche dalle caspasi in risposta a stress ossidativo e la loro attivazione porta all'apoptosi attraverso la chinasi JNK (*Jun N-terminal kinase*). MST2, inoltre, può attivare l'apoptosi agendo su un altro substrato, la chinasi LATS1. Questa proteina interagisce con i fattori di trascrizione YAP1 e p73 per attivare la trascrizione del gene pro-apoptotico *puma* (Matallanas et al., 2007). Esistono due proteine LATS, 1 e 2, che regolano la progressione del ciclo cellulare inibendo la formazione dei complessi ciclina/CDK della fase G2/M (LATS1/2) e G1/S (LATS2) e l'apoptosi interagendo con YAP1 (LATS1) e con p53 (LATS1/2) (Matallanas et al., 2008). L'interazione di RASSF1A con MST2 è regolata negativamente da RAF-1. Il legame di RAF-1 con MST2 inibisce la formazione del complesso pro-apoptotico RASSF1A-MST2. Inoltre, l'attivazione di RAS da parte di stimoli mitogeni inibisce il legame RAF-1-MST2 senza causare l'attivazione di MST2. Recenti studi

mostrano che AKT è capace di fosforilare MST1 (serina 387) bloccando l'attivazione delle caspasi e di fosforilare MST2 (treonina 117 e 384) favorendo la sua interazione con RAF-1, inibendo il legame con RASSF1A e inattivando l'attività chinasi della proteina. 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 è un punto di convergenza per la segnalazione di RAS e regola l'equilibrio tra la proliferazione e l'apoptosi fungendo da bersaglio comune per i pathways delle MAP chinasi e PI3K (Romano et al., 2010).

L'espressione di K-RAS mutata (mt) inoltre, induce la secrezione del fattore di crescita epidermico EGF che stimola in maniera autocrina il recettore EGFR. Il recettore EGFR fosforilato attiva la proteina K-RAS *wild-type* (wt) che attraverso il pathway di PI3K/AKT inibisce l'apoptosi favorendo la formazione dei complessi RAF-1-MST2 e 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 wt. Pertanto, nel CRC, esiste una sinergia tra K-RAS mt e K-RAS wt poiché la trasformazione tumorale indotta da K-RAS mutato richiede la presenza di un allele K-RAS wt (Fig. 15).



**Fig. 15.** Modello schematico del ruolo di K-RAS mutate e K-RAS *wild-type* nella trasformazione tumorale (Matallanas et al., 2011).



L'analisi citogenetica completa, con la tecnica del G-banding, il cariotipo spettrale (SKY) e l'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH), ha portato ad individuare le aberrazioni cromosomiche mostrate in tabella 1 (Kawai et al.2002):

Normal chromosomes			Marker chromosomes			Marker identification
Chromosome	Copies	% of cells	Marker	Copies	% of cells	
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%				

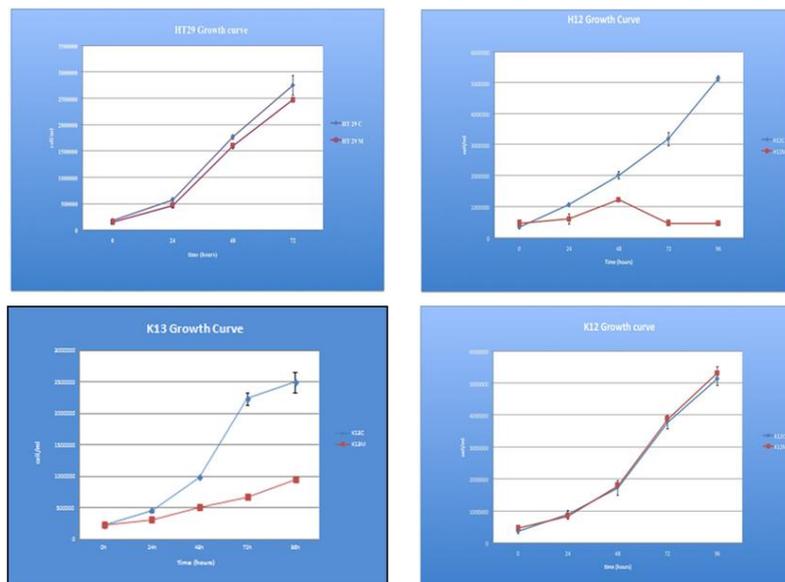
**Tab.1.** Riarrangiamenti cromosomici evidenziati mediante l'analisi G-banding, SKY, FISH in cellule HT-29 (Kawai et al., 2002). **p=** braccio corto; **q=** braccio lungo; **;** si usa nei riarrangiamenti strutturali per separare cromosomi o regioni; **()** = si includono tra le parentesi i cromosomi 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 un background in cui il gene  $p16^{INK4a}$  ha il promotore metilato (Gayet et al., 2001) e 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 e 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; Mallawaaratchy et al., 2012). In letteratura è riportato che le cellule HT-29, nonostante la

mutazione PIK3CA, sono sensibile 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 (H-RASG12V nel clone H12, K-RASG12V nel clone K12 e K-RASG13D nel clone K13) poste sotto il controllo di un promotore inducibile dall'ormone Mifepristone [GeneSwitch<sup>TM</sup> System (Invitrogen)].

Le analisi condotte finora nel nostro laboratorio hanno dato i seguenti risultati: le cellule H12 dopo 48 ore dal trattamento con Mifepristone presentano un arresto della proliferazione cellulare, morte e cambiamenti morfologici evidenti, associati all'aumento dei trascritti di *p21*, inibitore del ciclo cellulare (Dotto, 2000), e di *snail*, repressore delle E-caderine (Baum et al., 2008). Analisi citofluorimetriche condotte a diversi tempi di trattamento con Mifepristone hanno mostrato, già a partire dalle 24 ore di trattamento, un blocco del ciclo cellulare in fase G2/M e dalle 48 ore un progressivo aumento della percentuale di cellule in fase apoptotica. Saggi Western hanno rilevato un aumento dei livelli delle proteine p21 e MDM2, una diminuzione della forma fosforilata di p53 (forma stabile) e della proteina RB iperfosforilata (forma inattiva), e infine, nessuna variazione della proteina p27 (inibitore del ciclo cellulare). Il trattamento delle cellule H12 indotte con l'inibitore delle proteine MEK1/2, il PD98059, determina una riduzione dei livelli della proteina p21 ed è in grado di eliminare sia la comparsa del fenotipo osservato che l'effetto sul blocco del ciclo cellulare (Miranda, 2010). L'induzione di K-RASG13D nelle cellule K13 causa un rallentamento della crescita cellulare senza evidenti cambiamenti morfologici e una significativa percentuale di cellule in sospensione. Nelle cellule K12 l'induzione di K-RASG12V non ha evidenti effetti né fenotipici né sul tasso di proliferazione. Per entrambi i cloni, analisi di RT-PCR hanno indicato un aumento di espressione dei geni *p21* e *snail*. La figura 17 mostra le curve di crescita delle cellule HT-29, H12, K13 e K12 trattate e non con Mifepristone.



**Fig. 17.** Curve di crescita delle cellule HT-29, H12, K13 e K12 trattate con Mifepristone (M), in rosso e non trattate (C), in blu. In ascissa è riportato il numero di cellule per ml; in ordinata il tempo in intervalli di 24h.

Nel laboratorio di ricerca dell'*University College* di Dublino (UCD) del Professore Kolch sono stati condotti studi su cellule di carcinoma coloretale HCT116 che hanno un allele K-RAS *wild type* e uno mutato (K-RASG13D) e su cellule controllo Hke3 in cui la delezione dell'allele K-RASG13D reverte il fenotipo oncogenico (Shirasawa et al., 1993). Questi studi mostrano che RASSF1A è un selettivo effettore di K-RAS, ma non di H- o N-RAS. L'oncogene K-RAS mutato (mt) promuove l'attivazione di MST2 in due modi: da un lato distrugge il complesso inibitorio RAF-1-MST2 e dall'altro forma e attiva il complesso proapoptotico K-RAS-RASSF1A-MST2 (Romano et al., 2010). In cellule HCT116 la chinasi LATS1 attivata da K-RAS mt inibisce l'ubiquitina legasi MDM2 permettendo la stabilizzazione di p53 che attiva la trascrizione del gene *p21* e porta alla morte cellulare (Matallanas et al., 2008).

Sulla base di questi dati preliminari, il mio progetto di ricerca è stato focalizzato sull'analisi dei meccanismi attraverso cui K-RAS regola la proliferazione e l'apoptosi in cellule di adenocarcinoma coloretale HT-29, con lo scopo di comprendere meglio i differenti effetti molecolari che le isoforme oncogeniche di RAS inducono *in vitro*. Questo potrebbe aiutare nello sviluppo di nuove terapie più mirate per i singoli pazienti e a predire la maggiore o minore suscettibilità ai farmaci anti-tumorali, in base alla determinazione dell'esatta mutazione di RAS.

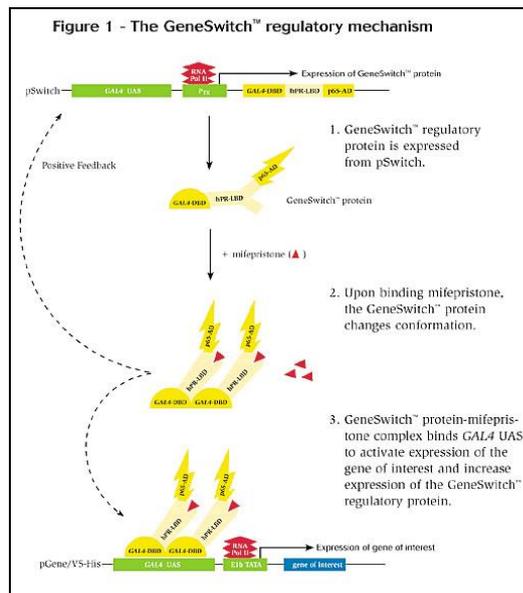
# MATERIALI E METODI

## COLTURE CELLULARI

Le cellule HT-29 e i cloni cellulari K13 e K12 sono stati messi in coltura alla temperatura costante di 37 °C e a una pressione parziale di CO<sub>2</sub> del 5% nel terreno McCoy's (McCoy's 5A Medium 1x, Gibco by Life Technologies) supplementato mediante l'aggiunta di siero fetale bovino (FBS) (Euroclone) 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). Il terreno così preparato viene detto terreno completo. Per mantenere la selezione delle cellule contenenti i plasmidi pSwitch e pGene/V5-His con cui sono state trasfettate, sono stati aggiunti al terreno gli antibiotici Igromicina e Zeocina (Invitrogen) 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 completo l'ormone Mifepristone (Invitrogen) alla concentrazione finale di 10<sup>-8</sup>M.

Le cellule Hke3 usate negli esperimenti di spettrometria di massa sono state fatte crescere in terreno completo DMEM (Medium 1x, Gibco by Life Technologies).

I cloni K13 e K12, così come l'H12 erano stati ottenuti utilizzando il sistema GeneSwitch™ System (Invitrogen) (Fig. 18) 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.



**Fig. 18.** Rappresentazione schematica del GeneSwitch™ System (Invitrogen) usato per trasfettare stabilmente le cellule HT-29 con i cDNA codificanti per isoforme mutate di Ras (H-RASG12V, K-RASG12V e K-RASG13D) poste sotto il controllo di un promotore inducibile dall'ormone Mifepristone. (<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.

## **TRIPSINIZZAZIONE**

Per raccogliere le cellule è stato allontanato il terreno di coltura e sono stati eseguiti due lavaggi in PBS (DPBS, Dulbecco's Phosphate buffer solution 1x, w/o  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ , Gibco by Life Technologies) per eliminare ogni traccia di siero. Successivamente è stata aggiunta una quantità opportuna di una soluzione di Tripsina 5% ed EDTA (acido etilendiamminotetracetico) 2% (Gibco by Life Technologies) diluita 1:10. La miscela Tripsina-EDTA è stata fatta agire per circa 7 minuti a 37 °C. La sospensione cellulare è stata centrifugata a 1000 rpm (centrifuga ALC 4232, rotore ALCT120, rpm max 4000) per 5 minuti. Eliminato il supernatante, il pellet è stato risospeso in terreno completo e le cellule sono state trasferite in terreno fresco o processate per le indagini descritte nel testo.

## **CONGELAMENTO CELLULARE**

Le cellule sono state tripsinizzate una volta raggiunta la confluenza di circa il 60% e centrifugate a 1000 rpm per 5 minuti. Il pellet è stato risospeso in una soluzione di DMSO (DimetilSulfossido) al 10% in siero e, in seguito, questa sospensione è stata aliquotata in criotubi da 1 ml, in modo da avere circa 4 milioni di cellule per ml. I criotubi sono stati tenuti per 24 ore a -80 °C e successivamente sono stati conservati in azoto liquido, ad una temperatura di -180 °C.

## **SCONGELAMENTO DI CELLULE CONSERVATE IN AZOTO LIQUIDO**

I criotubi prelevati dall'azoto liquido sono stati 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 sono state trasferite in una provetta nella quale erano stati precedentemente aggiunti 8 ml di terreno completo. In seguito, la sospensione cellulare è stata centrifugata a 1000 rpm per 5 minuti, il pellet è stato risospeso in terreno fresco e infine, la sospensione è stata trasferita in 2 o 3 pozzetti di piastre multiwell da sei pozzetti. Il terreno è stato sostituito con terreno fresco dopo 24 ore, eliminando così le cellule non sopravvissute al processo di congelamento/scongelo.

## **ANALISI CITOFUORIMETRICHE CON PROPIDIO IODURO SU CELLULE A FRESCO**

Aliquote di  $10^5$  cellule sono state centrifugate a 1000 rpm per 5 minuti e lavate, infine, in 1 ml di PBS (il resto del pellet è stato utilizzato per preparare i lisati). Per calibrare lo strumento valutando l'autofluorescenza delle cellule, i pellets 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 H<sub>2</sub>O. In questo modo, sono stati settati i parametri di SSC (*side scatter*: la sua intensità è proporzionale al diametro della cellula), FCS (*forwar scatter*: la sua intensità è proporzionale al diametro, alla granulosità interna, alla rugosità di membrana, al rapporto nucleo-citoplasma della cellula) e di PE (ficoeritrina: valuta l'autofluorescenza delle cellule), che per le nostre cellule sono rispettivamente 330, 82 e 407. Per le analisi del ciclo cellulare i pellets sono stati risospesi in 0,5 ml di una soluzione contenente Na-citrato (C.i. 0,1% (w/v); C.f. 0,007% (w/v), Propidio Ioduro (C.i. 1 mg/ml; C.f. 0,05 mg/ml), RNasi A (C.i. 10 mg/ml; C.f. 0,1 mg/ml) e NP40 (C.i. 0,1%; C.f. 0,001%) in acqua. Dopo un'incubazione al buio di 45 minuti a temperatura ambiente i campioni sono stati analizzati mediante il citofluorimetro BD FACSCanto™ (BD Biosciences) e i dati sono stati processati mediante il software BD FACSDiva. Le analisi di ciascun campione sono sempre state condotte in triplicato.

## **ANALISI CITOFUORIMETRICHE CON PROPIDIO IODURO SU CELLULE FISSATE IN ETANOLO**

Le cellule sono state fatte crescere su piastre da 60 mm e, prima della raccolta, è stato prelevato il terreno contenente le cellule in sospensione. Le cellule adese sulla superficie di crescita della piastra sono state quindi tripsinizzate e la sospensione cellulare è stata centrifugata a 1000 rpm per 5 minuti. Eliminato il supernatante, il pellet è stato risospeso in terreno completo e la sospensione è stata aggiunta al terreno precedentemente recuperato. I campioni sono stati centrifugati a 1000 rpm per 5 minuti e lavati, infine, in 1 ml di PBS. Dopo un'ulteriore centrifugazione i pellets sono stati risospesi in 100 µl di PBS, fissati in 900 µl di etanolo 70% freddo e incubati per un'ora in ghiaccio. Successivamente le cellule sono state centrifugate e il pellet è stato incubato con una soluzione contenente 0,3 µl di Propidio Ioduro 10 µg/ml (Sigma), 0,75 µl di RNasi A 250 µg/ml e 300 µl di PBS per un'ora al buio a

temperatura ambiente. I campioni sono stati analizzati mediante il citofluorimetro AccuriC6 Flow Cytometer (AccuriC6) e i dati sono stati processati con il software BD Accuri™C6.

## **SAGGIO DELLE CASPASI**

Per ciascun campione sono state raccolte sia le cellule adese che quelle in sospensione nel terreno. I campioni sono stati centrifugati a 1000 rpm per 5 minuti e lavati, infine, in 1 ml di PBS. Dopo un'ulteriore centrifugazione, le cellule sono state incubate per 30 minuti a 37°C in una soluzione contenente Z-VAD-FMK (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone) (CaspACETM FITC-VAD FMK, Promega) 10 µM (C.i.) diluito 1:1000 per avere una concentrazione finale di 10 nM in 200 µl di terreno senza siero. Dopo centrifugazione i pellets sono stati lavati in PBS, risospesi in 300 µl di PBS e 0,3 µl di Propidio Ioduro 10 µg/ml (Sigma) e incubati per 10 minuti al buio a temperatura ambiente prima dell'analisi al citofluorimetro. Per calibrare lo strumento è stato preparato anche un campione con cellule risospese in Propidio Ioduro e PBS e uno in cui alle cellule è stato aggiunto solo PBS. Z-VAD-FMK è un substrato fluorescente che si lega al sito catalitico di tutte le caspasi attivate permettendo di misurare l'attività delle caspasi e di distinguere le cellule in apoptosi precoce, con una minore fluorescenza, e in apoptosi tardiva, con una maggiore fluorescenza. Il Propidio Ioduro penetra solo nelle cellule morte, si intercala nel DNA e permette di distinguere tra le cellule in necrosi precoce, con una minore permeabilità della membrana, e in necrosi tardiva, in cui penetra in maggiore quantità.

## **PREPARAZIONE DEI LISATI TOTALI**

Per preparare i lisati totali sono stati utilizzati i pellets ottenuti da cellule cresciute in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> 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 vol. 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 H<sub>2</sub>O) e 745 µl di H<sub>2</sub>O. 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 albumina sierica bovina (BSA) 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. Il bianco è stato preparato con 250 µl di liquido di Bradford in 750 µl di H<sub>2</sub>O. I campioni sono poi stati opportunamente aliquotati e analizzati subito o conservati a -80°C.

## **ELETTROFORESI MONODIMENSIONALE**

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 H<sub>2</sub>O, 2,5 ml di Tris pH 8,8 (C.f. 0,37 M), 0,1 ml di SDS 10% (C.f. 0,1%) (sodio dodecil solfato), 0,1 ml di APS 10% (ammonio persolfato) (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 H<sub>2</sub>O, 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 (10 x 7,3 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 bolliti per 5 minuti, tenuti in ghiaccio sempre per 5 minuti e infine, caricati su gel. La corsa è stata condotta per un'ora 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 alla fine è stato eseguito il blotting.

## WESTERN BLOT

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 etanolo e 8% di acido acetico in acqua distillata) *overnight* e il giorno seguente decolorato in una opportuna quantità di soluzione decolorante (500 ml di metanolo, 100 ml di acido acetico e 500 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 *overnight* 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 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology);
- anti-AKT1/2/3, anticorpo rabbit policlonale H-136 (1:500, Santa Cruz Biotechnology);
- anti-pAKT1/2/3, anticorpo rabbit policlonale Ser 473-R (1:500, Santa Cruz Biotechnology);
- anti-ERK1, anticorpo rabbit policlonale K-23 (1:500, Santa Cruz Biotechnology);
- anti-pERK, anticorpo mouse monoclonale E-4 Tyr 204 (1:500, Cell signaling);
- anti-PAN RAS, anticorpo mouse monoclonale (1:1000, Santa Cruz Biotechnology);
- anti-K-RAS, anticorpo mouse monoclonale F234 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology);
- anti-TUBULINA, anticorpo mouse monoclonale TU-02 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology);
- anti-RASSF1A, anticorpo mouse monoclonale 3F3 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology);
- anti-RAF-1, anticorpo mouse monoclonale (1:1000, Cell Signaling);
- anti-MST2, anticorpo rabbit policlonale (1:1000, Cell Signaling);
- anti-LATS1, anticorpo goat policlonale G16 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology);
- anti-BRAF, anticorpo mouse monoclonale H-145 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology);
- anti-ACTINA, anticorpo goat policlonale I19 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology).

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 (anche questa volta in agitazione lenta a temperatura ambiente) per un'ora, con l'anticorpo secondario anti-rabbit IgG (Fc) o l'anticorpo secondario anti-mouse IgG (H+L) coniugati con fosfatasi alcalina (AP) (Promega) diluiti 1:7500 in TBS-T 1X, oppure con gli anticorpi anti-mouse, -rabbit e -goat IgG coniugati con perossidasi di rafano (HRP) (Cell Signaling) diluiti 1:10000 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).

Per gli esperimenti in cui sono stati utilizzati anticorpi secondari AP coniugati il filtro è stato sviluppato per incubazione con una quantità opportuna della soluzione BCIP/NBT (BCIP [*nitro-blue tetrazolium chloride*] /NBT [*5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt*] Liquid Substrate System, Sigma) per 1-5 minuti (fino a quando non compare la banda di reazione) a temperatura ambiente. L'enzima AP coniugato all'anticorpo secondario scinde il substrato che, in corrispondenza del legame tra proteina-anticorpo primario-anticorpo secondario, sviluppa un precipitato colorato. La colorazione del filtro è stata bloccata in acqua distillata.

Per gli esperimenti in cui sono stati utilizzati anticorpi secondari HRP coniugati il filtro è stato sviluppato per incubazione con una quantità opportuna della soluzione di Western Bright Sirius Western blotting detection Kit (ADVANSTA) per 5 minuti e le bande sono state visualizzate mediante lo strumento Vision Chemi Image (ADVANCE MOLECULAR). Le bande ottenute sono state analizzate mediante il software ImageJ.

## **INIBIZIONE DEI PATHWAYS 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,  $IC_{50}$  1,4  $\mu$ M, Cayman) 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,  $IC_{50}$  2-7 $\mu$ M, Cayman), capace di inibire le chinasi MEK 1 e 2 (Alessi et al., 1995; Lin et al., 1998). È stata utilizzata una soluzione stock degli inibitori alla concentrazione di 50 mM in DMSO. Per il trattamento con gli inibitori una quantità opportuna di cellule è stata piastrata in fiasche da 75 cm<sup>2</sup>, e il giorno seguente, alcuni campioni sono stati trattati con l'inibitore LY294002 (C.f. 25  $\mu$ M) o con l'inibitore PD98059 (C.f. 20  $\mu$ M) e/o con Mifepristone 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 la stessa quantità di DMSO. Le cellule così trattate sono state utilizzate per i saggi di proliferazione, per i test di vitalità, le analisi citofluorimetriche e per condurre saggi Western Blot. Per verificare l'avvenuta inibizione è stato valutato lo stato di fosforilazione della proteina ERK1/2 (a valle di MEK1/2) e della proteina AKT1/2/3 (a valle di PI3K).

## **SAGGI DI PROLIFERAZIONE E TEST DI VITALITÀ CELLULARE**

Per condurre saggi di proliferazione e vitalità cellulare aliquote di  $2 \times 10^4$  (per le cellule K12) o  $4 \times 10^4$  (per le cellule K13) cellule/pozzetto sono state piastrate in triplicato in 4 piastre multiwell da 24 pozzetti in polistirene. Dopo 24 ore le cellule di tre pozzetti sono state contate (tempo 0) e ad alcuni dei restanti campioni è stato aggiunto Mifepristone e/o gli inibitori PD98059 (PD) (25  $\mu$ M) e LY294002 (LY) (20  $\mu$ M). Ad un'altra serie di campioni non è stato aggiunto l'ormone e sono stati quindi usati come controllo, con o senza gli inibitori.

Dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento, dopo aver rimosso il terreno eliminando così anche le cellule in sospensione eventualmente presenti, le cellule adese sono state tripsinizzate, lavate in 200  $\mu$ l di PBS e raccolte per centrifugazione. Il pellet così ottenuto è stato risospeso in una soluzione di 150  $\mu$ l di PBS e 150  $\mu$ l 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 10 minuti a temperatura ambiente da ciascun campione controllo (C), controllo+inibitore PD e/o LY (C+PD, C+LY e C+PD+LY), trattato (M) e trattato con PD e/o LY (M+PD, M+LY, M+PD+LY) sono stati prelevati 10  $\mu$ l di sospensione cellulare per la conta, che è stata eseguita utilizzando la camera di Thoma.

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. Le curve di crescita sono state ottenute riportando la percentuale di cellule adese totali, sia vive (bianche) che morte (blu) rispetto a quelle contate al tempo zero per ciascun campione (poste pari a 100), mentre i saggi di vitalità riportano la percentuale di cellule adese morte (blu) sul totale di cellule contate. Non sono incluse, in queste analisi le cellule staccatesi dal substrato e passate in sospensione.

## **SAGGI DI IMMUPRECIPITAZIONE**

Per gli esperimenti di immunoprecipitazione sono stati preparati i campioni HT-29, K12 e K13 trattati e non per 48 ore con Mifepristone e le cellule sono state fatte crescere in piastre da 100 mm. Sono stati condotti sei esperimenti facendo crescere le cellule in terreno completo contenente siero al 10% e sei esperimenti privando le cellule del siero per 12 ore prima della raccolta. Dopo l'incubazione le cellule sono state lavate due volte in una opportuna quantità di PBS e i pellets sono stati risospesi con 1 ml di buffer di lisi composto da 20 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM di NaCl, 1% di NP40%, 1 mM di EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, supplementato con una pastiglia di cocktail di inibitori di proteasi SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets EDTA-Free (Sigma-Aldrich).

Successivamente i campioni sono stati centrifugati a 12900 rpm, per 6 minuti a 4°C (centrifuga da banco refrigerata Eppendorf 5804 R, rotore FA-45-20-17). Le concentrazioni delle proteine totali presenti nel supernatante sono state determinate con il metodo Bradford (come descritto precedentemente) e sono state preparate tre aliquote contenenti 200 µg di proteine che sono state immunoprecipitate con 2 µl di anticorpo anti-MST2 (C.i. 200 µg/ml; C.f. 0,2 µg/µl) (goat policlonale IgG C-19, Santa Cruz Biotechnology), o di anticorpo anti-RAF-1 (C.i. 200 µg/ml; C.f. 0,2 µg/µl) (rabbit policlonale IgG C-12, Santa Cruz Biotechnology), o di anticorpo anti-LATS1 (C.i. 200 µg/ml; C.f. 0,2 µg/µl) (goat policlonale IgG G-16, Santa Cruz Biotechnology). Il resto del campione è stato utilizzato come lisato totale. Per condurre le immunoprecipitazioni ai campioni sono stati addizionati 10 µl di Proteina G Sepharose (Fast Flow; Sigma-Aldrich). Dopo un'incubazione per 3 ore a 4 °C in rotazione per permettere il legame proteina G-anticorpo-proteina, i campioni sono stati centrifugati per 20 secondi e il pellet è stato lavato tre volte con 0,1 ml di buffer di lisi senza gli inibitori delle proteasi. Al pellet rimasto, formato da proteina G-anticorpo-proteine, sono stati aggiunti 40 µl di SB 2x e, infine, 10 µl di ciascun campione sono stati caricati su un gel di poliacrilammide per condurre i saggi Western Blot. Le membrane sono poi state incubate con anticorpi anti-MST2, anti-LATS1, anti-RAF1 e anti-RASSF1A (descritti prima v. Western Blot) per studiare le interazioni tra le proteine.

## **TRASFEZIONE DELLE CELLULE CON LIPOFECTAMINA**

Le cellule Hke3 sono state fatte crescere in piastre da 100 mm e raggiunta una confluenza del 70% sono state trasfettate con un vettore contenente il gene codificante per K-RASG13D (Hke

13D) o con un vettore contenente il gene codificante per K-RAS *wild type* (Hke3 WT) con un tag (Flag) legato all'estremità N-terminale. Altri campioni sono stati trasfettati con un vettore a partire dal quale viene espresso il solo Flag e usati come controllo positivo (Hke3 C<sup>+</sup>) o non trasfettati e usati come controllo negativo (Hke3 C<sup>-</sup>). Tutti i vettori sono stati gentilmente forniti dal ricercatore Matallanas D. dell'*University College of Dublin, Systems Biology Ireland group* ed erano stati amplificati in batteri competenti DH5alpha. Dopo estrazione, la concentrazione del DNA plasmidico era stata misurata attraverso nanodrop e la loro purezza ed integrità fisica era stata verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio 1%.

I campioni sono stati preparati in triplicato. Per la trasfezione, ad un 1 µg di DNA di vettore diluito in 0,5 ml di terreno 0% in siero sono stati aggiunti 0,5 ml di terreno contenenti 12 µl del reagente di trasfezione Lipofectamina 2000 (Invitrogen by Life Technologies). Dopo un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente per permettere la formazione del complesso DNA-lipide la soluzione è stata addizionata goccia a goccia alle piastre contenenti 5 ml di terreno senza siero. Le cellule sono state incubate a 37 °C e dopo 4 ore, è stato eliminato il terreno e sono stati aggiunti 9 ml di terreno con 10% in siero. Il giorno seguente le cellule sono state lavate in PBS e si è aggiunto terreno privo di siero. Dopo 12 ore le cellule sono state raccolte per le analisi di spettrometria di massa.

## **SPETTROMETRIA DI MASSA (MS) “TANDEM” O MASSA-MASSA (MS/MS)**

Le cellule Hke3 trasfettate sono state lisate come descritto nei saggi di immunoprecipitazione; aliquote di lisato contenenti 800 µg di proteine totali sono state immunoprecipitate con 6 µl di un complesso matrice/anticorpo anti-Flag M2 Affinity Gel (Ci 0,6 mg/ml; Cf 0,003 mg/ml) (Sigma-Aldrich) e poi processate secondo il protocollo per l'immunoprecipitazione descritto precedentemente. Dopo un'ora i campioni sono stati centrifugati per 20 secondi e il pellet è stato lavato tre volte con 0,5 ml di buffer di lisi (20 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM di NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA e 1% NP40) e due volte con 0,5 ml di *wash buffer* (20 mM HEPES (pH 7,5), 150 mM di NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 mM EDTA).

Dopo i lavaggi, i campioni sono stati incubati in agitazione lenta a temperatura ambiente con 60 µl di un buffer composto da 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 M urea e 5 µg/ml di tripsina (Seq Grade Modified, Promega) per digerire le proteine in peptidi. Dopo 30 minuti i campioni sono stati centrifugati a 14000 rpm, a 4°C per 30 secondi (centrifuga da banco refrigerata

Eppendorf 5804 R, rotore FA-45-20-17) ed è stato raccolto il supernatante. Il pellet è stato eluito di nuovo con 25 µl di un secondo buffer composto da 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 M urea e 1 mM di ditiotreitolo (DTT). Il supernatante è stato raccolto e il pellet rieluito come prima. Alla fine, i supernatanti ottenuti nelle varie tappe sono stati riuniti e incubati *overnight* a temperatura ambiente. Il giorno seguente i campioni sono stati incubati con 20 µl di un agente alchilante, la iodoacetammide (5 mg/ml) e, dopo 30 minuti di incubazione al buio, la reazione è stata bloccata con 1 µl di acido trifluoroacetico (TFA) 100% (von Thun et al., 2013).

Prima dell'analisi allo spettrometro di massa i peptidi sono stati purificati su colonne di pochi millimetri di membrana 3 M con carbonio attivo C18 (EMPORE) inserite in puntali da 200 µl (Stage Tips). Le colonne sono state preparate in laboratorio prelevando un piccolo disco dalla membrana con un ago con la punta spezzata e insufflando il disco ottenuto con una siringa all'interno del puntale da 200 µl. Infine, i puntali sono stati inseriti in tubi da 1,5 ml con il tappo forato che permettono di centrifugare i campioni. La membrana 3 M è formata da un pannello di *beads* (sfere) cromatografiche immobilizzate in un reticolo di Teflon che garantiscono un'equa distribuzione del campione, trattengono i peptidi, permettono di eluire efficientemente il campione e rimuovere le impurità. Il carbonio C18 permette l'eliminazione dei sali e il frazionamento dei peptidi (Rappsilber et al., 2007). La miscela di peptidi legata alla membrana contenuta nei puntali è stata lavata due volte con 50 µl di TFA 0,1% e due volte con 25 µl di acetonitrile (AcN) 50% e TFA 0,1%. Il volume del liquido rimasto sulla membrana è stato ridotto a 5 µl usando il CentriVap (Labconco, USA). Infine, ai campioni sono stati aggiunti 10 µl di TFA 0,1% e i peptidi sono stati analizzati allo spettrometro di massa Thermo Scientific Q-Exactive connesso con il sistema cromatografico Ultimate Ultra300. I campioni sono stati preparati in triplicato e ciascuna replica è stata letta due volte in modo da avere, oltre al triplicato biologico, un duplicato tecnico.

Il sistema cromatografico preleva 5 µl di campione che vengono introdotti nella sorgente di ioni dove i peptidi vengono ionizzati tramite la tecnica di ionizzazione ESI (*Electrospray Ionization*). Il campione trasportato da un flusso di 1-2 µl/min di solvente contenente tracce di un acido volatile (acido trifluoroacetico) emerge come un aerosol da un capillare di acciaio con un diametro di 100 µm grazie ad un flusso coassiale di gas inerte (azoto). Fra il capillare metallico e il controlettrodo è applicata una differenza di potenziale di circa 5000 V e in queste condizioni le molecole che formano l'aerosol assumono una carica positiva. Per evaporazione del solvente, nello spazio tra il capillare e il controlettrodo, si ha un aumento

della carica specifica delle particelle che, per repulsione coulombiana fra cariche omologhe, si frammentano in particelle di minori dimensioni. Il processo di frammentazione si ripete fino alla completa evaporazione del solvente e alla formazione di una popolazione di ioni positivi singoli non solvatati che entrano nel quadrupolo analizzatore. L'analizzatore è costituito da due coppie di barre metalliche connesse elettricamente. A una coppia di barre è applicato un potenziale  $+ [U + V \cos(\omega t)]$  mentre all'altra coppia un potenziale  $- [U + V \cos(\omega t)]$ , dove  $U$  è il potenziale costante,  $V$  è l'ampiezza della radiofrequenza e  $\cos(\omega t)$  è il coseno del prodotto della frequenza  $\omega$  per il tempo  $t$ . Tra le due coppie di barre è applicata una differenza di potenziale con una radiofrequenza che oscilla nel tempo e che varia la traiettoria degli ioni indotta dal campo elettrico permettendo la loro separazione in base al rapporto massa/carica ( $m/z$ ). Infatti, per una determinata combinazione  $U$ ,  $V$  e  $w$  solo gli ioni con un determinato valore  $m/z$  riescono ad attraversare il quadrupolo e a raggiungere la camera di collisione. In questa camera gli ioni vengono frammentati per collisione con le molecole di un gas inerte generando ioni secondari che vengono separati nel secondo quadrupolo e alla fine arrivano al sistema di rilevamento. Quindi, applicando al quadrupolo radiofrequenze variabili nel tempo si rilevano tutti gli ioni e si ottiene lo spettro di massa del campione. Il sistema di rilevamento dello spettrometro è di tipo *channeltron* che è un dinodo con un'elevata differenza di potenziale. Quando gli ioni collidono con le pareti interne dello *channeltron* provocano l'emissione di elettroni e per ogni ione incidente si genera un segnale che viene registrato e quantificato.

Il sequenziamento degli oligopeptidi è stato effettuato con la metodica di massa "tandem" o massa-massa (MS/MS) e lo spettro di massa è stato rappresentato in forma grafica come quantità degli ioni in funzione del rapporto massa/carica. L'identificazione delle proteine presenti nella miscela partendo dai dati ottenuti dall'analisi MS/MS è stata effettuata con il software MaxQuant (versione 1.1.1.32) che interfaccia i dati dello spettrometro di massa con database esterni. I valori di intensità del segnale ottenuti per le proteine identificate sono stati riportati in Excell per l'analisi statistica. Le proteine ottenute (872 proteine) sono state filtrate per un valore di  $p$  value  $< 0,05$  (13D vs.  $C^+$ ; WT vs.  $C^+$ ) e per un valore di  $RATIO > 1,5$  (13D/ $C^+$ ; WT/ $C^+$ ). La funzione e la classificazione delle proteine così selezionate (82 proteine per 13D e 14 proteine per WT) è stata determinata con l'ausilio di due *softwares*, UNIPROT e KEGG, e infine con il *software* STRING 9.05 è stato generato un interattoma con un intervallo di confidenza medio (0,400).

# RISULTATI E DISCUSSIONE

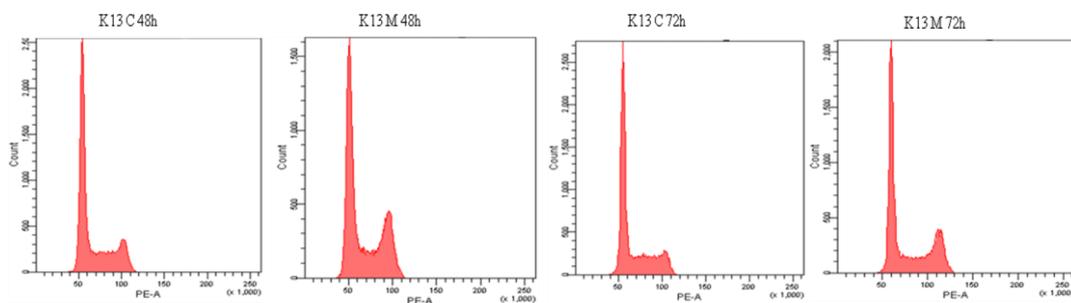
## ANALISI DEL CICLO CELLULARE SU CELLULE K13 E K12

Le prime analisi condotte durante il mio dottorato sono state focalizzate sull'analisi del ciclo cellulare dei cloni K13 e K12 e sull'effetto dell'espressione della specifica isoforma mutata di RAS sulla distribuzione di queste cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare.

Le cellule sono state piastrate in piastre multiwell da sei pozzetti alla concentrazione di  $2 \times 10^5$  cellule/pozzetto e, il giorno seguente, trattate con Mifepristone ( $10^{-8}M$ ) così da attivare l'espressione di K-RASG13D o K-RASG12V. Allo stesso modo sono state preparate cellule non sottoposte al trattamento con l'ormone che sono state utilizzate come controllo.

Le aliquote di cellule, raccolte dopo 48 o 72 ore, sono state processate seguendo il protocollo con Propidio Ioduro su cellule a fresco, descritto in Materiali e Metodi.

Per le cellule K13 sono stati condotti 7 esperimenti indipendenti in triplicato a 48 e 72 ore di trattamento. In figura 19 sono mostrati i grafici ottenuti dall'analisi di singoli campioni al citofluorimetro e che sono relative all'esperimento 7.

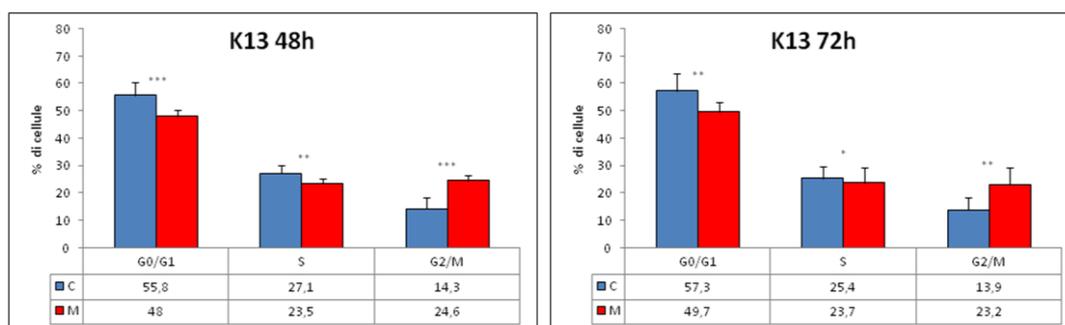


**Fig. 19.** Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria eseguita sulle cellule K13 non indotte (C) e indotte (M) a 48 e 72 ore. I grafici riportano in ordinata il numero di cellule e in ascissa il contenuto di DNA. I grafici riportati in figura sono stati ottenuti mediante il software BD FACSDiva.

	<b>Esperimento 1 48h</b>	<b>Esperimento 1 72h</b>
<b>G0/G1</b>	-9,5	-9,6
<b>S</b>	-6,2	-1,9
<b>G2/M</b>	+10,1	+9,6
	<b>Esperimento 2 48h</b>	<b>Esperimento 2 72h</b>
<b>G0/G1</b>	-3,6	-6,8
<b>S</b>	-7,2	-4,1
<b>G2/M</b>	+12,1	+10
	<b>Esperimento 3 48h</b>	<b>Esperimento 3 72h</b>
<b>G0/G1</b>	-6,5	-3,9
<b>S</b>	-3,5	-4,2
<b>G2/M</b>	+9,9	+8
	<b>Esperimento 4 48h</b>	<b>Esperimento 4 72h</b>
<b>G0/G1</b>	-4,6	-2,3
<b>S</b>	-2,6	-2,3
<b>G2/M</b>	+5,4	+9
	<b>Esperimento 5 48h</b>	<b>Esperimento 5 72h</b>
<b>G0/G1</b>	-7,2	-5,1
<b>S</b>	-0,9	-7,2
<b>G2/M</b>	+9,1	+11,5
	<b>Esperimento 6 48h</b>	<b>Esperimento 6 72h</b>
<b>G0/G1</b>	-16,6	-16,8
<b>S</b>	+4	+9,9
<b>G2/M</b>	+11,5	+6,3
	<b>Esperimento 7 48h</b>	<b>Esperimento 7 72h</b>
<b>G0/G1</b>	-6,1	-8,5
<b>S</b>	-8,2	-2,2
<b>G2/M</b>	+13,8	+10,2

**Tab.2.** Per tutti i saggi condotti sono riportate, per ogni fase del ciclo cellulare, le differenze in termini di aumento (+) o diminuzione (-) tra la media espressa in percentuale delle cellule K13 controllo e la media della percentuale di cellule indotte.

La figura 20 mostra il risultato ottenuto calcolando la percentuale media di cellule in ogni fase del ciclo cellulare prendendo in considerazione tutti gli esperimenti condotti.

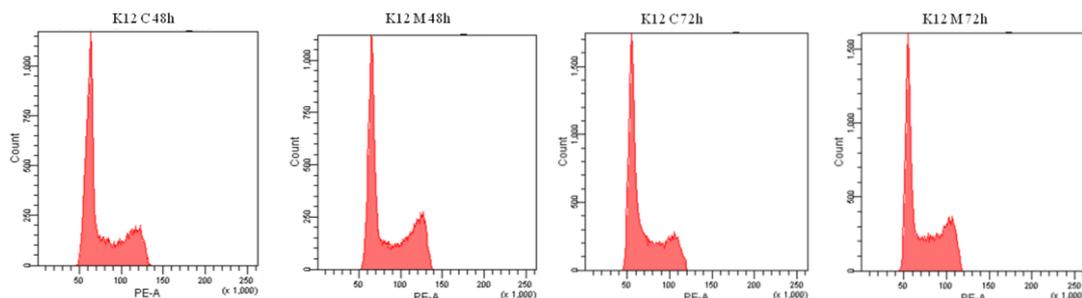


**Fig. 20.** Rappresentazione grafica dei valori espressi in percentuale della quantità di cellule presenti nelle singole fasi del ciclo cellulare, ottenuti calcolando la media di tutti gli esperimenti condotti a 48 e a 72 ore (v. Tab. A Appendice). In blu sono rappresentati i valori ottenuti per le fasi G0/G1, S e G2/M delle cellule controllo (C); in rosso i valori ottenuti per le fasi G0/G1, S e G2/M delle cellule indotte (M). Le medie, le deviazioni standard e gli istogrammi sono stati ottenuti con il programma Microsoft Office Excel (2007). Il valore di p value è stato calcolato con il programma Graphpad: **\*\*\*p < 0,005; \*\*p < 0,05; \*p ≤ 0,5.**

Dall'analisi dei risultati ottenuti si osserva, sia dopo 48 ore che 72 ore di trattamento con Mifepristone, una chiara diminuzione di cellule in fase G0/G1 e un significativo aumento della percentuale di cellule in fase G2/M. Si osserva anche una diminuzione nella quantità di cellule in fase S (-3,6), che però a 72 ore è più modesta (-1,7). Quindi, si può concludere che l'induzione dell'espressione di K-RASG13D ha come effetto un blocco parziale del ciclo cellulare in fase G2/M, in accordo con il rallentamento della crescita cellulare osservato nei saggi di proliferazione condotti precedentemente nel nostro laboratorio (v. Premessa) e confermati in seguito (v. Fig. 26).

Successivamente ho condotto le analisi del ciclo cellulare sul clone K12 non trattato e dopo 48 e 72 ore di trattamento con Mifepristone. Il clone che esprime K-RASG12V in coltura non mostra nessun blocco della proliferazione e nessun cambiamento fenotipico, ma ciò non può escludere variazioni nella durata delle singole fasi del ciclo cellulare. Sono stati condotti 6 esperimenti indipendenti in triplicato a 48 e 72 ore di trattamento. In figura 21 sono mostrati i grafici ottenuti dall'analisi di singoli campioni al citofluorimetro e che sono relative all'esperimento 5. Nella tabella B (v. Appendice) sono riportati i valori della percentuale di cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare dopo 48 e 72 ore di trattamento, ottenuti in triplicato per ciascun campione, le medie e le deviazioni standard ( $M \pm DV$ ).

Nella tabella 3 per tutti i saggi condotti sono riportate, per ogni fase del ciclo cellulare, le differenze in termini di aumento (+) o diminuzione (-) tra la media espressa in percentuale delle cellule K12 controllo e la media della percentuale di cellule indotte.

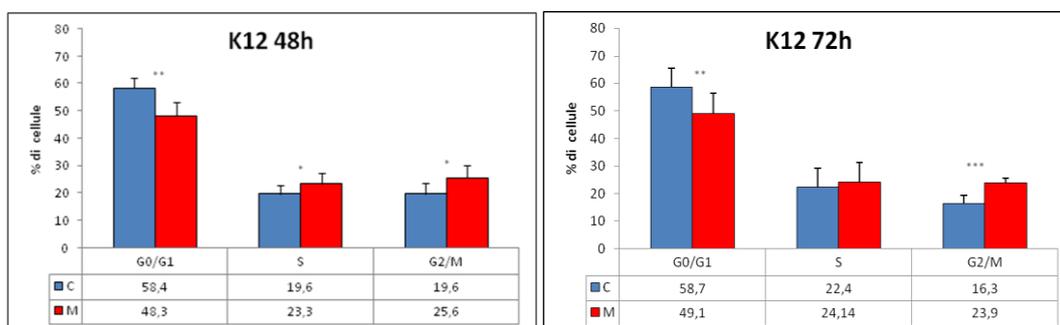


**Fig. 21.** Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria eseguita sulle cellule K12 non indotte (C) e indotte (M) a 48 e 72 ore. I grafici riportano in ordinata il numero di cellule e in ascissa il contenuto di DNA. I grafici riportati in figura sono stati ottenuti mediante il software BD FACSDiva.

	<b>Esperimento 1 48h</b>	<b>Esperimento 1 72h</b>
<b>G0/G1</b>	-4,9	-4,5
<b>S</b>	+0,7	+0,4
<b>G2/M</b>	+4,3	+4,5
	<b>Esperimento 2 48h</b>	<b>Esperimento 2 72h</b>
<b>G0/G1</b>	-6,3	-10,5
<b>S</b>	+0,9	-0,5
<b>G2/M</b>	+2,6	+10,9
	<b>Esperimento 3 48h</b>	<b>Esperimento 3 72h</b>
<b>G0/G1</b>	-6,8	-11
<b>S</b>	+4	+5,1
<b>G2/M</b>	+3,3	+4,5
	<b>Esperimento 4 48h</b>	<b>Esperimento 4 72h</b>
<b>G0/G1</b>	-10,1	-10,2
<b>S</b>	+3,7	-0,5
<b>G2/M</b>	+7,2	+9,5
	<b>Esperimento 5 48h</b>	<b>Esperimento 5 72h</b>
<b>G0/G1</b>	-7,2	-9,6
<b>S</b>	+4,7	+0,7
<b>G2/M</b>	+2,5	+10,1
	<b>Esperimento 6 48h</b>	<b>Esperimento 6 72h</b>
<b>G0/G1</b>	-20	-6,9
<b>S</b>	+5,2	+3,7
<b>G2/M</b>	+14,3	+2,4

**Tab.3.** Per tutti i saggi condotti sono riportate, per ogni fase del ciclo cellulare, le differenze in termini di aumento (+) o diminuzione (-) tra la media espressa in percentuale delle cellule K12 controllo e la media della percentuale di cellule indotte.

La figura 22 mostra il risultato ottenuto calcolando la percentuale media di cellule in ogni fase del ciclo cellulare prendendo in considerazione tutti gli esperimenti condotti.



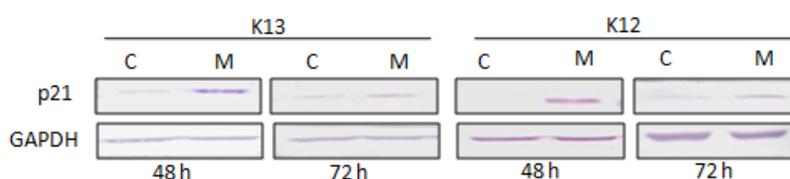
**Fig. 22.** Rappresentazione grafica dei valore espressi in percentuale della quantità di cellule presenti nelle singole fasi del ciclo cellulare, ottenuti calcolando la media di tutti gli esperimenti condotti a 48 e a 72 ore (v. Tab. B Appendice). In blu sono rappresentati i valori ottenuti per le fasi G0/G1, S e G2/M delle cellule controllo (C); in rosso i valori ottenuti per le fasi G0/G1, S e G2/M delle cellule indotte (M). Le medie, le deviazioni standard e gli istogrammi sono stati ottenuti con il programma Microsoft Office Excel (2007). Il valore di p value è stato calcolato con il programma Graphpad: **\*\*\*p < 0,005; \*\*p < 0,05; \*p ≤ 0,5.**

Dall'analisi degli istogrammi risulta che dopo 48 e 72 ore di induzione con l'ormone aumenta il numero di cellule nella fase G2/M mentre si riduce la percentuale di cellule presenti nella fase G0/G1. La percentuale di cellule in fase S aumenta dopo 48 ore di induzione (+3,7), mentre a 72 ore di trattamento l'aumento della frazione di cellule indotte non è significativo (+1,7).

Confrontando i valori espressi in percentuale della quantità di cellule presenti nelle singole fasi del ciclo cellulare, ottenuti calcolando la media di tutti gli esperimenti condotti a 48 e a 72 ore per entrambi i cloni (v. Fig. 20 e 22), si può concludere che l'aumento delle cellule K12 M nella fase G2/M del ciclo cellulare, è meno pronunciato (+6 a 48 ore e +7,6 a 72 ore) rispetto a quello osservato nelle cellule K13 M (+10,3 a 48 ore e +9,3 a 72 ore). L'effetto opposto si osserva per la fase G0/G1, infatti si ha una diminuzione più marcata nel clone K12 indotto (-10,1 a 48 ore e -9,6 a 72 ore) rispetto alle cellule K13 (-7,8 a 48 ore e -7,6 a 72 ore). In fase S del ciclo si osserva per entrambi i cloni una maggiore variazione nella percentuale di cellule indotte a 48 ore rispetto alle 72 ore, ma l'effetto dell'induzione delle due isoforme mutate di RAS è opposto. In particolare a 48 ore si osserva un aumento del numero di cellule K12 M (+3,7) e una diminuzione della percentuale di cellule K13 M (-3,6) rispetto al controllo.

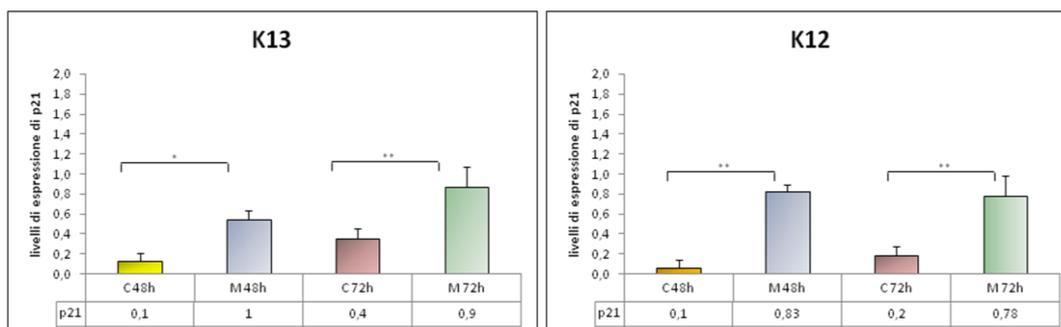
## ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA p21

L'espressione della proteina p21 è stata analizzata tramite analisi Western Blot nei cloni K12 e K13 dopo 48 e 72 ore di trattamento con Mifepristone. Come visto da esperimenti già condotti nel nostro laboratorio (v. Premessa), i trascritti di tale gene aumentano in risposta all'espressione di ciascuna isoforma mutata di RAS e nel clone H12 i livelli della proteina p21 aumentano 24 e 48 ore dopo l'induzione. Gli esperimenti sono stati condotti come descritto in Materiali e Metodi e sono stati effettuati 6 esperimenti indipendenti per il clone K13 e 7 esperimenti indipendenti per il clone K12. In figura 23 sono riportati i risultati ottenuti da un singolo saggio Western Blot condotto sui campioni K13 e K12 C (cellule controllo non trattate) ed M (cellule trattate con l'ormone) dopo 48 e 72 ore di induzione.



**Fig. 23.** Saggi Western Blot condotti sulle cellule K13 e K12 per analizzare l'espressione della proteina p21 dopo 48 e 72 ore di trattamento (M) con Mifepristone e non (C). La proteina GAPDH è stata utilizzata per normalizzare il caricamento.

La figura 24 mostra a sinistra l'istogramma relativo ai livelli di espressione della proteina p21 in cellule K13 indotte e non per 48 e 72 ore ottenuto dalla media di 6 esperimenti, mentre a destra è riportato l'istogramma relativo all'espressione di p21 nel clone K12 indotto e non per 48 e 72 ore ottenuto dalla media di 7 esperimenti.



**Fig. 24.** Istogrammi relativi ai livelli di espressione della proteina p21 normalizzati rispetto ai valori della proteina GAPDH nei campioni controllo 48 ore (C) (giallo), trattato 48 ore (M) (blu), controllo 72 ore (C) (rosa) e trattato 72 ore (M) (verde). L'istogramma rappresenta la media di 6 esperimenti condotti per le cellule K13 (a sinistra) e di 7 esperimenti condotti per le cellule K12 (a destra). Le medie, le deviazioni standard e gli istogrammi sono stati ottenuti con il programma Microsoft Office Excel (2007). Il valore di p value è stato calcolato con il programma Graphpad: \*\*p < 0,05 e \*p < 0,5.

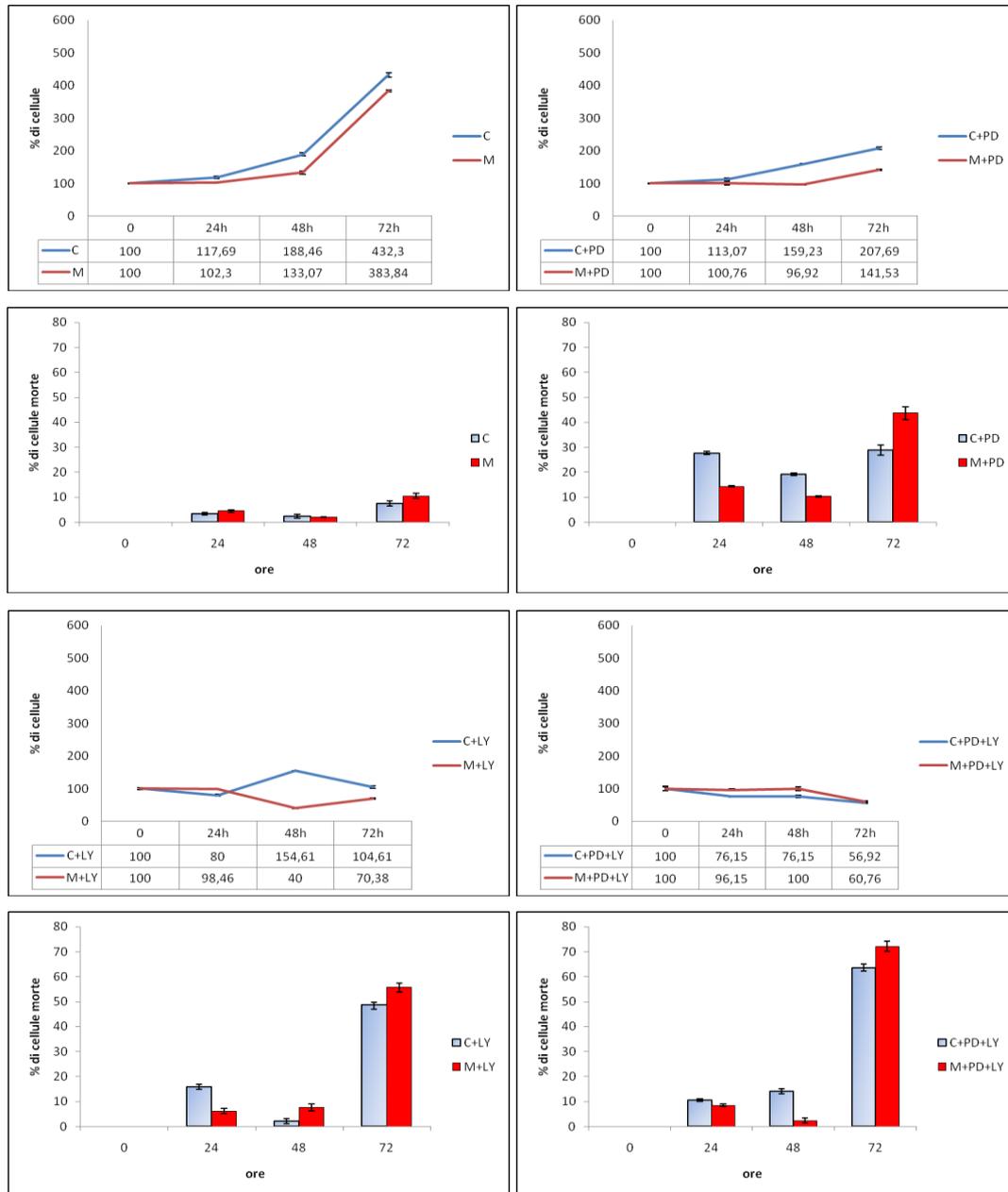
Nelle cellule controllo K13 e K12 la proteina p21 è presente in tracce, mentre i livelli aumentano 48 e 72 ore dopo l'induzione, in accordo con l'aumento dei trascritti di tale gene precedentemente osservato nel nostro laboratorio (v. Premessa) e con il blocco del ciclo cellulare in fase G2/M mostrato precedentemente nei saggi di citofluorimetria. Inoltre, la differenza nel livello di p21 fra cellule controllo e indotte è maggiore a 48 ore di trattamento. Infine, dall'analisi dei dati risulta che non ci sono significative differenze dei livelli di espressione della proteina p21 tra i due cloni indotti, quindi il differente comportamento osservato nei due cloni, K13 e K12, non dipende da diversi livelli di espressione della proteina p21.

## **SAGGI DI PROLIFERAZIONE E DI VITALITÀ CELLULARE SUL CLONE K12 TRATTATO CON GLI INIBITORI PD98059 E LY294002**

Successivamente ho condotto delle analisi per cercare di determinare se gli effetti provocati da K-RASG12V e K-RASG13D sul ciclo cellulare e sull'espressione della proteina p21 siano mediati dal pathway delle MAP chinasi, o attraverso la via PI3K/AKT. Per raggiungere tale scopo, ho utilizzato due inibitori, LY904002 (LY 25  $\mu$ M) e PD98059 (PD 20  $\mu$ M), che agiscono bloccando i due principali pathways 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 l'attività chinasica della PI3K, bloccando il pathway PI3K/AKT. In parallelo per analizzare gli effetti degli inibitori ho eseguito saggi di proliferazione e vitalità cellulare con il Trypan Blue per entrambi i cloni indotti e non ad esprimere l'isoforma mutata di RAS.

Per eseguire i saggi di proliferazione e di vitalità cellulare sul clone K12 sono stati preparati i campioni controllo (C), controllo+PD (C+PD), controllo+LY (C+LY), controllo+PD+LY (C+PD+LY), indotti (M), indotti+PD (M+PD), indotti+LY (M+LY) e indotti+PD+LY (M+PD+LY) trattati per 24, 48 e 72 ore (come descritto in Materiali e Metodi). Sono stati condotti due esperimenti indipendenti in triplicato e in figura 25 sono riportate le curve di crescita e gli istogrammi relativi alla vitalità cellulare ottenuti da uno dei due esperimenti, che hanno dato risultati paragonabili. 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 adese ma morte sul totale di cellule contate. Non

sono incluse, in queste analisi le cellule staccatesi dal substrato e passate in sospensione, che pertanto sono state rimosse con il terreno prima della raccolta.



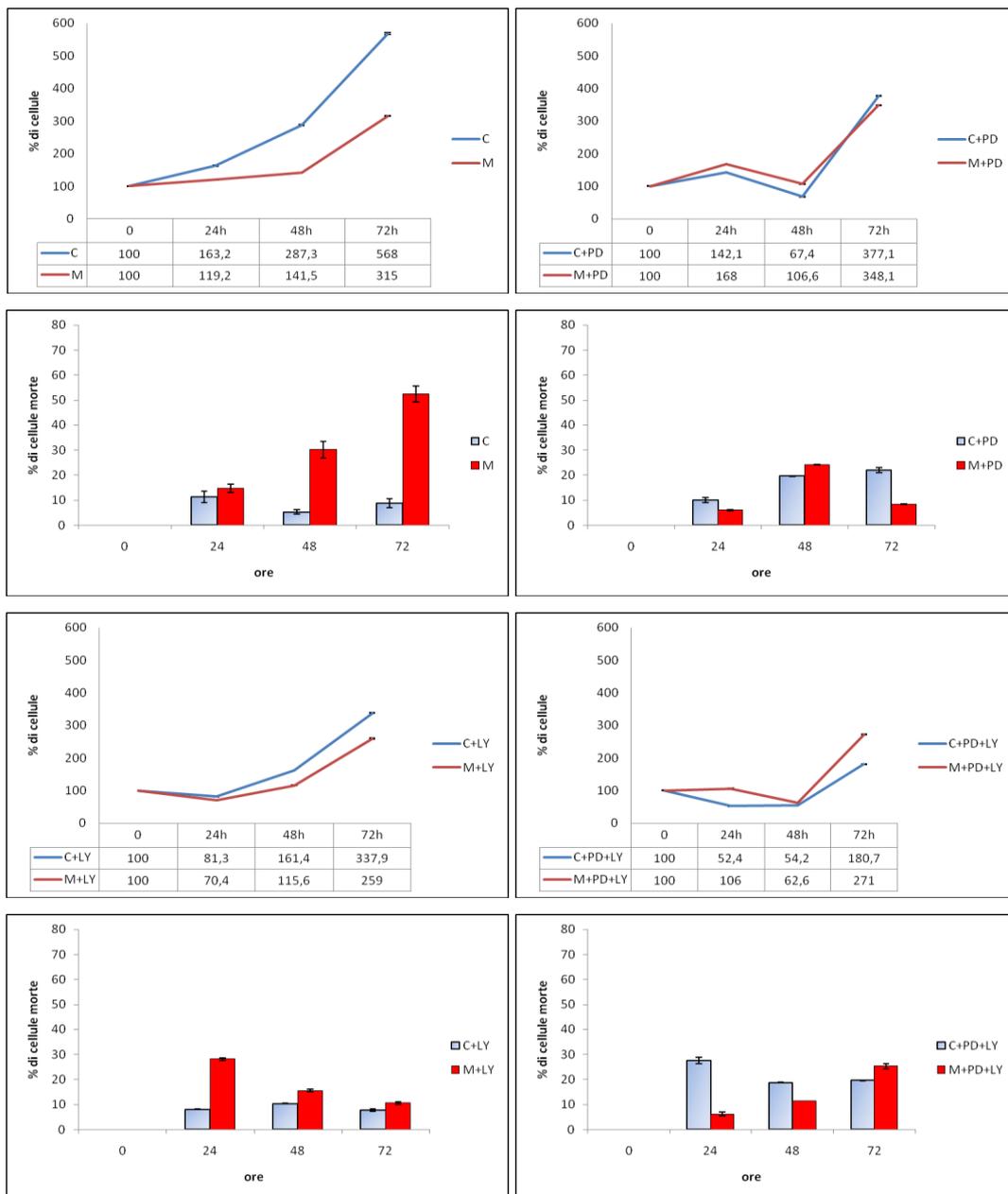
**Fig. 25.** Curve di crescita di cellule K12 trattate (rosso) con Mifepristone e/o PD e/o LY e cellule controllo (blu) trattate e non con PD/o LY. Istogrammi di vitalità cellulare di cellule K12 trattate (rosso) con Mifepristone e/o PD e/o LY e cellule controllo (blu) trattate e non con PD/o LY. Le curve di crescita riportano la percentuale di cellule rispetto a quelle contate al tempo zero per ciascun campione e poste pari a 100, mentre i saggi di vitalità riportano la percentuale di cellule adese morte rispetto alle cellule adese totali. Gli istogrammi e le curve sono stati ottenuti analizzando i valori medi ottenuti dalle conte di tre campioni con il programma Microsoft Office Excel (2007).

In questo saggio di proliferazione analizzando la prima curva (C vs. M) si osserva che l'induzione dell'espressione di K-RASG12V provoca un modesto rallentamento del tasso di proliferazione rispetto alle cellule C a 24, 48 e 72 ore. Il test di vitalità mostra che la percentuale di cellule morte resta invariata fra le 24 e 48 ore e aumenta a 72 ore in modo

paragonabile nei due campioni (C e M). L'aggiunta dell'inibitore PD sia in cellule controllo che trattate riduce il tasso di proliferazione rispetto ai campioni C e M (C vs. C+PD e M vs. M+PD), ma le cellule C+PD continuano a proliferare seppur con un tasso di crescita ridotto. Diversamente le cellule M+PD presentano un blocco della proliferazione nelle prime 48 ore, e una ripresa della crescita nelle successive 24 ore. La mortalità cellulare aumenta nel campione C+PD rispetto a C e anche, ma per le prime 48 ore in misura inferiore, nel campione M+PD rispetto a M. Il trattamento con l'inibitore LY sia in cellule controllo che indotte blocca la proliferazione cellulare già nelle prime 24 ore. Inoltre, il decremento del numero delle cellule totali risulta maggiore nelle cellule M rispetto a C. L'analisi dei risultati ottenuti nel saggio di vitalità rivela che la percentuale di cellule morte C+LY e M+LY è più apprezzabile a 24 ore che a 48 ore e aumenta notevolmente a 72 ore. Infine, l'aggiunta contemporanea di entrambi gli inibitori, in questo saggio, mostra che il numero di cellule C+PD+LY decrementa nelle prime 24 ore, per poi rimanere invariato fino a 48 ore e diminuire ancora di più a 72 ore. Anche il campione M+PD+LY ha lo stesso andamento, ma il trattamento simultaneo con i due inibitori sembra avere un effetto citotossico minore rispetto a quello osservato nelle cellule non indotte. Tuttavia, in entrambe le popolazioni cellulari a 72 ore si osserva un'altissima percentuale di cellule morte.

## **SAGGI DI PROLIFERAZIONE E DI VITALITÀ CELLULARE SUL CLONE K13 TRATTATO CON GLI INIBITORI PD98059 E LY294002**

Anche per il campione K13 ho eseguito due saggi di proliferazione e vitalità cellulare in triplicato e sono stati preparati i campioni C, C+PD, C+LY, C+PD+LY, M, M+PD, M+LY ed M+PD+LY trattati per 24, 48 e 72 ore (come descritto in Materiali e Metodi). In figura 26 sono riportati le curve di crescita ottenute in uno dei due esperimenti contando le cellule adese totali, sia vive (bianche) che morte (blu), mentre gli istogrammi relativi alla vitalità cellulare riportano la percentuale di cellule morte sul totale di cellule contate. In queste analisi non sono incluse le cellule staccatesi dal substrato e passate in sospensione. Anche in questo caso, i due esperimenti hanno dato risultati simili.



**Fig. 26.** Curve di crescita di cellule K13 trattate (rosso) con Mifepristone e/o PD e/o LY e cellule controllo (blu) trattate e non con PD/o LY. Istogrammi di vitalità cellulare di cellule K13 trattate (rosso) con Mifepristone e/o PD e/o LY e cellule controllo (blu) trattate e non con PD/o 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, mentre i saggi di vitalità riportano la percentuale di cellule adese morte rispetto alle cellule adese totali. Gli istogrammi e le curve sono stati ottenuti analizzando i valori medi ottenuti dalle conte di tre campioni con il programma Microsoft Office Excel (2007).

In questo saggio di proliferazione si osserva che l'espressione di K-RASG13D provoca un rallentamento del tasso di proliferazione rispetto alle cellule C a 24 e 48 ore (C vs. M). Dopo 48 ore le cellule M riprendono a crescere anche se sempre con un minor tasso di proliferazione rispetto a C. Il test di vitalità mostra un aumento progressivo della mortalità cellulare. Il trattamento con l'inibitore PD in cellule sia controllo che indotte non riduce nelle

prime 24 ore il tasso di proliferazione, mentre si osserva una riduzione del numero di cellule totali adese a 48 ore, poi nelle successive 24 ore le cellule riprendono a crescere. Il test di vitalità rivela che la percentuale di cellule adese morte nel campione C+PD a 48 e 72 ore è maggiore che nel campione C, mentre nelle cellule M+PD è inferiore a quella delle cellule M. Il trattamento con l'inibitore LY sia in cellule C che M causa già nelle prime 24 ore un decremento del numero di cellule totali. Tuttavia, dopo le 48 ore, le cellule mostrano una ripresa della proliferazione che risulta maggiore nelle cellule C rispetto a M. I dati ottenuti dal test di vitalità mostrano che la percentuale di mortalità diminuisce progressivamente fra le 24 e le 72 ore sia per le cellule controllo che per cellule trattate. Infine, l'aggiunta contemporanea di entrambi gli inibitori causa un effetto più severo di quello osservato con il solo trattamento con l'inibitore LY soprattutto in cellule C. Il saggio di vitalità rivela che la percentuale di cellule morte diminuisce progressivamente per il campione C+PD+LY, mentre si osserva un progressivo aumento per il campione M+PD+LY.

## **ANALISI DEGLI EFFETTI DEGLI INIBITORI PD98059 E LY294002 SUL CICLO CELLULARE E SULL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA p21 IN CELLULE K12**

Mediante citofluorimetria ho quindi condotto un'analisi sugli effetti degli inibitori PD98059 e LY294002 sul ciclo cellulare delle cellule K12 controllo e in condizioni di espressione di K-RASG12V. Sono stati condotti quattro esperimenti indipendenti in triplicato preparando le cellule controllo (C), controllo+PD (C+PD), controllo+LY (C+LY), trattate (M), trattate+PD (M+PD) e trattate+LY (M+LY) e un esperimento in triplicato usando anche i campioni controllo+PD+LY (C+PD+LY) e trattato+PD+LY (M+PD+LY).

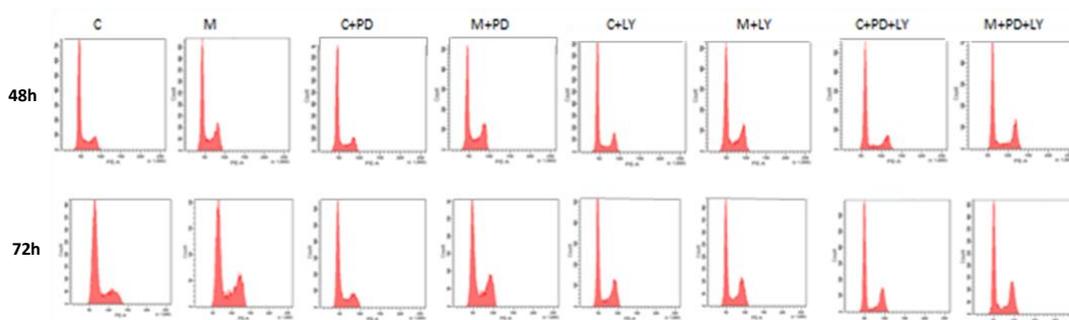
Al termine dell'incubazione (48 o 72 ore) i campioni di ciascuna fiasca sono stati tripsinizzati, lavati in PBS e contati per prelevare da ogni campione tre aliquote di  $10^5$  cellule da analizzare al citofluorimetro. Il resto della sospensione cellulare è stato lisato per condurre le analisi Western Blot descritte in seguito.

Una prima analisi al microscopio ha evidenziato differenze apprezzabili nella proliferazione dei campioni. In particolare, dopo 48 e 72 ore per i controlli è stato osservato che: le cellule C+LY hanno subito un forte rallentamento della crescita cellulare formando gruppi cellulari più piccoli e mostrando molte più cellule in sospensione rispetto alle cellule C, mentre il campione C+PD non ha mostrato differenze nella crescita, e nella quantità di cellule in

sospensione rispetto al campione controllo. Infine, le cellule C+LY+PD (esperimento 4) mostrano lo stesso effetto osservato nel campione C+LY. Anche per i campioni in cui era stata indotta l'espressione di K-RASG12V sono state osservate delle differenze fenotipiche e sulla crescita: i campioni M+PD ed M+LY sono cresciuti meno rispetto alle cellule M, presentando gruppi cellulari più piccoli e, nel caso di M+LY molte più cellule in sospensione. Il trattamento con entrambi gli inibitori (esperimento 4) anche in questo caso ha mostrato lo stesso effetto osservato nelle cellule M+LY. Inoltre, sia le cellule C+LY che M+LY sono cresciute meno rispetto a C+PD ed M+PD.

In figura 27 sono mostrati i grafici ottenuti dall'analisi di singole aliquote di cellule prelevate da ciascuno dei campioni analizzati in triplicato e che sono relative all'esperimento 4.

Nella tabella C (v. Appendice) sono riportati, per ciascuno dei saggi effettuati, i valori della percentuale di cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare dopo 48 e 72 ore di trattamento, ottenuti in triplicato per ciascun campione, le medie e le deviazioni standard ( $M \pm DV$ ).

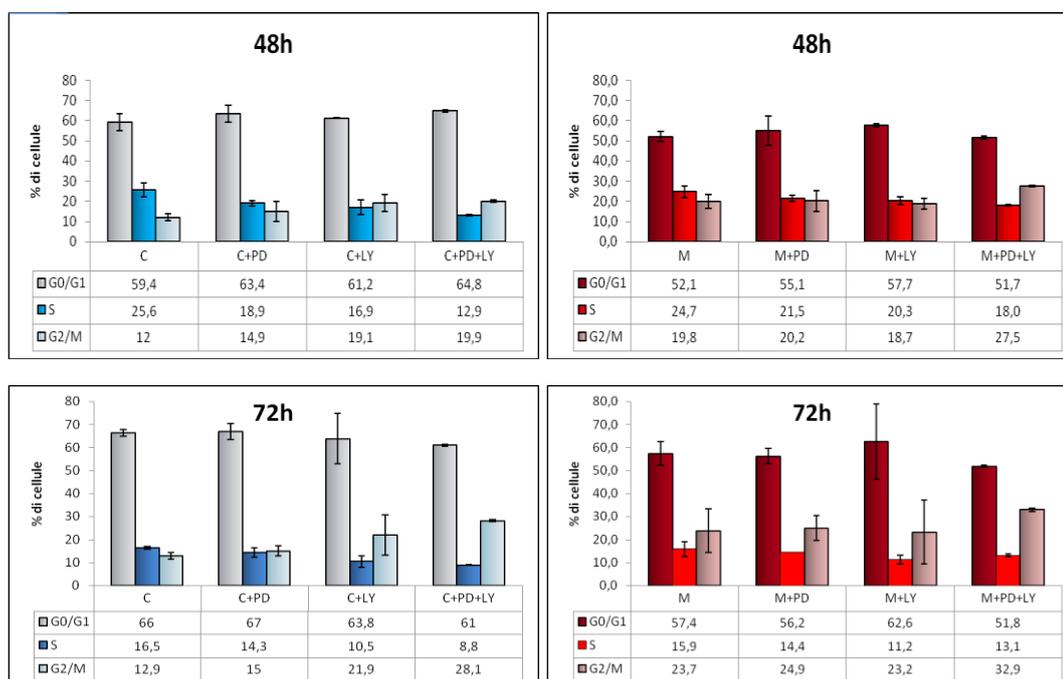


**Fig. 27.** Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria eseguita sulle cellule K12 non indotte (C) e indotte (M); controllo trattato con PD (C+PD) e/o con LY (C+LY e C+PD+LY) e indotte con PD (M+PD) e/o con LY (M+LY e M+PD+LY) per 48 e 72 ore. I grafici riportano in ordinata il numero di cellule e in ascissa il contenuto di DNA. I grafici riportati in figura sono stati ottenuti da singoli campioni di cellule analizzati mediante il software BD FACSDiva.

La figura 28 mostra gli istogrammi ottenuti calcolando la percentuale media di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare prendendo in considerazione tutti gli esperimenti condotti. Solo per i campioni C e M trattati con entrambi gli inibitori (C+PD+LY e M+PD+LY) è riportata la percentuale media di cellule ottenuta da un singolo esperimento condotto in triplicato. A sinistra è rappresentato il grafico relativo ai campioni C, C+PD, C+LY e C+LY+PD e a destra quello relativo a M, M+PD, M+LY e M+PD+LY.

L'analisi degli effetti degli inibitori sul ciclo cellulare risulta complessa quindi, per semplificarla, in tabella 4 è stato deciso di riportare, per ogni fase del ciclo cellulare, le

differenze in termini di aumento (+) o diminuzione (-) tra la media espressa in percentuale delle cellule controllo e la media della percentuale di cellule sottoposte ai vari trattamenti.



**Fig. 28.** Rappresentazione grafica dei valori espressi in percentuale della quantità di cellule presenti nelle singole fasi del ciclo cellulare ottenuti calcolando la media di tutti gli esperimenti condotti. In particolare, i campioni C, M, C+PD, M+PD, C+LY, M+LY 48 ore sono stati ottenuti dalla media di 4 esperimenti indipendenti in triplicato; i campioni C, M, C+PD, M+PD, C+LY, M+LY 72 ore sono stati ottenuti dalla media di 2 esperimenti indipendenti in triplicato; i campioni C+PD+LY e M+PD+LY a 48 e 72 ore sono stati ottenuti da un singolo esperimento in triplicato. In grigio, azzurro e celeste sono rappresentati i valori ottenuti per le fasi G0/G1, S e G2/M delle cellule controllo (C) e controllo con PD (20  $\mu$ M) e/o LY (25  $\mu$ M) (C+PD, C+LY e C+PD+LY); in rosso scuro, rosso e rosa sono rappresentati i valori ottenuti per le fasi G0/G1, S e G2/M delle cellule indotte (M) e indotte con PD e/o LY (M+PD, M+LY e M+PD+LY). Le medie, le deviazioni standard e gli istogrammi sono stati ottenuti con il programma Microsoft Office Excel (2007). I valori di p value riportati nel testo sono stati calcolati con il programma Graphpad.

	48h			72h		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
<b>C</b>	59,4%	25,6%	12%	66%	16,5%	12,9%
<b>M</b>	-7,3	-1	+7,8	-8,8	-0,6	+10,8
<b>C+PD</b>	+4	-6,7	+2,9	+1	-2,2	+2,1
<b>M+PD</b>	-4,3	-4,2	+8,1	-9,8	-2,1	+12
<b>C+LY</b>	+1,8	-8,7	+7,1	-2,2	-6	+9
<b>M+LY</b>	-1,7	-5,3	+6,7	-3,4	-5,3	+10,3
<b>C+PD+LY</b>	+5,4	-12,7	+7,9	-5	-7,7	+15,2
<b>M+PD+LY</b>	-7,7	-7,6	+15,5	-14,2	-3,4	+20

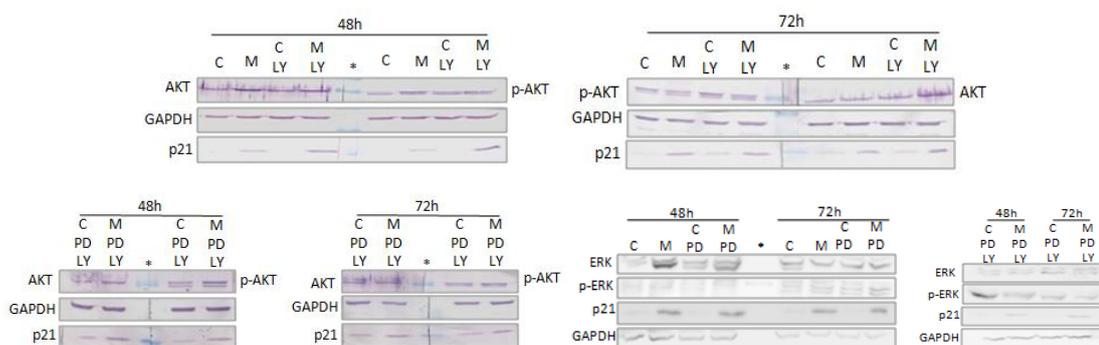
**Tab.4.** La tabella riporta i risultati di tutti i saggi di citofluorimetria condotti sul clone K12 dopo 48 e 72 ore di induzione con Mifepristone e/o con gli inibitori. In particolare sono riportate le differenze, per ogni fase del ciclo cellulare, tra le medie della percentuale di cellule K12 sottoposte ai vari trattamenti per 48 e 72 ore e quella del campione controllo (v. Tabella C in Appendice).

Analizzando i dati riportati nella tabella 4 si può concludere che dopo 48 e 72 ore dall'induzione di K-RASG12V aumenta la percentuale di cellule in fase G2/M mentre si riduce la percentuale di cellule in fase G0/G1 e tale effetto è maggiore 72 ore dopo l'induzione rispetto alle 48 ore. Per la fase S, invece, non si osservano particolari variazioni nel numero di cellule rispetto al controllo. Questo risultato conferma i precedenti dati di citofluorimetria.

Il trattamento di cellule M con PD non annulla l'aumento osservato in fase G2/M anzi, a 72 ore rafforza il blocco provocato dall'ormone. La riduzione in fase G0/G1 è attenuata dal trattamento con l'inibitore PD a 48 ore, mentre non sembra avere nessun effetto a 72 ore. Il trattamento di cellule M con l'inibitore LY a 48 e a 72 ore non provoca nessuna variazione nell'aumento della percentuale di cellule in fase G2/M. L'aggiunta dell'inibitore LY riesce a contrastare il decremento della percentuale di cellule in G0/G1 provocato dall'ormone con un effetto maggiore dopo 48 ore rispetto alle 72 ore. Infine, in tutti gli esperimenti, sia dopo 48 ore che 72 ore di trattamento, la percentuale di cellule in fase S è più bassa nei campioni M+PD e M+LY rispetto al campione M e nel campione C. L'aggiunta contemporanea di entrambi gli inibitori mostra che PD e LY operano in sinergia nell'influenzare il ciclo cellulare, infatti l'effetto osservato è maggiore rispetto a quello ottenuto con i singoli inibitori. L'analisi dei risultati ottenuti risulta tuttavia piuttosto complessa perché si deve tenere conto anche degli effetti che PD e LY hanno sulle cellule controllo. Entrambi gli inibitori, ma soprattutto LY, causano un blocco in fase G2/M e i due inibitori sembrano avere un effetto additivo. In fase G0/G1 si osserva quasi sempre un blocco del ciclo cellulare a 48 ore con PD e/o LY, ma l'effetto maggiore si ottiene con l'inibitore PD. A 72 ore, invece, solo PD causa un aumento della percentuale di cellule in fase G0/G1, mentre LY sembra ridurla. In questa fase del ciclo cellulare i due inibitori non sembrano lavorare in sinergia e prevale l'effetto di LY. Infine, entrambi gli inibitori ma soprattutto LY, riducono sia a 48 ore che a 72 ore la percentuale di cellule in fase S. In tutti i casi, l'analisi statistica dei dati ottenuti attribuisce alla differenze osservate fra i vari campioni un p value compreso fra 0,1 e 0,5 e di 0,04 nel caso di M vs. M+LY a 48 ore.

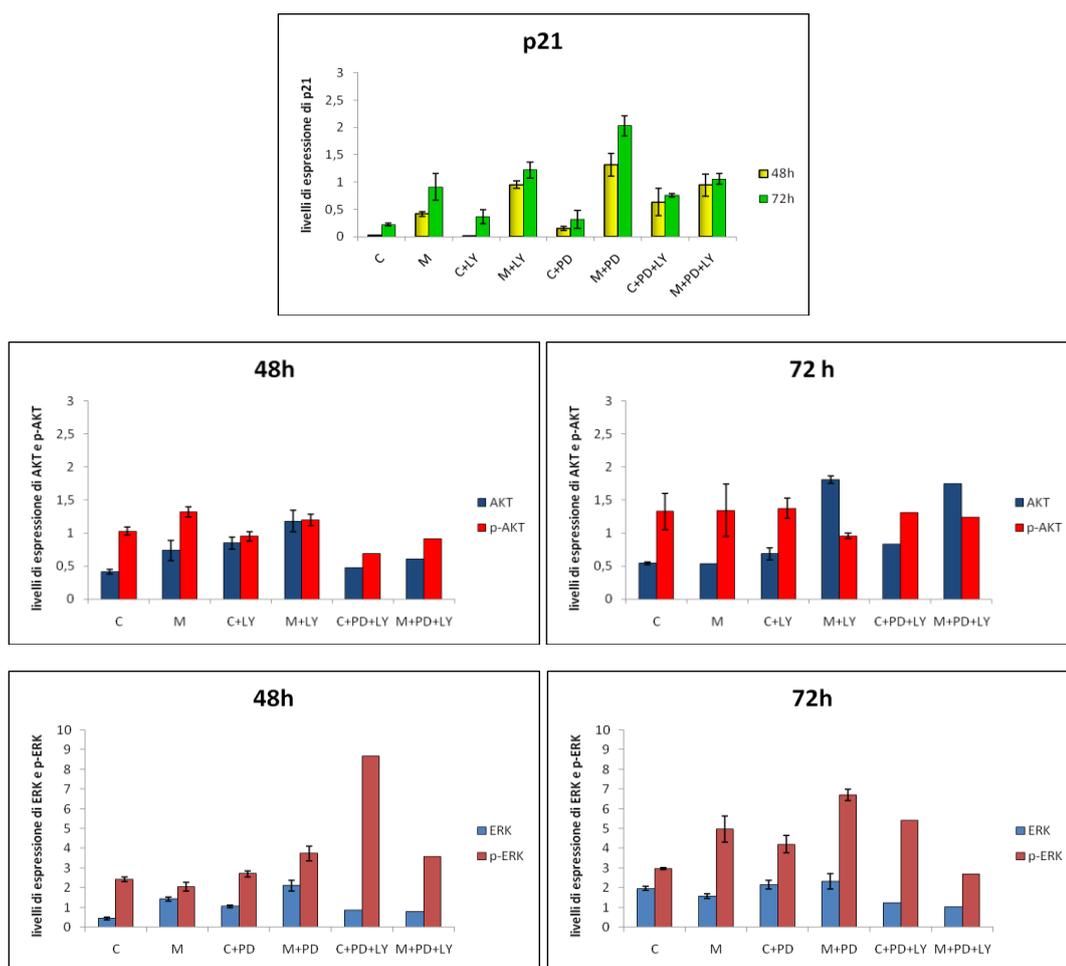
Dopo le analisi sul ciclo cellulare del clone K12, 48 e 72 ore dopo il trattamento con l'inibitore LY e/o PD in presenza o assenza di Mifepristone, ho effettuato saggi Western Blot per analizzare l'espressione della proteina p21. I saggi Western Blot sono stati condotti sui lisati preparati con gli stessi campioni da cui erano state prelevate tre aliquote per condurre le analisi citofluorimetriche. Per valutare l'effettiva inibizione della PI3K ad opera dell'inibitore LY sono stati presi in considerazione i livelli di fosforilazione delle proteine AKT1/2/3 e per valutare l'inibizione delle chinasi MEK1/2 ad opera del PD si è analizzato il grado di fosforilazione delle ERK1/2.

In figura 29 è mostrato il risultato di un saggio rappresentativo delle analisi condotte a 48 e a 72 ore per valutare la variazione dell'espressione della proteina p21 in presenza di PD e/o LY e l'efficacia dell'inibitore.



**Fig. 29.** Saggi Western Blot condotti sulle cellule K12 per analizzare l'espressione di p21 dopo 48 e 72 ore di trattamento in cellule indotte (M) e non (C) con e senza l'inibitore LY e/o PD e per valutare l'avvenuta inibizione della PI3K o della MEK. La proteina GAPDH è stata utilizzata per normalizzare il caricamento. Alcuni filtri sono stati incubati con anticorpi secondari AP coniugati e sviluppati con BCIP, altri con anticorpi secondari HRP coniugati e sviluppati con il Western Bright Sirius detection kit. Le bande visibili del marker (\*) sono relativi ai pesi molecolari 64 kDa (glutammico deidrogenasi) e 16 kDa (lisozima).

In figura 30 sono riportati anche gli istogrammi dei valori ottenuti analizzando l'intensità delle bande del filtro di nitrocellulosa con il programma ImageJ e normalizzandola rispetto alla GAPDH.



**Fig. 30.** In alto: rappresentazione grafica dell'espressione di p21 in cellule K12 normalizzata rispetto alla GAPDH per ciascun campione, controllo (C), trattato (M), controllo+inibitore (C+LY e/o PD) e trattato+inibitore (M+LY e/o PD) a 48 (giallo) e 72 (verde) ore. In basso: rappresentazioni grafiche dell'espressione delle proteine AKT (blu), p-AKT (rosso), ERK (azzurro) e p-ERK (rosso scuro) normalizzata rispetto alla GAPDH per ciascun campione. Gli istogrammi sono stati realizzati con il programma Microsoft Office Excel (2007) e rappresentano la media di 3 esperimenti per AKT e p-AKT (48 ore) e 2 esperimenti per AKT e p-AKT (72 ore) nei campioni C, M, C+LY e M+LY; 1 esperimento per AKT e p-AKT (48 e 72 ore) nei campioni C+PD+LY e M+PD+LY; 2 esperimenti per ERK e p-ERK (48 e 72 ore) nei campioni C, M, C+PD e M+PD; 1 esperimento per ERK e p-ERK (48 e 72 ore) nei campioni C+PD+LY e M+PD+LY; 6 esperimenti per p21 (48 e 72 ore) nei campioni C e M; 5 esperimenti per p21 nei campioni C+LY e M+LY (48 ore); 4 esperimenti per p21 nei campioni C+LY, M+LY (48 e 72 ore) e C+PD+LY e M+PD+LY (72 ore); 2 esperimenti per p21 nei campioni C+PD+LY (48 ore) e nei campioni C+PD e M+PD (48 e 72 ore).

L'analisi quantitativa delle bande mostra che l'aggiunta di Mifepristone stimola l'espressione della proteina p21, confermando il dato precedentemente mostrato. L'inibizione del pathway della PI3K, sembrerebbe aumentare il suo livello poco in cellule controllo (C) e molto in cellule indotte (M) nelle quali l'effetto è maggiore a 48 ore rispetto alle 72 ore. Anche il trattamento con l'inibitore PD che non ha effetti rilevanti sulle cellule controllo sembrerebbe stimolare nelle cellule indotte la quantità di proteina p21 con un effetto maggiore a 72 ore. Anzi, il PD sembra avere un effetto più importante rispetto all'inibitore LY. Nelle cellule indotte tale effetto è apparentemente annullato quando il PD viene aggiunto insieme a LY,

mentre nei campioni C la presenza simultanea dei due inibitori stimola l'espressione di p21 un po' più che ciascuno di essi da solo.

Inoltre, sembra che il trattamento con l'ormone induca a 48 ore un aumento di p-AKT e che, l'inibitore LY in cellule C e M abbia solo un lieve effetto nel ridurre i livelli. Nei campioni C+LY e M+LY aumenta la quantità di AKT. Dopo 72 ore di induzione si osserva che nel campione M il livello di espressione di p-AKT è simile al livello osservato nel campione C, mentre nel campione M+LY diminuisce notevolmente e, ancora una volta, in questo campione il livello di AKT aumenta. Il trattamento con entrambi gli inibitori PD+LY riduce il livello di p-AKT a 48 ore, sia nel campione C che M. Anche a 72 ore sembra ridurlo un po' ma solo nel campione indotto con l'ormone.

Il trattamento con l'ormone induce un aumento del grado di fosforilazione di ERK solo dopo 72 ore di trattamento, al contrario, a 48 ore sembra esserci un'inibizione della fosforilazione della chinasi. Sorprendentemente l'inibitore PD non riduce i livelli di p-ERK, ma anzi sembra accrescerli sia nel campione controllo che nel campione indotto. Inoltre, nel campione M+PD aumenta anche la quantità di proteina ERK 48 ore e 72 ore dopo il trattamento. L'aggiunta contemporanea di entrambi gli inibitori per 48 e 72 ore aumenta il grado di fosforilazione di ERK nel campione controllo, molto a 48 ore e un po' meno a 72 ore, mentre nelle cellule in cui è stata indotta l'espressione di K-RASG12V la quantità di pERK aumenta poco a 48 ore e torna quasi ai livelli del campione controllo a 72 ore.

## **ANALISI DEGLI EFFETTI DEGLI INIBITORI PD98059 E LY294002 SUL CICLO CELLULARE E SULL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA p21 IN CELLULE K13**

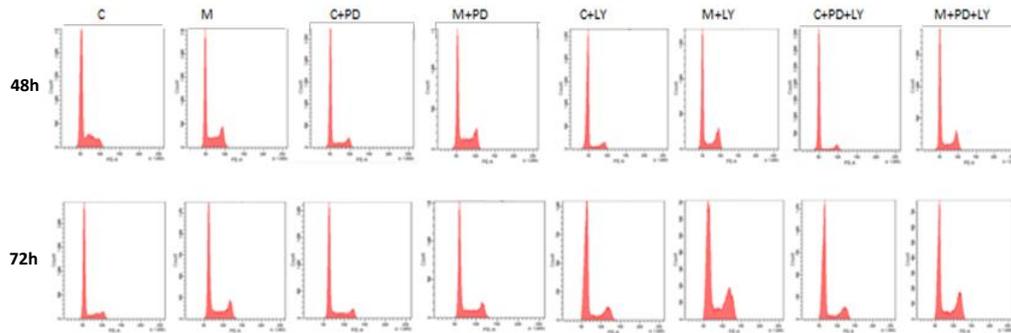
Dopo le analisi sulle cellule K12 ho condotto anche due esperimenti di citofluorimetria indipendenti in triplicato sul clone K13 trattato e non trattato con gli inibitori LY (25  $\mu$ M) e/o PD (20  $\mu$ M) per 48 e 72 ore in presenza e assenza di induzione dell'espressione di K-RASG13D.

Le cellule sono state piastrate in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> e sono stati preparati i campioni C, C+LY, C+PD, C+PD+LY, M, M+LY, M+PD, e M+PD+LY, che sono stati usati per le analisi del ciclo cellulare e per la preparazione dei lisati totali, come è stato descritto precedentemente per il clone K12. Dopo 48 ore di trattamento non è stata osservata nessuna differenza

fenotipica tra i diversi campioni, ad eccezione delle cellule trattate con LY (C+LY, M+LY, C+PD+LY e M+PD+LY) che hanno mostrato un leggero rallentamento della proliferazione. Dopo 72 ore, invece, sono state osservate al microscopio delle differenze. In particolare, per i controlli è stato osservato che: le cellule C+LY hanno subito un forte rallentamento della crescita cellulare formando gruppi cellulari più piccoli rispetto alle cellule C, mentre il campione C+PD non ha mostrato differenze nel ritmo di crescita, nella morfologia dei gruppi cellulari e nella quantità di cellule in sospensione rispetto al campione controllo. Infine, le cellule C+LY+PD hanno presentato un rallentamento della crescita cellulare formando gruppi più piccoli come il campione C+LY. Anche per i campioni in cui era stata attivata l'espressione dell'isoforma mutata di RAS, sono state osservate delle differenze fenotipiche e sulla crescita: nel campione M+LY le cellule hanno formato gruppi cellulari di piccole dimensioni paragonabili alle cellule M, ma dai contorni meno frastagliati e le cellule in sospensione erano meno numerose rispetto alle cellule trattate soltanto con Mifepristone; le cellule trattate con PD, invece sono apparse paragonabili alle cellule M, infatti, molte cellule hanno perso la capacità di aderire alla superficie di crescita della fiasca e i gruppi cellulari hanno mostrato contorni frastagliati come nel campione M, ma di dimensioni più piccole. Infine, il trattamento con entrambi gli inibitori ha determinato poche cellule in sospensione e la formazione di gruppi cellulari dai contorni meno frastagliati come per il campione in cui era stato aggiunto solo l'inibitore LY, ma più grandi come nel caso del trattamento con il solo PD. Inoltre, i due inibitori usati contemporaneamente sembrano avere avuto un maggiore effetto nelle cellule controllo (gruppi cellulari più piccoli) rispetto alle cellule indotte (gruppi cellulari più grandi).

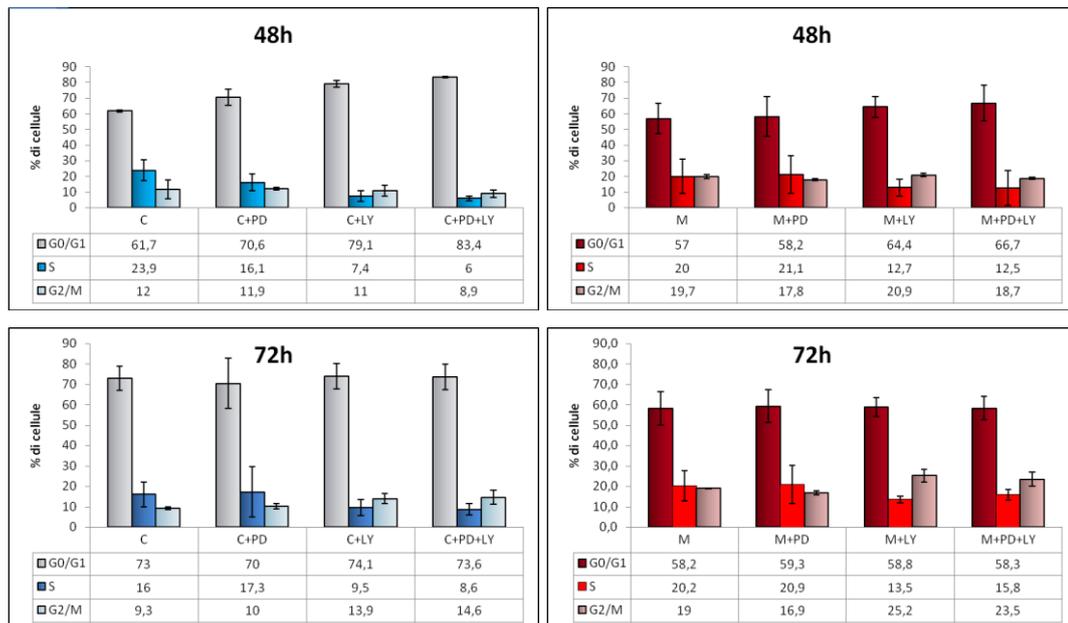
In figura 31 sono mostrati i grafici delle analisi condotte ottenuti al citofluorimetro e relativi a una delle tre aliquote di ciascuno dei campioni analizzati in triplicato e che sono relativi all'esperimento 2.

Nella tabella D (v. Appendice) sono riportati i valori della percentuale di cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare dopo 48 e 72 ore di trattamento, ottenuti in triplicato per ciascun campione.



**Fig. 31.** Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria eseguita sulle cellule K13 non indotte (C) e indotte (M); controllo trattato con PD (C+PD) e/o con LY (C+LY) e indotte con PD (M+PD) e/o con LY (M+LY) per 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.

La figura 32 mostra gli istogrammi ottenuti calcolando la percentuale media di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare prendendo in considerazione tutti gli esperimenti condotti. A sinistra è rappresentato il grafico relativo ai campioni C, C+PD, C+LY e C+LY+PD e a destra quello relativo a M, M+PD, M+LY e M+PD+LY.



**Fig. 32.** Rappresentazione grafica dei valori espressi in percentuale della quantità di cellule presenti nelle singole fasi del ciclo cellulare ottenuti calcolando la media dei due esperimenti condotti. In grigio, azzurro e celeste sono rappresentati i valori ottenuti per le fasi G0/G1, S e G2/M delle cellule controllo (C) e controllo con PD (20  $\mu$ M) e/o LY (25  $\mu$ M) (C+PD, C+LY e C+PD+LY); in rosso scuro, rosso e rosa sono rappresentati i valori ottenuti per le fasi G0/G1, S e G2/M delle cellule indotte (M) e indotte con PD e/o LY (M+PD, M+LY e M+PD+LY). Le medie, le deviazioni standard e gli istogrammi sono stati ottenuti con il programma Microsoft Office Excel (2007).

Anche in questo caso l'analisi degli effetti degli inibitori sul ciclo cellulare risulta complessa quindi, per semplificarla, in tabella 5 è stato deciso di riportare, per ogni fase del ciclo cellulare, le differenze in termini di aumento (+) o diminuzione (-) tra la media espressa in percentuale delle cellule controllo e la media della percentuale di cellule sottoposte ai vari trattamenti.

	48h			72h		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
<b>C</b>	61,7%	23,9%	12%	73%	16%	9,3%
<b>M</b>	-4,7	-3,9	+7,7	-14,8	+4,2	+9,7
<b>C+PD</b>	+2,9	-7,8	+0,1	-3	+1,3	+0,7
<b>M+PD</b>	-3,5	-2,8	+5,8	-13,7	+4,9	+7,6
<b>C+LY</b>	+17,4	-16,5	-1	+1,1	-6,5	+4,6
<b>M+LY</b>	+2,7	-11,2	+8,9	-14,2	-2,5	+15,9
<b>C+PD+LY</b>	+21,7	-17,9	-3,1	-0,6	-7,4	+5,3
<b>M+PD+LY</b>	+5	-11,4	+6,7	-14,7	-0,2	+14,2

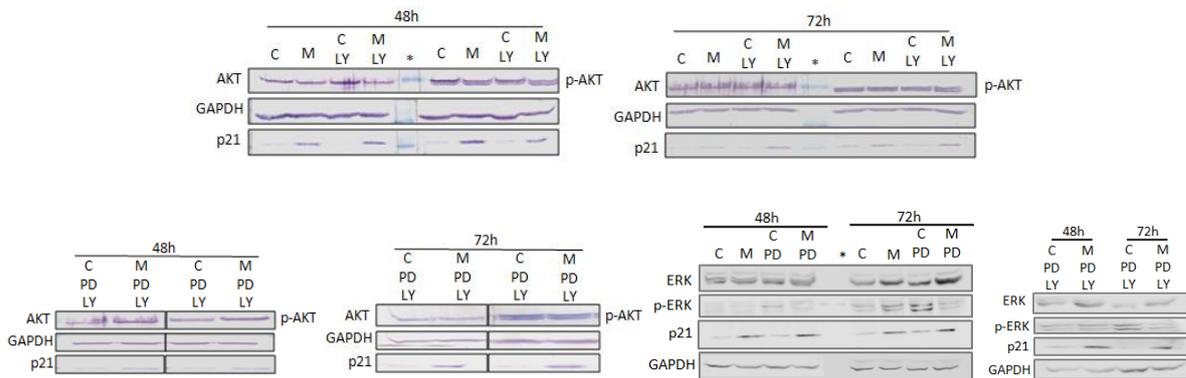
**Tab.5.** La tabella riporta le differenze, per ogni fase del ciclo cellulare, tra le medie della percentuale di cellule K13 sottoposte ai vari trattamenti per 48 e 72 ore e quella del campione controllo (v. Tabella D in Appendice). I valori sono stati ottenuti dalla media di due esperimenti indipendenti in triplicato a 48 e a 72 ore.

L'analisi dei dati riportati in tabella 5 e in figura 32 mostra che sia dopo 48 che 72 ore dall'induzione di K-RASG13D la percentuale di cellule M in fase G2/M aumenta, mentre si riduce in fase G0/G1. Si ha inoltre una diminuzione della frazione di cellule in fase S dopo 48 ore, ma si osserva un aumento considerevole dopo 72 ore. In realtà, fra le 48 e le 72 ore, è la distribuzione delle cellule controllo nelle fasi del ciclo cellulare a cambiare, mentre resta invariata per le cellule indotte.

L'aggiunta dell'inibitore PD alle cellule M non annulla gli effetti dell'ormone, soprattutto in fase G2/M, anche se sembra attenuarlo. L'inibitore LY non modifica in modo significativo l'accumulo di cellule in G2/M e anzi a 72 ore lo rafforza. LY provoca invece un aumento del numero di cellule K13 M in fase G0/G1 del ciclo cellulare solo a 48 ore, mentre non sembra modificare l'effetto dell'ormone a 72 ore. L'inibitore LY causa una forte diminuzione nella percentuale di cellule in fase S a 48 ore rafforzando l'effetto dell'ormone, mentre a 72 ore ne contrasta l'effetto. L'aggiunta contemporanea di entrambi gli inibitori al campione M ha un effetto non molto diverso dall'aggiunta del solo LY. A differenza di quanto osservato nelle cellule K12, nel clone K13 i due inibitori PD e LY non sembrano avere un effetto additivo. Anche questa volta l'analisi risulta piuttosto complessa, perché si deve tenere conto degli effetti degli inibitori sulle cellule controllo. In particolare, si osserva che l'aggiunta di PD e

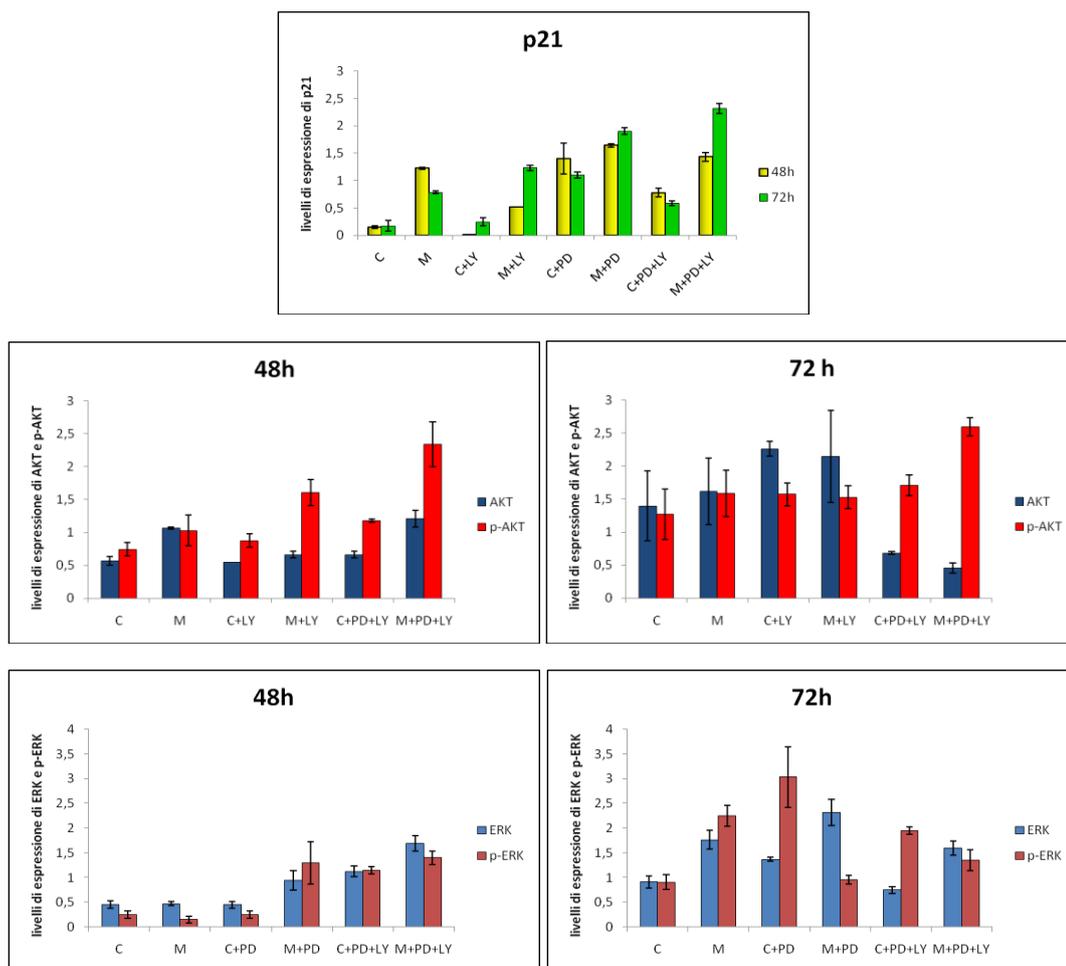
soprattutto di LY a 48 ore provoca una netta diminuzione nel numero di cellule in fase S e un accumulo in fase G0/G1. La percentuale di cellule in fase G2/M diminuisce un po' in presenza di LY e PD+LY, mentre non è modificata dal PD. Dopo 72 ore, la riduzione della percentuale di cellule in fase S è mantenuta solo nei campioni C+LY e C+PD+LY, al contrario, l'inibitore PD causa un leggero aumento. La frazione di cellule in fase G2/M aumenta 72 ore dopo il trattamento con LY o PD+LY, mentre l'aggiunta di PD non sembra provocare nessun effetto. Si osserva un lieve aumento della frazione di cellule in fase G0/G1 solo in presenza di LY. Il PD causa un lieve decremento della percentuale di cellule in questa fase del ciclo.

Anche per il clone K13 ho condotto saggi Western Blot sui lisati ottenuti dalle stesse cellule utilizzate per le analisi del ciclo cellulare. In figura 33 è mostrato il risultato di un saggio rappresentativo delle analisi condotte a 48 e a 72 ore per valutare la variazione dell'espressione della proteina p21 in presenza di PD e/o LY e l'efficacia dell'inibitore.



**Fig. 33.** Saggi Western Blot condotti sulle cellule K13 per analizzare l'espressione di p21 dopo 48 ore e 72 ore di trattamento in cellule indotte (M) e non (C) con e senza l'inibitore LY e/o PD e per valutare l'avvenuta inibizione della PI3K o della MEK. La proteina GAPDH è stata utilizzata per normalizzare il caricamento. Alcuni filtri sono stati incubati con anticorpi secondari AP coniugati e sviluppati con BCIP, altri con anticorpi secondari HRP coniugati e sviluppati con il Western Bright Sirius detection kit. Le bande visibili del marker (\*) sono relativi ai pesi molecolari 64 kDa (glutammico deidrogenasi), 36 kDa (anidrasi carbonica) e 16 kDa (lisozima).

In figura 34 sono riportati gli istogrammi dei valori ottenuti analizzando l'intensità delle bande del filtro con il programma ImageJ e normalizzandola rispetto alla GAPDH.



**Fig. 34.** In alto: rappresentazione grafica dell'espressione di p21 in cellule K13 per ciascun campione, controllo (C), trattato (M), controllo+inibitore (C+LY e/o PD) e trattato+inibitore (M+LY e/o PD) a 48 (giallo) e 72 ore (verde). In basso: Rappresentazioni grafiche dell'espressione delle proteine AKT (blu), p-AKT (rosso), ERK (azzurro) e p-ERK (rosso scuro) normalizzata rispetto alla GAPDH per ciascun campione. Gli istogrammi sono stati realizzati con il programma Microsoft Office Excel (2007) e rappresentano la media di 3 esperimenti per AKT e p-AKT (48 e 72 ore) nei campioni C e M, 2 esperimenti per AKT e p-AKT (48 e 72 ore) nei campioni C+LY, M+LY, C+PD+LY e M+PD+LY; 6 esperimenti per p21 (48 ore) e 7 (72 ore) nei campioni C e M; 3 esperimenti per p21 (48 ore) nei campioni C+LY e M+LY; 4 esperimenti per p21 (48 e a 72 ore) nei campioni C+PD+LY e M+PD+LY; 4 esperimenti per p21 (72 ore) nei campioni C+LY e M+LY; 2 esperimenti per p21 (48 e 72 ore) nei campioni C+PD e M+PD; 2 esperimenti per ERK, p-ERK (48 e 72 ore) nei campioni C, M, C+PD, M+PD, C+PD+LY e M+PD+LY.

L'analisi quantitativa delle bande mostra che l'aggiunta di Mifepristone stimola l'espressione della proteina p21, confermando il dato precedente. Paragonando i campioni K13 M e K13 M+LY, si osserva che il trattamento per 48 ore con l'inibitore riduce il livello di espressione di p21, causandone invece un aumento dopo 72 ore. In cellule controllo, LY sembrerebbe avere solo un lieve effetto a 72 ore. Il trattamento con l'inibitore PD delle cellule K13 M sembra stimolare un aumento di p21 sia a 48 ore che a 72 ore, come in cellule K12.

Inoltre, a differenza di LY, l'inibizione del pathway delle MAP chinasi causa un aumento di p21 in cellule C. Anche nel clone K13, l'inibitore PD ha un effetto maggiore rispetto a LY. Nelle cellule K13 C trattate con entrambi gli inibitori, il livello di espressione di p21 è intermedio rispetto a quello osservato nelle cellule trattate con solo LY o PD, ma lo stesso non avviene in cellule indotte, dove i livelli di p21 a 72 ore sono più elevati di quelli osservati in cellule trattate con il solo LY o con il solo PD.

Il trattamento con l'ormone induce a 48 ore un aumento di p-AKT e AKT, come avviene anche in cellule K12. Dopo 48 ore l'inibitore LY in cellule C+LY provoca un lieve aumento della fosforilazione della chinasi, invece, in cellule M+LY la quantità di p-AKT aumenta maggiormente. Dopo 72 ore di induzione si osserva che nel campione M il livello di espressione di p-AKT resta più alto di quello osservato nel campione C, e simile a quello dei campioni C+LY e M+LY. In questi campioni aumenta anche il livello di AKT, come era stato osservato nel clone K12. Il trattamento con entrambi gli inibitori PD+LY aumenta un poco il livello di p-AKT a 48 e a 72 ore nel campione C, e ancora di più nel campione M.

Come in cellule K12, il trattamento con l'ormone induce un aumento del grado di fosforilazione di ERK solo dopo 72 ore di trattamento, al contrario, a 48 ore sembra esserci una debole inibizione della fosforilazione della chinasi. L'inibitore PD a 48 ore non riduce i livelli di p-ERK, ma anzi li accresce nel campione indotto, mentre non sembra avere effetto nel controllo. Dopo 72 ore, PD provoca nelle cellule controllo un apprezzabile incremento di p-ERK mentre ne riduce il livello nelle cellule indotte. Inoltre, nei campioni M+PD a 48 e 72 ore aumenta anche la quantità di proteina ERK, come in cellule K12. L'aggiunta contemporanea di entrambi gli inibitori a 48 ore accresce sia nelle cellule controllo che indotte il livello sia di ERK che di p-ERK. Dopo 72 ore nelle cellule controllo si riducono i livelli di ERK e p-ERK rispetto a C+PD, mentre nelle cellule indotte p-ERK aumenta.

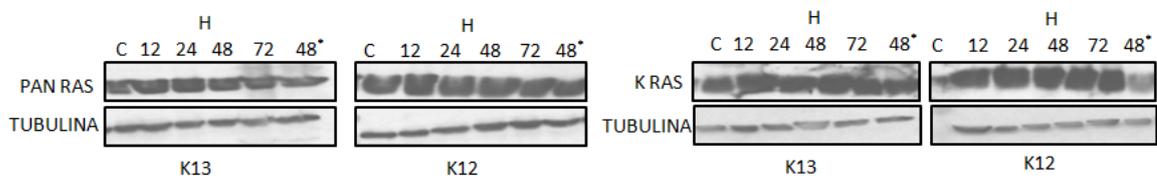
## **ANALISI DEGLI EFFETTI DEL MIFEPRISTONE SULL'ESPRESSIONE DI RAS E K-RAS IN CELLULE K13 E K12**

Durante gli ultimi tre mesi del mio dottorato ho condotto esperimenti all'*University College* di Dublino (UCD) presso il dipartimento *Systems Biology Ireland* (SBI) nel laboratorio del Professor Walter Kolch, dove mi sono recata grazie ad una borsa di studio.

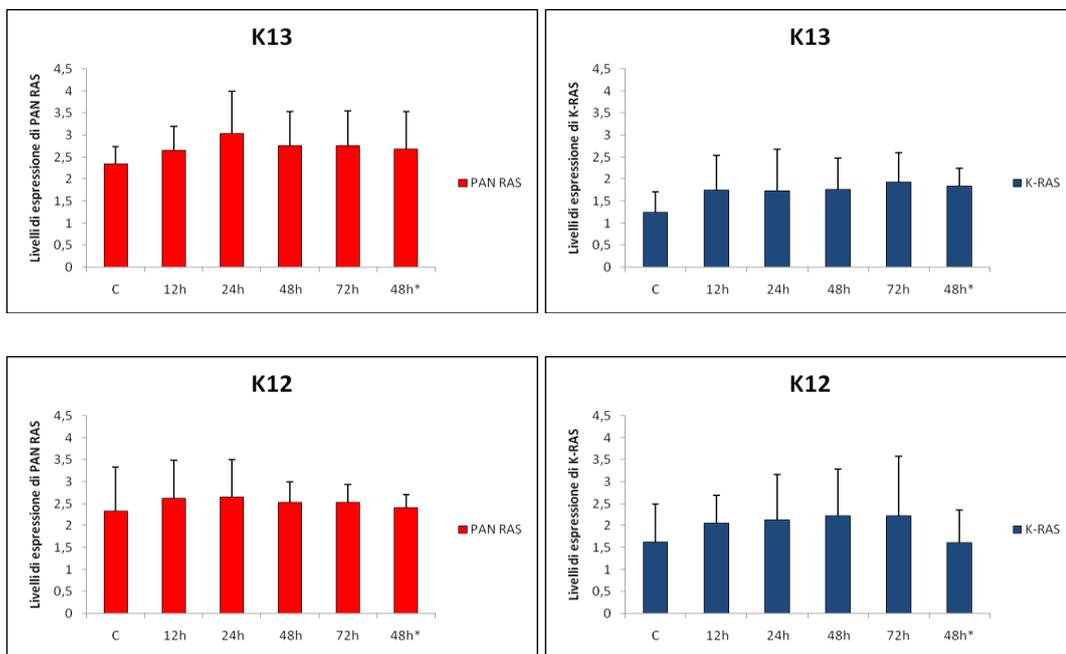
Inizialmente ho condotto tre saggi Western Blot per valutare gli effetti del trattamento dei cloni con Mifepristone a 12, 24, 48 e 72 ore sull'espressione di tutte le isoforme di RAS (H-,

K- e N-RAS), usando un anticorpo primario anti-PAN RAS, e in particolare sull'espressione dell'isoforma K-RAS usando un anticorpo specifico. Gli esperimenti sono stati condotti su entrambi i cloni e sono stati preparati i campioni controllo (K12 C e K13 C) e trattati per 12, 24, 48 e 72 ore (K12 M e K13 M). Inoltre, è stato preparato un sesto campione in cui l'ormone è stato rimosso dopo 24 ore, si è aggiunto terreno fresco senza Mifepristone e le cellule sono state raccolte e lisate il giorno seguente (K12 e K13 M 48\*ore).

Il risultato di uno dei saggi Western Blot è mostrato in figura 35, mentre in figura 36 sono riportati gli istogrammi ottenuti dalla media di tre esperimenti.



**Fig. 35.** Saggi Western Blot condotti sulle cellule K13 e K12 sull'espressione di RAS totale (PAN RAS) e K-RAS dopo 12, 24, 48 e 72 ore di trattamento e non (C). I campioni 48\* sono stati trattati per 24 ore con Mifepristone che è stato allontanato nelle 24 ore successive. La proteina TUBULINA è stata utilizzata per normalizzare il caricamento.



**Fig. 36.** Rappresentazioni grafiche dei livelli di espressione di PAN RAS, in rosso a sinistra, e K-RAS, in blu a destra normalizzati rispetto ai valori della TUBULINA per ciascun campione controllo (C), trattato 12, 24, 48 e 72, e trattato 24 ore con Mifepristone e lasciato crescere senza l'ormone nelle 24 ore successive (48h\*). La media e la deviazione standard sono stati calcolati su tre esperimenti indipendenti per ciascun clone. Gli istogrammi sono stati realizzati con il programma Microsoft Office Excel (2007).

L'analisi dei risultati suggerisce, nonostante l'ampia variabilità rivelata dalle deviazioni standard, che il trattamento con Mifepristone induce in entrambi i cloni già nelle prime 12 ore un aumento di espressione della proteina K-RAS, il cui livello si mantiene più o meno stabile nel tempo fra le 24 e le 72 ore e ciò risulta in accordo con l'aumento dei livelli di PAN RAS. Infine, nelle cellule K12 tenute in coltura per 24 ore con Mifepristone e 24 ore senza i livelli della proteina K-RAS tornano paragonabili al controllo, mentre in cellule K13 l'effetto del Mifepristone continua anche 24 ore dopo che è stato allontanato.

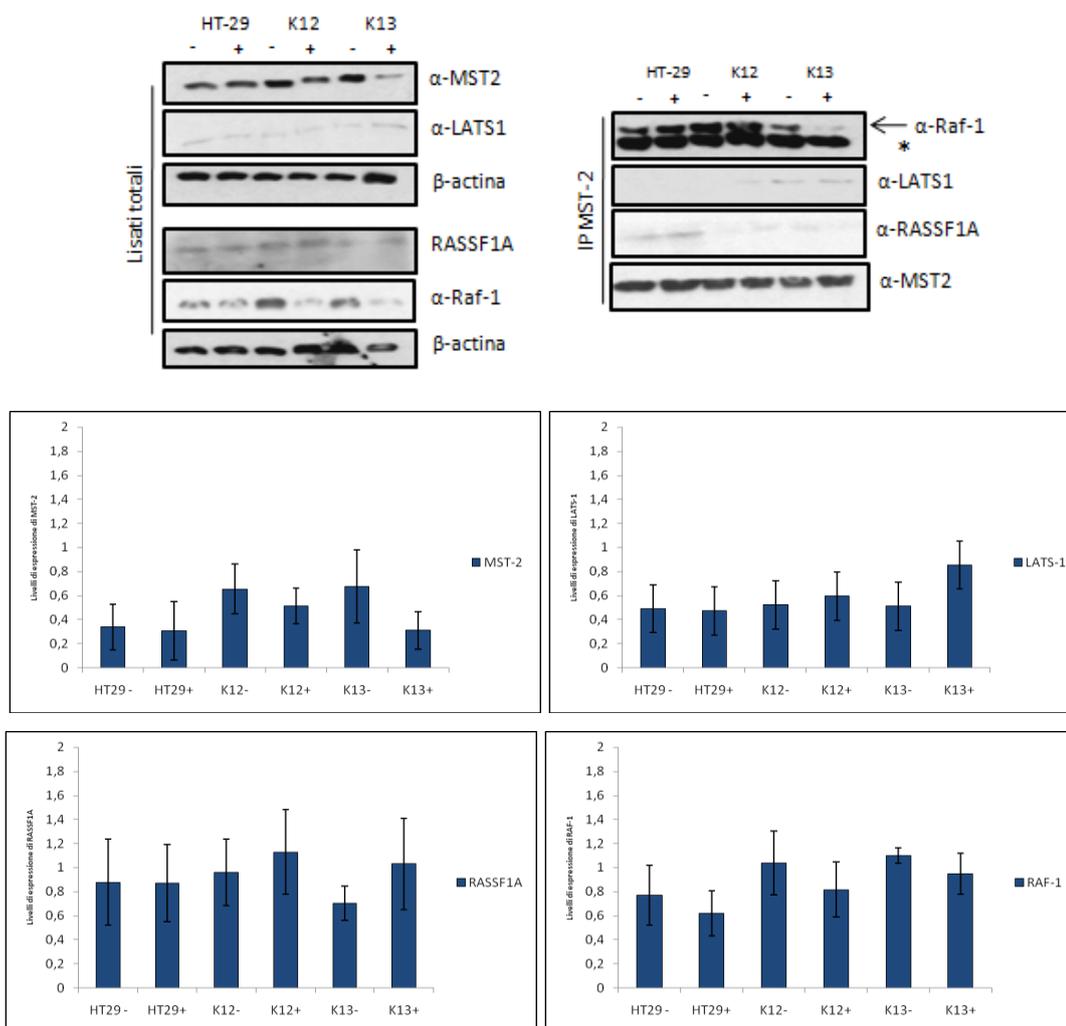
L'analisi dell'espressione di RAS suggerisce che gli effetti osservati nei precedenti esperimenti inducendo l'espressione delle due isoforme mutate non sembra possano essere attribuiti a una gran differenza dei livelli di proteina fra C ed M, ma proprio alla presenza della mutazione. Anche le differenze fra le cellule K12 M e K13 M non possono essere dovute a diverse quantità di proteina indotta, ma proprio alla diversa mutazione.

Dopo aver verificato che il Mifepristone mantiene i livelli di espressione di K-RAS costanti nel tempo è stato deciso di condurre i successivi esperimenti trattando i cloni per 48 ore.

## **ANALISI DEL PATHWAY PRO-APOPTOTICO RASSF1A-MST2-LATS1 E ANTI-APOPTOTICO RAF-1-MST2 IN CELLULE HT-29, K12 E K13**

Un importante pathway proapoptotico regolato da RAS è RASSF1A-MST2-LATS1. Il legame di RAF-1 con MST2 inibisce la formazione del complesso pro-apoptotico RASSF1A-MST2. Inoltre, l'attivazione di RAS da parte di stimoli mitogeni inibisce il legame RAF-1-MST2 senza causare l'attivazione di MST2. Quando la chinasi MST2 è legata a RASSF1A, è capace di attivare la proteina LATS1 che permette la stabilizzazione di p53 e attiva l'apoptosi (v. Introduzione). Per indagare sulla regolazione di questo pathway nei cloni K12 e K13 e in cellule HT-29 ho condotto sei esperimenti di co-immunoprecipitazione (IP) per la proteina MST2. Sono stati preparati i campioni K12, K13 e HT-29 controllo (C) e K12, K13 e HT-29 trattati (M) per 48 ore. Dopo aver lisato le cellule, aliquote di lisati contenenti 200 µg di proteine sono state immunoprecipitate con un anticorpo anti-MST2, mentre altre aliquote sono state utilizzate per valutare in saggi Western la presenza e abbondanza relativa, nel lisato totale di ciascun campione, delle proteine MST2, LATS1, RASSF1A e RAF-1. La figura 37 mostra il risultato di uno degli esperimenti di co-immunoprecipitazione, rappresentativo dei

sei eseguiti, e di un saggio Western Blot rappresentativo degli esperimenti condotti. Gli istogrammi rappresentano l'intensità media normalizzata rispetto alla  $\beta$ -ACTINA delle bande ottenute in 4 saggi Western per MST2 e RAF-1, 5 per LATS1 e 3 per RASSF1A.

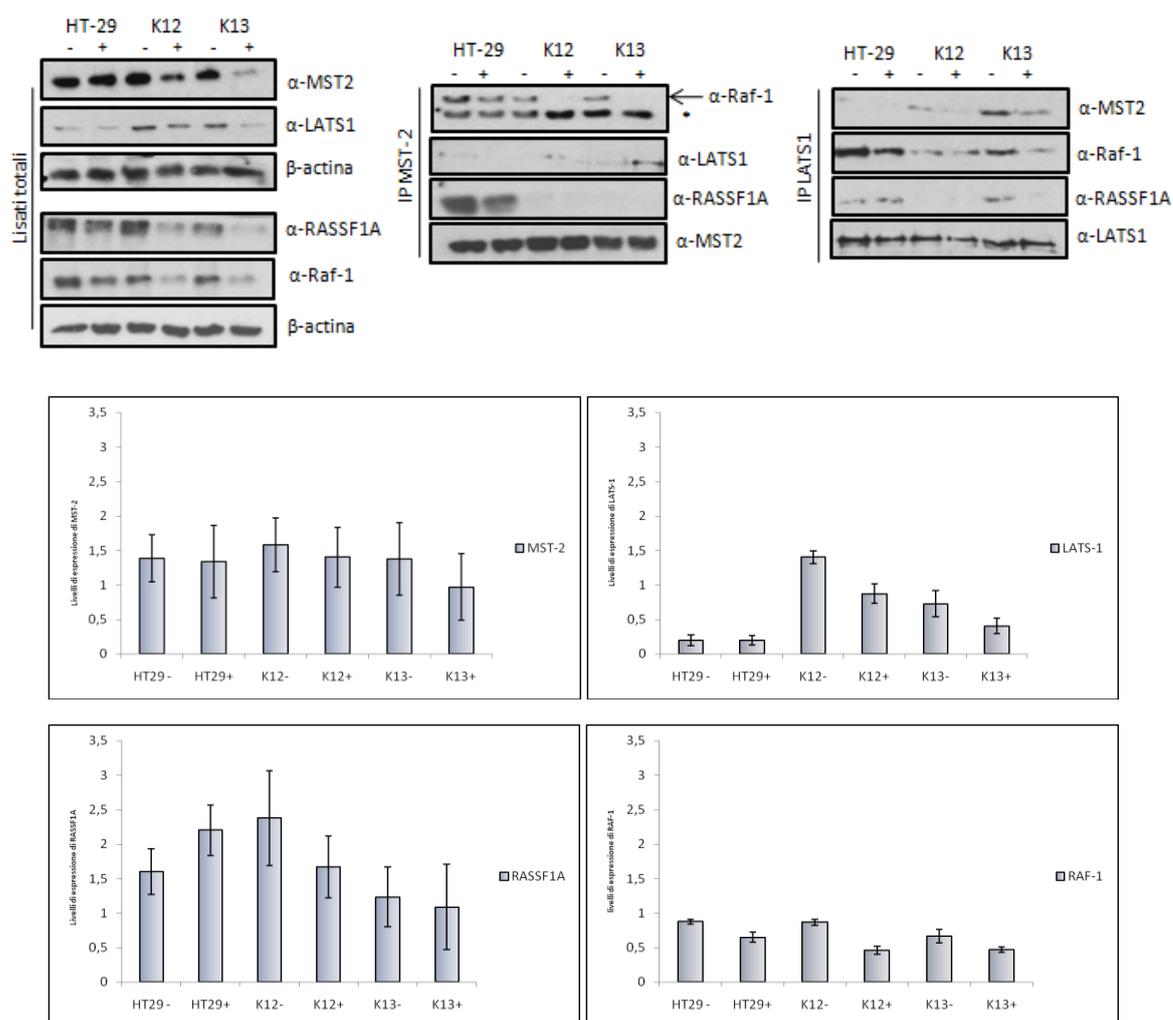


**Fig. 37.** Co-immunoprecipitazione per la proteina MST2 e saggi Western Blot sui lisati totali di cellule HT-29 controllo (-), HT-29 trattate 48 ore (+), K12 controllo (-), K12 trattate 48 ore (+), K13 controllo (-) e K13 trattate 48 ore (+). L'asterisco (\*) indica le bande generate dall'anticorpo secondario. La proteina  $\beta$ -ACTINA è stata utilizzata per normalizzare il caricamento. Gli istogrammi sono stati realizzati con il programma Microsoft Office Excel (2007).

L'analisi dei dati ottenuti nei saggi Western condotti sui lisati totali mostra che i cloni K12 e K13 controllo presentano livelli di espressione maggiori e paragonabili tra loro della proteina MST2 rispetto alla linea parentale HT-29. L'induzione dell'espressione di entrambe le forme mutate di K-RAS sembra diminuire i livelli di espressione di questa proteina e tale effetto è maggiore in cellule K13 rispetto alle K12. I livelli di espressione di LATS1 sono paragonabili tra i cloni controllo e la linea parentale, e il trattamento con l'ormone sembra stimolare un lieve aumento di questa proteina in K12 e in modo più marcato nelle cellule K13. I livelli di espressione della proteina RASSF1A sono più bassi in cellule K13 C rispetto al clone K12 C

e alle cellule HT-29. Anche in questo caso, l'aggiunta dell'ormone stimola l'espressione di RASSF1A, con un effetto maggiore per il clone K13. La situazione opposta si osserva per la proteina RAF-1, infatti, K-RAS mutata sembra diminuirne i livelli di espressione, ma l'effetto è maggiore nelle cellule K12 rispetto alle K13. Infine, l'espressione di RAF-1 è maggiore nei cloni K12 C e K13 C rispetto alle cellule HT-29.

L'analisi dell'IP per MST2 mostra che in cellule HT-29 c'è una forte interazione con la chinasi RAF-1, che sembra aumentare nel clone K12 sia controllo che trattato (l'asterisco in figura indica una banda generata dalla reazione dell'anticorpo secondario con l'IgG). In saggi reciproci di immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-RAF-1 e la successiva analisi dell'immunoprecipitato con anticorpo anti-MST2 non evidenzia alcuna banda (dato non mostrato). Nel clone K13, invece, si osserva una minore quantità di proteina RAF-1 che immunoprecipita con MST2 rispetto alle cellule HT-29 e K12. Tale interazione è poi drasticamente ridotta per attivazione dell'espressione di K-RASG13D. In questo clone, inoltre, si osserva un'interazione tra MST2 e LATS1 non evidenziabile invece nelle HT-29 e nelle K12 C e presente, ma più debole, nelle K12 M. Nelle HT-29 si rileva invece una interazione di MST2 con RASSF1A, presente anche ma molto più debole negli altri campioni. Successivamente ho condotto sei co-immunoprecipitazioni per MST2 e tre per LATS1 preparando i campioni HT-29, K13 e K12 C e trattati con Mifepristone per 48 ore. In questi esperimenti le cellule sono state fatte crescere 36 ore in terreno completo con siero al 10% e poi, 12 ore prima della raccolta, in terreno senza siero, in modo da non stimolare l'attivazione di RAS *wild type* e analizzare gli effetti della sola attivazione delle due isoforme mutate di K-RAS (Fig. 38). In parallelo, come nell'esperimento precedente, sono stati condotti saggi Western sui lisati totali.



**Fig. 38.** Co-immunoprecipitazione per le proteine MST2 e LATS1 e saggi Western Blot sui lisati totali di cellule HT-29 controllo (-), HT-29 trattate 48 ore (+), K12 controllo (-), K12 trattate 48 ore (+), K13 controllo (-) e K13 trattate 48 ore (+). In questi esperimenti le cellule sono state fatte crescere in terreno con siero per 36 ore e in mezzo senza siero per 12 ore. L'asterisco (\*) indica le bande generate dall'anticorpo secondario. La proteina β-ACTINA è stata utilizzata per normalizzare il caricamento. Gli istogrammi sono stati realizzati con il programma Microsoft Office Excel (2007).

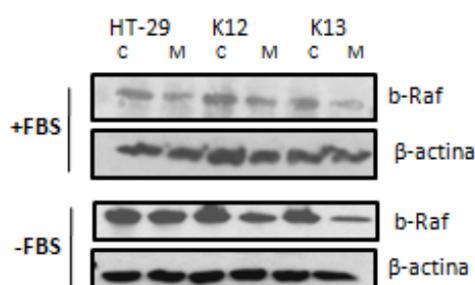
I dati ottenuti dall'analisi dei lisati totali rivela che l'attivazione dell'espressione di K-RASG12V e K-RASG13D diminuisce i livelli di LATS1 e l'effetto sembra essere simile nei due cloni. Anche in queste condizioni di crescita i livelli di espressione della proteina RASSF1A sono diminuiti in cellule K13 C rispetto al clone K12 C e alle cellule HT-29 e l'aggiunta di Mifepristone diminuisce l'espressione di questa proteina con un effetto maggiore nel clone K13. I livelli della MAP chinasi RAF-1 sono paragonabili nelle cellule controllo, ma l'espressione delle forme mutate di K-RAS provoca una diminuzione e non sembrano esserci delle differenze sull'effetto delle due mutazioni.

L'analisi dell'IP per MST2 mostra che l'espressione di K-RASG12V e K-RASG13D provoca la dissociazione di MST2 dal complesso inibitorio con RAF-1 e stimola invece, almeno in

K13, il suo legame a LATS1. Nei cloni, indotti e controllo, RASSF1A è presente solo in tracce o assente negli immunoprecipitati MST2 o LATS1, diversamente a quello che si osserva in cellule HT-29. I risultati delle immunoprecipitazioni e dei Western, anche se non forniscono informazioni definitive, tendono comunque a confermare che K-RASG12V e K-RASG13D hanno effetti diversi sia sui livelli delle proteine analizzate che sulle interazioni fra di esse e stimolano a condurre ulteriori indagini.

### **ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA MAP CHINASI BRAF IN CELLULE HT-29, K12 E K13**

Le analisi Western Blot riportate nel precedente paragrafo hanno mostrato che l'espressione di K-RASG12V e K-RASG13D causa una diminuzione dei livelli della proteina RAF-1 (Fig. 37 e 38). Questo risultato ha suggerito di condurre un'ulteriore analisi sui possibili effetti che K-RAS mutata potrebbe avere sui livelli di altre proteine MAP chinasi. In particolare, è stata analizzata l'espressione della proteina B-RAF. Anche per questi saggi Western Blot sono stati preparati campioni controllo e trattati fatti crescere per 48 ore in terreno completo (+FBS) e campioni in cui il siero è stato allontanato per 12 ore prima della raccolta (-FBS), per analizzare solo gli effetti dell'attivazione delle due forme mutate di K-RAS. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato per ciascuna condizione di crescita e in figura 39 è riportato il risultato di un saggio Western Blot rappresentativo degli esperimenti condotti.



**Fig. 39.** Saggi Western Blot sui lisati totali di cellule HT-29 controllo (C), HT-29 trattate 48 ore (M), K12 controllo (C), K12 trattate 48 ore (M), K13 controllo (C) e K13 trattate 48 ore (M) e fatte crescere in terreno con siero (+FBS 48 ore) o senza (+FBS 36 ore e -FBS 12 ore). La proteina ACTINA è stata utilizzata per normalizzare il caricamento.

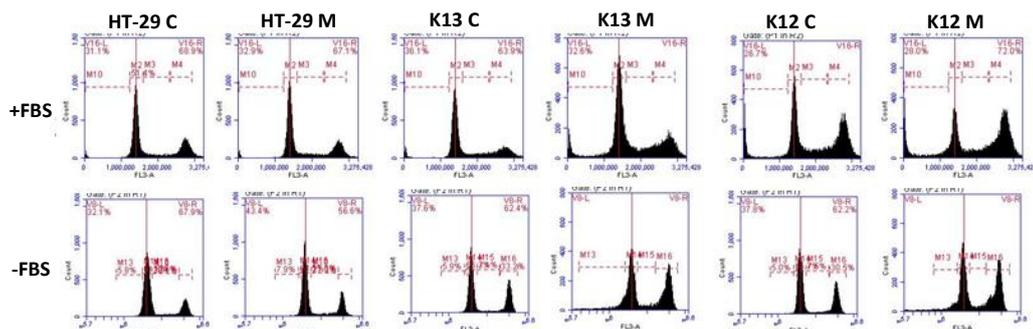
Il risultato ottenuto mostra che attivazione dell'espressione di K-RASG12V o K-RASG13D sia in presenza che in assenza di siero provoca una diminuzione anche di questa chinasi. Inoltre, si osserva che quando non è stimolata l'attivazione di RAS *wild type* i livelli di B-RAF aumentano notevolmente rispetto a quelli osservati negli stessi campioni fatti crescere in mezzo completo.

## **ANALISI DEI EFFETTI DI RAS SULLA MORTE CELLULARE**

Durante il mio periodo all'estero ho condotto ulteriori analisi citofluorimetriche con il Propidio Ioduro sulle cellule HT-29 e sui cloni K12 e K13 trattati (M) e non (C) per 48 ore. In questa serie di esperimenti, in cui le cellule sono state piastrate in piastre da 60 mm e, incubate per 48 ore, sono state raccolte sia le cellule adese che le cellule in sospensione nel mezzo di crescita (nei primi saggi sul ciclo cellulare dei cloni K12 e K13, invece, erano state analizzate solo le cellule adese e inoltre non erano state condotte analisi sulla linea parentale). Dopo un lavaggio in PBS ogni campione è stato diviso in due aliquote per eseguire le analisi sul ciclo e sulla mortalità cellulare (descritte in seguito). Allo stesso modo sono stati preparati i campioni HT-29, K12 e K13 C e M fatti crescere 36 ore in terreno completo e 12 ore in mezzo privo di siero (HT-29, K12 e K13 C e M 48h\* -FBS). In assenza di siero, l'isoforma *wild type* di RAS non viene attivata, e ciò consente di valutare l'effetto della sola K-RAS mutata, costitutivamente attiva.

Per le analisi sul ciclo cellulare, le cellule sono state fissate in etanolo e, successivamente, incubate per un'ora con Propidio Ioduro (v. Materiali e Metodi). Al termine dell'incubazione i campioni sono stati processati al citofluorimetro e in figura 40 sono mostrati i grafici rappresentativi delle analisi condotte.

In figura 41 sono mostrati gli istogrammi relativi alla media di tre esperimenti per ciascun campione e a sinistra sono mostrati i campioni HT-29, K12 e K13 C e M 48h +FBS, mentre a destra le cellule HT-29, K12 e K13 C e M 48h\* -FBS.



**Fig. 40.** Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria eseguita sulle cellule HT-29, K12 e K13 controllo (C) e incubate con Mifepristone (M) per 48 ore. Le cellule sono state fatte crescere per 48 ore in terreno con siero (+FBS) o per 36 ore in terreno completo e poi per 12 ore in un mezzo senza siero (-FBS). Per le analisi sono state raccolte sia le cellule adese al substrato di crescita che le cellule in sospensione nel terreno. I grafici riportano in ordinata il numero di cellule e in ascissa il contenuto di DNA. I grafici riportati in figura sono stati ottenuti da singoli campioni di cellule analizzati mediante il software BD Accuri™C6.



**Fig. 41.** Rappresentazione grafica dei valori espressi in percentuale della quantità di cellule presenti nelle singole fasi del ciclo cellulare, ottenuti calcolando la media di tre esperimenti indipendenti. In blu sono rappresentati i valori ottenuti per le fasi G0/G1, S e G2/M delle cellule controllo (C); in fucsia i valori ottenuti per le fasi G0/G1, S e G2/M delle cellule trattate (M). A sinistra sono mostrati i campioni HT-29, K12 e K13 C e M 48h +FBS, mentre a destra le cellule HT-29, K12 e K13 C e M 48h\* -FBS, incubate per 12 ore senza siero. Le medie, le deviazioni standard e gli istogrammi sono stati ottenuti con il programma Microsoft Office Excel (2007). Il valore di p value è stato calcolato con il programma Graphpad: \*\*\* $p < 0,005$ ; \*\* $p < 0,05$ ; \* $p \leq 0,5$ .

Per quanto riguarda i campioni incubati per 48 ore sempre in presenza di siero, gli istogrammi mostrano che il trattamento con Mifepristone non ha alcun effetto sulla linea parentale, confermando il dato ottenuto nelle curve di crescita (v. Premessa).

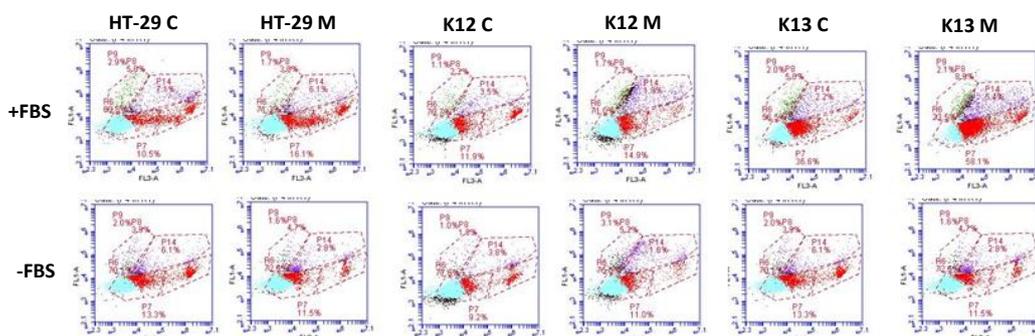
Le cellule K12 C hanno una distribuzione nelle fasi del ciclo cellulare simile alla linea parentale, mentre, il clone K13 C ha una maggiore frazione di cellule in fase G2/M e una minore percentuale di cellule in fase G0/G1. Il trattamento con l'ormone conferma il risultato ottenuto precedentemente in entrambi i cloni e che le due diverse mutazioni di K-RAS hanno lo stesso effetto sulla distribuzione delle cellule nelle fasi G0/G1 e G2/M e un diverso effetto sulla fase S. L'analisi delle cellule in fase pre-G0/G1 che nei saggi precedenti non era mai stata valutata, mostra che le HT-29 e il clone K12 C hanno una bassa frazione di cellule in questa fase, mentre la percentuale è più elevata nel campione K13 C. Il trattamento con l'ormone in entrambi i cloni raddoppia la quantità di cellule in pre-G0/G1 mentre non ha effetti sulle HT-29.

Le cellule K12 e K13 C -FBS mostrano una percentuale di cellule in pre-G0/G1 e G0/G1 simile a quella delle HT-29, una ridotta frazione di cellule in fase S e una percentuale di cellule maggiore in G2/M. Confrontando i campioni +FBS e -FBS si osserva che quando non è stimolata l'attivazione di RAS *wild type* da fattori di crescita in cellule HT-29 aumenta la frazione di cellule in fase G0/G1. In queste condizioni, per quanto riguarda le K12 C si osserva una riduzione della percentuale in fase S e un aumento in G2/M rispetto alle stesse cellule tenute in presenza di siero. Per le K13 C, l'assenza di siero aumenta la frazione in G0/G1 e riduce quella in fase pre-G0/G1, S e G2/M. Il trattamento con l'ormone diminuisce la frazione di cellule K12 e K13 M -FBS in fase G0/G1 rispetto alle cellule controllo, come in presenza di siero, ma con un effetto maggiore. Inoltre, in cellule K12 M -FBS la fase G2/M diminuisce un po' rispetto alle cellule controllo, quindi si osserva un effetto opposto quando l'espressione di K-RAS mutata è attivata in cellule non stimolate da fattori di crescita per 12 ore. L'aggiunta dell'ormone sembrerebbe non avere nessun effetto sulla fase S. Infine, si osserva un aumento delle cellule in fase pre-G0/G1 in presenza dell'ormone e l'effetto è uguale sia con l'attivazione di K-RASG13D che con K-RASG12V. Tuttavia, solo per le cellule K13 M, la quantità di cellule in fase pre-G0/G1 rimane nettamente inferiore rispetto alle cellule K13 M cresciute in FBS per 48 ore.

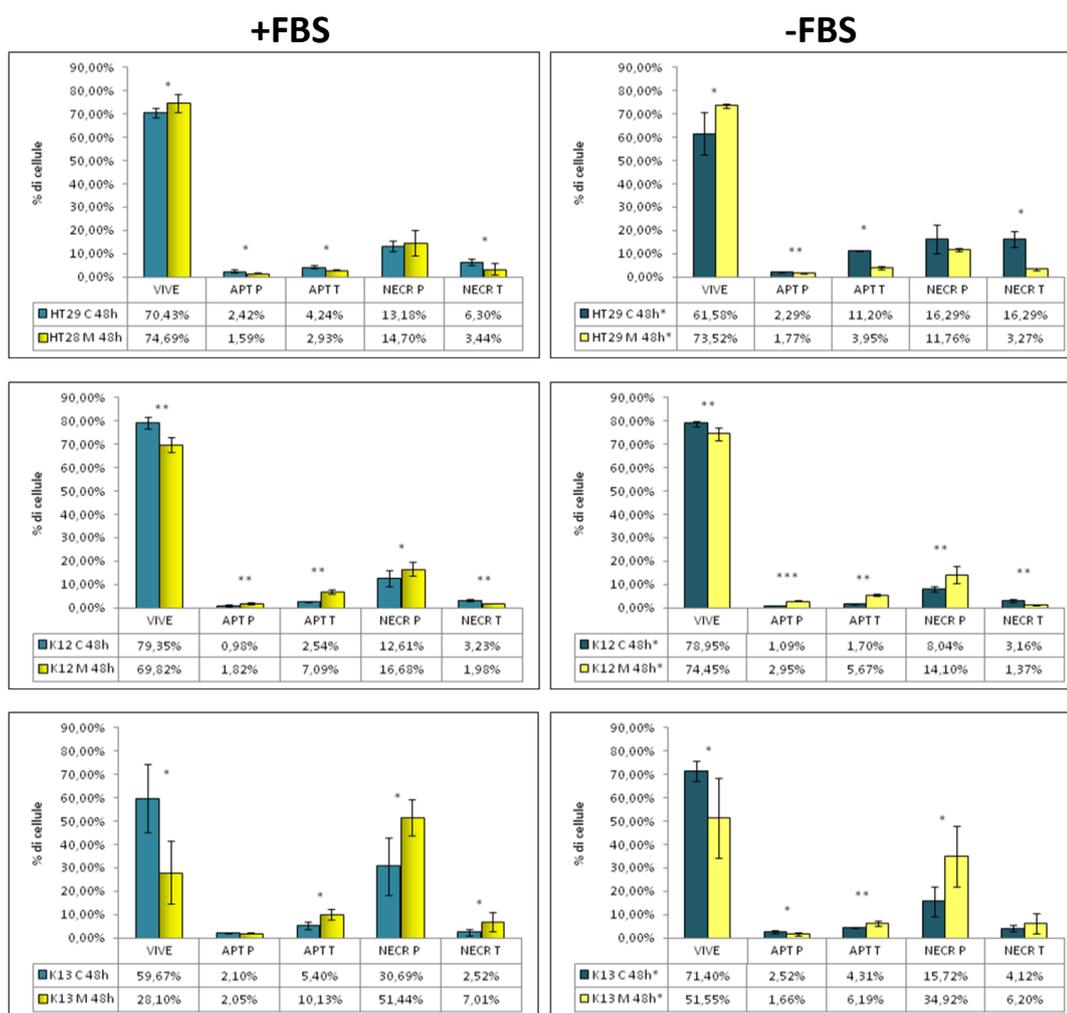
Al fine di caratterizzare il tipo di morte cellulare, apoptosi o necrosi, i campioni HT-29 e K12 e K13 C e M, +FBS e -FBS, sono stati incubati con una soluzione contenente Z-VAD-FMK (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone) (CaspACETM FITC-

VAD FMK, Promega) 10 nM (C.f.) per 30 minuti e, dopo centrifugazione, con Propidio Ioduro per 10 minuti prima dell'analisi al citofluorimetro (v. Materiali e Metodi). Z-VAD-FMK è un substrato fluorescente che si lega al sito catalitico di tutte le caspasi attivate permettendo di misurarne l'attività e di distinguere le cellule in apoptosi precoce, con una minore fluorescenza, e in apoptosi tardiva, con una maggiore fluorescenza. Il Propidio Ioduro penetra solo nelle cellule morte e si intercala nel DNA e permette di distinguere tra le cellule in necrosi precoce, con una minore permeabilità della membrana, e in necrosi tardiva, in cui penetra in maggiore quantità.

In figura 42 sono mostrati i grafici rappresentativi delle analisi condotte. In figura 43 sono mostrati gli istogrammi relativi alla media di tre esperimenti per ciascun campione e a sinistra sono riportati i campioni HT-29, K12 e K13 C e M 48h +FBS, mentre a destra le cellule HT-29, K12 e K13 C e M 48h\* -FBS. Gli istogrammi riportano il valore medio della percentuale di cellule vive (VIVE), in apoptosi precoce (APT P), in apoptosi tardiva (APT T), in necrosi precoce (NECR P) e in necrosi tardiva (NECR T).



**Fig. 42.** Caratterizzazione della morte cellulare mediante citofluorimetria eseguita sulle cellule HT-29, K12 e K13 controllo (C) e trattate con Mifepristone (M) per 48 ore. Le cellule sono state fatte crescere per 48 ore in terreno con siero (+FBS) o per 36 ore in terreno completo e poi per 12 ore in un mezzo senza siero (-FBS). Per le analisi sono state raccolte sia le cellule adese al substrato di crescita che le cellule in sospensione nel terreno. I grafici riportano in ascissa l'intensità della fluorescenza emessa da Propidio Ioduro e in ordinata l'intensità della fluorescenza emessa dal substrato z-VAD-FMK-FITC. I grafici riportati in figura sono stati ottenuti da singoli campioni di cellule analizzati mediante il software BD Accuri™ C6.



**Fig. 43.** Rappresentazione grafica dei valori espressi in percentuale della quantità di cellule vive (VIVE), in apoptosi precoce (APT P), apoptosi tardiva (APT T), necrosi precoce (NECR P) e in necrosi tardiva (NECR T) ottenuti calcolando la media di tre esperimenti indipendenti. In blu sono rappresentati i valori ottenuti per le cellule controllo (C); in giallo i valori ottenuti per le cellule trattate con Mifepristone (M). A sinistra sono mostrati i campioni HT-29, K12 e K13 C e M 48h +FBS, mentre a destra le cellule HT-29, K12 e K13 C e M 48h\* -FBS, incubate per 12 ore senza siero. Le medie, le deviazioni standard e gli istogrammi sono stati ottenuti con il programma Microsoft Office Excel (2007). Il valore di p value è stato calcolato con il programma Graphpad: \*\*\*p < 0,005; \*\*p < 0,05; \*p ≤ 0,5.

Gli istogrammi relativi alle cellule cresciute in presenza di siero (+FBS) mostrano che il trattamento con Mifepristone non ha effetti rilevanti sulla linea parentale. Le cellule HT-29 e il clone K12 C 48h hanno un'alta percentuale di cellule vive, una bassa percentuale di cellule in apoptosi, e circa il 13% di cellule in necrosi precoce. Diversamente, nel clone K13 C 48 ore si osserva una minore frazione di cellule vive e la percentuale di cellule in necrosi precoce è nettamente superiore rispetto alle HT-29 e alle K12 C. Il trattamento con l'ormone diminuisce la percentuale di cellule vive, con un effetto decisamente più rilevante sul clone K13. Inoltre, l'induzione dell'espressione di K-RASG13D ha un notevole effetto nell'incrementare la morte cellulare per necrosi, mentre K-RASG12V stimola soprattutto l'apoptosi. Tuttavia,

l'effetto di K-RASG13D nell'indurre la morte cellulare risulta più forte rispetto all'espressione di K-RASG12V.

In assenza di siero, la percentuale di cellule HT-29 vive si riduce, mentre aumenta quella delle cellule in apoptosi tardiva e in necrosi precoce e tardiva. Sorprendentemente, l'aggiunta di Mifepristone sembra ridurre la mortalità cellulare. La deprivazione di siero non ha effetti rilevanti sulle cellule K12 C (tranne che per una certa riduzione delle cellule in necrosi precoce) e neanche sulle K12 M. Nelle cellule K13 C ed M, invece, si riduce la mortalità cellulare rispetto a quanto osservato nelle corrispondenti popolazioni cellulari tenute in presenza di siero.

Quindi si può concludere che le due isoforme mutate di K-RAS regolano diversamente i meccanismi di morte cellulare: la mutazione nel codone 13 induce prevalentemente necrosi, mentre la mutazione nel codone 12 stimola di più i processi apoptotici.

## **ANALISI DI SPETTROMETRIA DI MASSA IN CELLULE HKE3 TRASFETTATE CON K-RASG13D O K-RAS WILD TYPE**

Presso il laboratorio del Professore Kolch all'*University College* di Dublino ho infine condotto un'analisi delle interazioni di K-RASG13D (13D) e K-RAS *wild type* (WT) con le proteine cellulari (interattoma) in cloni Hke3 generati da cellule HCT116 in cui era stata realizzata la delezione dell'allele endogeno K-RAS mutato (K-RASG13D) (Shirasawa et al., 1993).

Le cellule Hke3 sono state trasfettate in modo transiente con un vettore contenente il gene codificante per K-RASG13D (Hke 13D) o il gene codificante per K-RAS *wild type* (Hke3 WT) in entrambi i casi legati a Flag. Sono stati preparati anche i campioni controllo trasfettati con un vettore esprimente solo il Flag (controllo positivo; Hke3 C<sup>+</sup>) o non trasfettati (controllo negativo; Hke3 C<sup>-</sup>). Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state private del siero per 12 ore, e infine i campioni sono stati lisati e processati come descritto in Materiali e Metodi. Le proteine ottenute sono state immunoprecipitate con l'anticorpo anti-Flag per recuperare solo le proteine che interagiscono fisicamente con K-RAS, mutato o WT, o con Flag. I campioni sono stati digeriti in peptidi con un buffer contenente tripsina e la miscela peptidica è stata purificata in colonne di pochi millimetri di membrana 3 M con carbonio attivo C18. Infine, i peptidi sono stati analizzati allo spettrometro di massa. L'esperimento è stato condotto in triplicato e ciascun campione è stato letto due volte per avere sia il triplicato

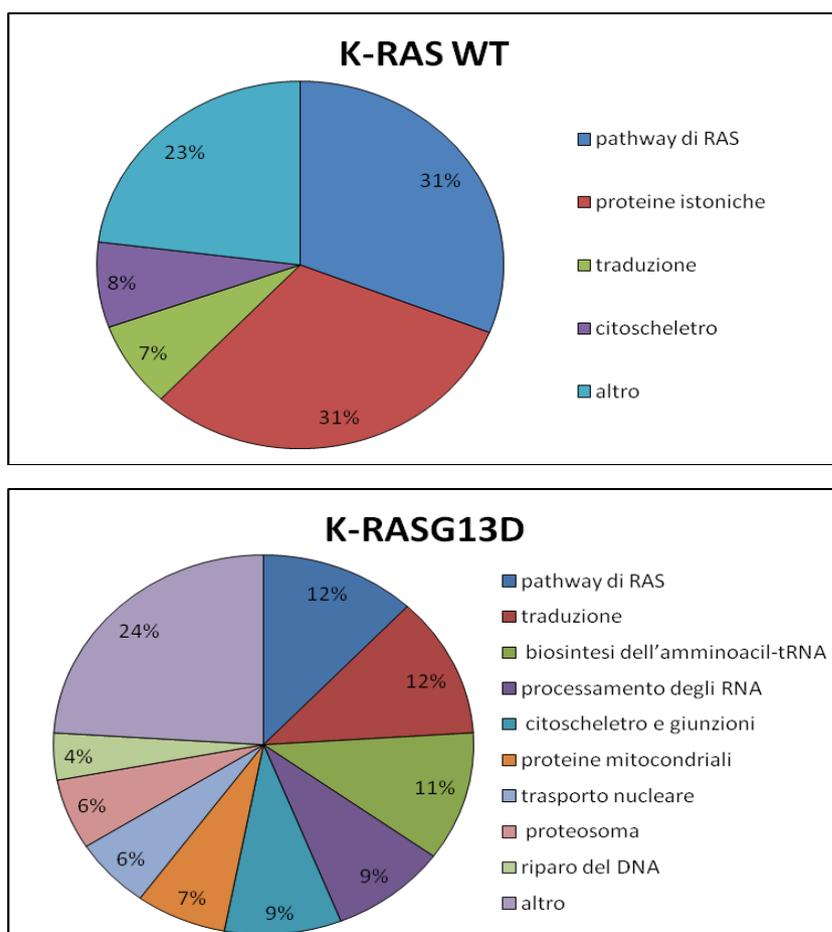
biologico che il duplicato tecnico. Il sequenziamento degli oligopeptidi è stato effettuato con la metodica di massa “tandem” o massa-massa (MS/MS) e l’identificazione delle proteine presenti nella miscela è stata effettuata con il software MaxQuant (versione 1.1.1.32) che interfaccia i dati dello spettrometro con database esterni. Sono state identificate complessivamente 872 proteine e i valori di intensità del segnale ottenuti per ciascuna proteina nei campioni controllo, 13D e WT, sono stati riportati in Excell per l’analisi statistica. I dati sono stati filtrati per un valore di p value < 0,05 (13D vs. C<sup>+</sup>; WT vs. C<sup>+</sup>) e per un valore di RATIO>1,5 (13D/C<sup>+</sup>; WT/C<sup>+</sup>), in modo da identificare e prendere in considerazione solo le proteine che risultano riproducibilmente legate preferenzialmente a K-RAS WT o mutato. In questo modo sono state ottenute 81 proteine per le cellule Hke3 13D e 13 proteine per le cellule Hke3 WT.

In figura 44 sono mostrati gli interattomi ottenuti per K-RAS *wild type* (in alto) e per K-RAS mutato (in basso) e generati con il software STRING 9.05.

Da questa analisi bioinformatica, solo per due delle proteine co-immunoprecipitate con K-RAS WT risulta un’interazione diretta con K-RAS; si tratta delle farnesiltrasferasi (FNTA e B) che sono implicate nelle sue modifiche post-traduzionali all’estremità C-terminale. Il fatto di non aver trovato fra le proteine co-immunoprecipitate nessuna isoforma di RAF, uno dei principali effettori di RAS, conferma che nelle cellule, che erano state tenute in assenza di siero, K-RAS WT è nella forma inattiva.

Dal network ottenuto per le proteine immunoprecipitate con K-RASG13D si osserva come per la maggior parte (84%) di esse il software evidenzia un’interazione nota, diretta o indiretta, con RAS mentre per il restante 16% il software utilizzato non evidenzia alcuna interazione. Il numero molto più elevato di proteine preferenzialmente co-immunoprecipitate con K-RAS mutato potrebbe essere spiegato dal fatto che la mutazione nel codone 13 di K-RAS rende la proteina costitutivamente attiva e dati in letteratura citati nell’Introduzione dimostrano che K-RAS nella sua forma attiva è capace di localizzarsi in diversi distretti cellulari e quindi di interagire con un gran numero di effettori.





**Fig. 45.** I grafici sono stati realizzati con il programma Microsoft Office Excel (2007) e rappresentano la divisione in classi funzionali, espressa in percentuale, delle proteine con una maggiore interazione con K-RAS *wild type* (WT) (in alto) o con K-RASG13D (in basso).

Tra le proteine implicate nel pathway di RAS sono state trovate sia per K-RAS WT che per K-RASG13D le FNTA e B, RGL3 un GEF di RAL, di cui era già stata descritta l'interazione con H-RAS ed M-RAS, e RAP1A (*RAS-related protein RAP-1 A*) noto per interagire direttamente con RAF ma non con RAS. RAF-1 è stato trovato solo nel campione K-RASG13D; B-RAF, immunoprecipitato solo in uno dei tre campioni Hke3 WT e quindi qui non considerato, è presente in tutti i campioni Hke3 13D. Inoltre, all'interno di questa classe funzionale è stata identificata la proteina RADIL (*RAS-associating and dilute domain-containing protein*), implicata nell'adesione, nella migrazione cellulare e nella formazione di metastasi, nei campioni Hke3 13D ma non in cellule trasfettate con K-RAS WT. In letteratura è riportato che la proteina RADIL non è capace di interagire direttamente con RAS anche se è stata messa in relazione con RAP1A, che a sua volta interagisce con RAF.

Solo per 6 delle proteine (FNTA e B, RAF-1, B-RAF, RAP1GDS1 [*RAP1 GTPase-GDP dissociation stimulator 1*], SLC3A2 [*4F2 cell-surface antigen heavy chain*]) co-

immunoprecipitate con K-RASG13D il software evidenzia delle interazioni dirette. Alcune delle altre proteine sono capaci di legarsi ad esse, ma molte di quelle identificate nella presente analisi non risulta siano state messe in relazione stretta con RAS in precedenza. È interessante notare che esse appartengono ad un numero piuttosto ristretto di classi funzionali, ed effettivamente il software STRING 9.05 evidenzia interazioni fra le proteine qui identificate e appartenenti alla stessa classe:

1. pathway di RAS: FNTA e B, RAF-1, BRAF, RADIL, RAP1A, TLN1 (*talin 1*) e RAP1GDS1;
2. traduzione: fattori implicate nell'inizio della traduzione EIF4G1 (*eukaryotic translation initiation factor 4  $\gamma$* ), EIF3M (*eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M*) e EIF5A (*eukaryotic translation initiation factor 5 A-like 1*) o fattori di allungamento della sintesi proteica EEF1A2 (*eukaryotic translation elongation factor 1  $\alpha$* ), EEF1A1 (*eukaryotic translation elongation factor 1  $\alpha$ -like 7*) e EF1G (*eukaryotic translation elongation factor 1  $\gamma$* );
3. biosintesi dell'amminoacil-tRNA: SARS (*seryl-tRNA synthetase*), NARS (*asparaginyl-tRNA synthetase*), RARS (*arginyl-tRNA synthetase*), KARS (*lysyl-tRNA synthetase*), LARS (*leucyl-tRNA synthetase*), QARS (*glutaminyl-tRNA synthetase*), MARS (*methionyl-tRNA synthetase*), IARS (*isoleucyl-tRNA synthetase*) e EPRS (*glutamyl-prolyl-tRNA synthetase*);
4. processamento degli RNA: NUDT21 (*cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5*), U2AF2 (*splicing factor U2AF 65 kDa subunit*), PCBP2 (*poly(rC)-binding protein 2*);
5. citoscheletro e giunzioni: MYH9 (*myosin-9*), MYL6 (*myosin light polypeptide 6*), IQGAP1 (*RAS GTPase-activating-like protein IQGAP1*) e CTNNA1 (*catenin  $\alpha$ -1*);
6. proteine mitocondriali: CYC1 (*cytochrome c1, heme protein*) e SLC25A5 (*ADP/ATP translocase 2*); PHB (*prohibitin*), PHB2 (*prohibitin-2*) e LONP1 (*lon protease homolog*);
7. trasporto nucleare: XPO1 (*exportin 1*), CSE1L (*exportin 2*), KPNB1 (*importin subunità  $\beta$ -1*) e RAN (*GTP-binding nuclear protein RAN*);
8. proteosoma: PSMC1 (*26S protease regulatory subunit 4Short*), PSMD13 (*26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13*), PSMD12 (*26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12*) e PSMD1 (*26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1*);

9. riparo al DNA: PRKDC (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*), XRCC6 (*X-ray repair cross-complementing protein 6*) e HMGB1 (*high mobility group protein B1*);
10. altro: NAP1L1 (*nucleosome assembly protein 1-like 1*), RCC1 (*regulator of chromosome condensation*), RPSA (*40S ribosomal protein SA*), TECR (*very-long-chain enoyl-CoA reductase*), S100A10 (*S100 calcium-binding protein A10*), GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), ILF2 (*interleukin enhancer-binding factor 2*), YWHAG (*14-3-3 protein  $\gamma$* ), BZW1 (*basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1*), ATP1A1 (*sodium/potassium-transporting ATPase subunit  $\alpha$* ), SARNP (*SAP domain-containing ribonucleoprotein*), SRP68 (*signal recognition particle subunit SRP68*), ERLIN1 (*erlin-1*), RRP12 (*RRP12-like protein*), NAA15 (*N- $\alpha$ -acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit*), SLC3A2 (*4F2 cell-surface antigen heavy chain*), KIAA0776 (*E3 UFM1-protein ligase 1*), MYBBP1A (*myb-binding protein 1A*).

L'aver trovato un pattern così complesso e apparentemente non casuale di proteine co-immunoprecipitate con K-RASG13D, a fronte di un pattern molto più semplice nel campione in cui K-RAS è WT e non attivato, spinge ad ipotizzare che K-RAS nella conformazione attiva, interagendo con l'effettore RAF, ed eventualmente traslocando in vari distretti cellulari, induca l'assemblaggio di complessi multiproteici con diverse funzioni, fra cui la regolazione della sintesi e della stabilità delle proteine.

## 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 le alterazioni si verificano frequentemente nel gene *k-ras* e le mutazioni sono sempre 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 RAS, o con la stessa mutazione in isoforme diverse sviluppano un tumore più o meno aggressivo e con una maggiore o minore possibilità di andare incontro allo sviluppo di metastasi e a recidive (Mulla et al., 1999).

Alla luce di queste osservazioni nel nostro laboratorio abbiamo deciso di studiare i meccanismi attraverso cui due diverse mutazioni nella stessa isoforma di RAS (K-RAS) regolano la proliferazione e l'apoptosi in cellule di adenocarcinoma coloretale HT-29. In particolare, gli esperimenti sono stati condotti su due cloni derivati da questa linea cellulare, (K12) e (K13), in cui l'espressione di RAS mutata, K-RASG12V e K-RASG13D, è indotta con l'ormone Mifepristone.

Le prime analisi hanno mostrato che i due cloni indotti ad esprimere K-RAS mutata hanno un diverso comportamento: ridotta proliferazione nel clone K13, con molte cellule in sospensione, e nessuna alterazione apparente nelle cellule K12. Pertanto, all'inizio del mio dottorato ho analizzato il ciclo cellulare dei cloni K12 e K13 indotti (M) e non (C) con l'ormone. Le analisi al citofluorimetro hanno rivelato che le due mutazioni di K-RAS provocano un accumulo di cellule in fase G2/M e una riduzione in G0/G1. Tuttavia, il blocco in fase G2/M è più importante in cellule K13. L'effetto sulla frazione di cellule in fase S è invece diverso, un aumento nelle cellule K12 M e una diminuzione nelle K13 M.

Il blocco del ciclo cellulare è in accordo con l'aumento dei livelli della proteina p21<sup>CIP1/WAF1</sup>, che è un importante regolatore dei *checkpoint* G0/G1 e G2/M. L'incremento di p21 è maggiore a 48 ore rispetto alle 72 di induzione. Infine, risulta che non ci sono significative differenze nei livelli di p21 tra i due cloni indotti, quindi la differente distribuzione di K12 e

K13 nelle diverse fasi del ciclo cellulare non dipende da una diversa quantità della proteina. Esso potrebbe però dipendere da una sua diversa localizzazione intracellulare, e ciò meriterebbe ulteriori indagini.

L'inibizione del pathway delle MAP chinasi, con l'inibitore PD98059 (PD), causa soprattutto nelle cellule K12 C e M un rallentamento della crescita e aumenta la percentuale di cellule adese morte. PD non sembra capace di contrastare l'effetto dell'ormone sulla fase G2/M, anzi in cellule K12 addirittura lo rafforza. Infine, questo inibitore stimola ulteriormente i livelli della proteina p21, con un effetto maggiore a 72 ore sia in cellule K12 M che K13 M. L'inibizione della via PI3K/AKT, con l'inibitore LY294002 (LY), blocca la proliferazione cellulare ed ha un effetto citotossico, soprattutto sul clone K12, indotto e non. Si osserva inoltre una maggiore quantità di proteina p21 in cellule K12 e K13 M+LY rispetto alle stesse cellule trattate solo con l'ormone. L'inibizione del pathway PI3K/AKT ha però un effetto minore nello stimolare ulteriormente i livelli di p21 rispetto all'inibizione delle MAP chinasi. L'aggiunta contemporanea di entrambi gli inibitori mostra che PD e LY operano in sinergia nell'influenzare il ciclo cellulare solo in cellule K12, mentre in cellule K13 prevale l'effetto di LY. Infine, il trattamento PD+LY nelle cellule K12 stimola meno l'aumento dei livelli di p21 che risultano un po' più bassi di quelli osservati in cellule trattate con il solo LY, e significativamente inferiori a quelli delle cellule trattate con il solo PD. Nelle cellule K13 invece la doppia inibizione stimola l'espressione di p21, soprattutto a 72 ore, più che il trattamento con solo LY o solo PD.

Durante gli ultimi tre mesi del mio dottorato ho condotto esperimenti all'*University College* di Dublino (UCD) presso il dipartimento *Systems Biology Ireland* (SBI) nel laboratorio del Professor Walter Kolch.

Inizialmente è stato analizzato il livello di espressione di K-RAS a tempi crescenti (12, 24, 48 e 72 ore) dopo l'aggiunta dell'induttore, verificando che essa aumenta, ma di poco, e in modo simile nei due cloni. Ciò suggerisce che gli effetti osservati in cellule K12 M e K13 M e le differenze fra i due cloni non sembra possano essere attribuiti a una gran differenza dei livelli di proteina fra C ed M o a diverse quantità di K-RAS indotta, ma proprio alla diversa mutazione.

Sulla base di dati riportati in letteratura (Matallanas et al., 2007; Romano et al., 2010), poiché i saggi di proliferazione e di vitalità hanno mostrato un notevole aumento della percentuale di cellule K13 M morte adese rispetto al clone K12, è stata condotta un'analisi sulla regolazione dei pathways pro-apoptotico RASSF1A-MST2-LATS1 e anti-apoptotico RAF-1-MST2 in

cellule HT-29, K12 e K13. Saggi Western Blot hanno mostrato una diminuzione della proteina MST2 e un aumento di LATS1 e RASSF1A in entrambi i cloni, a 48 ore dall'induzione. La mutazione K-RASG13D ha però un effetto maggiore nell'influenzare i livelli di queste proteine rispetto a K-RASG12V. L'induzione dell'espressione di K-RAS mutata diminuisce anche i livelli della chinasi RAF-1, con un maggiore effetto in cellule K12 M rispetto alle K13 M ma solo in cellule tenute in presenza di siero. Questi saggi hanno inoltre evidenziato una certa variabilità e differenza nei livelli di espressione di queste proteine in cellule HT-29, K12 C e K13 C.

Saggi di co-immunoprecipitazione mostrano che in cellule HT-29, e ancora più nel clone K12 sia controllo che trattato c'è una forte interazione tra MST2 e RAF-1. Nel clone K13, invece, si osserva una minore quantità di proteina RAF-1 che immunoprecipita con MST2. Tale interazione è poi drasticamente ridotta per attivazione dell'espressione di K-RASG13D. Poiché il complesso RAF-1-MST2 ha un effetto anti-apoptotico, ciò potrebbe almeno in parte spiegare la maggiore percentuale di mortalità osservata in queste cellule, nelle quali si osserva una maggiore interazione tra MST2 e LATS1, complesso pro-apoptotico, che non nelle cellule HT-29 e K12. Le stesse analisi sono state condotte anche su cellule fatte crescere 36 ore in terreno completo e poi in terreno privo di siero per 12 ore (-FBS), in modo che non venga attivata l'isoforma *wild type* di RAS e si possa valutare l'effetto della sola K-RAS mutata costitutivamente attiva. In questa condizione di crescita nelle cellule K12 e K13 indotte i livelli delle proteine MST2, LATS1 e RAF-1 diminuiscono rispetto alle cellule K12 C e K13 C e la co-immunoprecipitazione non mostra precipitati MST2-RAF1 in cellule K12 e K13 M. I risultati delle immunoprecipitazioni e dei Western indicano che l'attivazione dell'espressione di K-RASG12V e K-RASG13D hanno effetti diversi sia sui livelli delle proteine analizzate che sulle interazioni fra di esse, soprattutto quando le cellule vengono fatte crescere in presenza di siero.

L'osservazione sulla diminuzione dei livelli di proteina RAF-1 nelle cellule indotte ha poi suggerito di condurre un'ulteriore analisi sui possibili effetti che K-RAS mutata potrebbe avere sui livelli di altre isoforme della stessa famiglia. In particolare, è stata analizzata l'espressione della proteina B-RAF. Il risultato ottenuto mostra che l'attivazione dell'espressione di K-RASG12V o K-RASG13D, sia in presenza che in assenza di siero, provoca una diminuzione anche di questa chinasi. Inoltre, si osserva che quando non è stimolata l'attivazione di RAS *wild type* i livelli di B-RAF aumentano notevolmente rispetto a quelli osservati negli stessi campioni fatti crescere in mezzo completo.

Successivamente, sono stati analizzati gli effetti di K-RAS mutata sulla vitalità cellulare tramite saggi citofluorimetrici e il test delle caspasi. I risultati ottenuti mostrano che il trattamento con Mifepristone non ha alcun effetto sulla linea parentale, confermando il dato delle curve di crescita (v. Premessa). Il trattamento con l'ormone in entrambi i cloni raddoppia la quantità di cellule in fase pre-G0/G1. I saggi sono stati condotti anche su cellule private di siero. In queste condizioni, la percentuale di cellule K12 C e K13 C in pre-G0/G1 e G0/G1 è simile a quella delle HT-29, mentre la frazione di cellule in fase S è ridotta e la percentuale di cellule in G2/M è maggiore rispetto alle parentali. Il trattamento con l'ormone non sembrerebbe avere effetto sulla fase S e diminuisce la frazione di cellule K12 e K13 M in fase G0/G1 rispetto alle cellule controllo, come in presenza di siero, ma con un effetto maggiore. Inoltre, K-RASG12V diminuisce la frazione di cellule in fase G2/M, quindi in assenza della stimolazione dell'isoforma *wild type* non si osserva un blocco in questa fase del ciclo cellulare. Infine, si osserva un aumento delle cellule in fase pre-G0/G1 in presenza dell'ormone e l'effetto è uguale nei due cloni. Tuttavia, la quantità di cellule K13 M in fase pre-G0/G1 rimane nettamente inferiore rispetto alle cellule K13 M cresciute in presenza di siero, quindi sembrerebbe che l'espressione di K-RASG13D quando K-RAS *wild type* non è attiva abbia un minore effetto citotossico nelle cellule.

Al fine di caratterizzare il tipo di morte cellulare, apoptosi o necrosi, sugli stessi campioni è stato eseguito il saggio delle caspasi oltre che con il Propidio Ioduro. Le cellule HT-29 e il clone K12 C hanno un'alta percentuale di cellule vive, una bassa percentuale di cellule in apoptosi, e circa il 13% di cellule in necrosi precoce. Diversamente, nel clone K13 C si osserva una minore frazione di cellule vive e la percentuale di cellule in necrosi precoce è nettamente superiore rispetto alle HT-29 e alle K12 C. Il trattamento con l'ormone diminuisce la percentuale di cellule vive, con un effetto decisamente più rilevante sul clone K13. Inoltre, le due isoforme mutate di K-RAS sembrano regolare diversamente i meccanismi di morte cellulare: la mutazione nel codone 13 induce prevalentemente necrosi, mentre la mutazione nel codone 12 stimola di più i processi apoptotici. In assenza di siero, la percentuale di cellule HT-29 vive si riduce, mentre aumenta quella delle cellule in apoptosi tardiva e in necrosi precoce e tardiva. La deprivazione di siero non ha effetti rilevanti sulle cellule K12 C e M. Nelle cellule K13 C ed M, invece, si riduce la mortalità cellulare rispetto a quanto osservato nelle corrispondenti popolazioni cellulari tenute in presenza di siero, confermando la minore tossicità dell'espressione di K-RASG13D in assenza dell'isoforma *wild type*.

Presso il laboratorio del Professore Kolch all'*University College* di Dublino (UCD) ho infine analizzato l'interattoma di K-RASG13D e di K-RAS *wild type* in cellule Hke fatte crescere in terreno senza siero per 12 ore. Le analisi bioinformatiche dei dati di spettrometria di massa hanno identificato 13 proteine che immunoprecipitano preferenzialmente, rispetto ai controlli, con K-RAS wt e 81 con K-RASG13D. Per molte di esse, non risulta che siano state messe in relazione stretta con RAS in precedenza. È interessante notare che queste proteine appartengono ad un numero piuttosto ristretto di classi funzionali, e che effettivamente all'interno di ciascuna classe le proteine identificate interagiscono fra loro. L'aver trovato un pattern complesso e apparentemente non casuale di proteine co-immunoprecipitate preferenzialmente con K-RASG13D, a fronte di un pattern molto più semplice nel campione in cui K-RAS è WT e non attivato, spinge ad ipotizzare che K-RAS nella conformazione attiva, interagendo con l'effettore RAF, ed eventualmente traslocando in vari distretti cellulari, induca l'assemblaggio di complessi multiproteici con diverse funzioni, fra cui la regolazione della sintesi e della stabilità delle proteine.

Concludendo, il mio studio sugli effetti provocati da due diverse mutazioni in K-RAS, K-RASG12V e K-RASG13D, potrebbe permettere di effettuare delle prognosi più accurate, in base alla determinazione dell'esatta mutazione di K-RAS, e suggerisce ulteriori indagini per valutare se mutazioni diverse di K-RAS conferiscono maggiore o minore suscettibilità ai farmaci anti-tumorali correntemente utilizzati nelle terapie oncologiche.

## APPENDICE

ESPERIMENTO 1 48h									ESPERIMENTO 1 72h								
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	
G0/G1	50,3	53,8	59,9	54,6±4,8	45,1±0,8	45	46	44,3	55,9	52,5	53,3	53,9±1,7	44,3±2,2	46,9	42,5	43,7	
S	29,1	29,1	30,8	29,6±0,9	23,4±2,1	25,6	23,5	21,3	25,5	25,2	23,6	24,7±1	22,8±1,8	22,5	21,2	24,8	
G2/M	16,4	13,9	14,4	14,9±1,3	25±1,3	24,1	24,3	26,6	17,1	19,6	21,1	19,2±2	28,8±0,9	28,2	28,4	30	
ESPERIMENTO 2 48h									ESPERIMENTO 2 72h								
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	
G0/G1	54,3	56,9	53,8	55±1,6	51,4±1,5	50,8	50,3	53,2	54,9	56,3	57,5	56,2±1,3	49,4±0,6	49,5	50,1	48,8	
S	30,3	26,9	29,1	28,7±1,7	21,5±0,9	21,3	20,7	22,6	29,8	29,6	26,5	28,6±1,8	24,5±1,6	26,3	23	24,3	
G2/M	11,8	12,7	12,6	12,3±0,4	24,4±1,6	25,3	22,5	22,5	14,1	13	13,9	13,6±0,5	23,6±1	22,4	24,1	24,3	
ESPERIMENTO 3 48h									ESPERIMENTO 3 72h								
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	
G0/G1	56,5	55,5	55,1	55,7±0,7	49,2±1,8	47,5	49	51,2	49,8	52	51	50,9±1,1	47±1,5	45,8	46,5	48,7	
S	26,9	29,2	28	28±1,1	24,5±0,8	24,5	23,7	25,3	32,4	30	31,8	31,4±1,2	27,2±1,6	27,6	28,6	25,4	
G2/M	13,9	13,3	14,2	13,8±0,4	23,7±1,7	25,4	23,9	22	14,9	13,8	15,2	14,6±0,7	22,6±0,7	22,5	22	23,4	
ESPERIMENTO 4 48h									ESPERIMENTO 4 72h								
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	
G0/G1	48,1	51,2	49,8	49,7±1,5	45,1±1,5	46,9	43,9	44,6	53,1	55,7	54,2	54,3±1,3	52±2,9	49,2	51,9	55,1	
S	25,8	25,3	23,7	24,9±1	22,3±0,5	21,8	22,3	22,9	26,8	26,7	27,1	26,8±0,2	24,5±0,7	25,4	24,2	24,1	
G2/M	23,4	21,2	24,4	23±1,6	28,4±0,9	28,5	29,3	27,4	12,3	10,6	10,4	11,1±1	20,1±1,9	22	20,2	18,1	
ESPERIMENTO 5 48h									ESPERIMENTO 5 72h								
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	
G0/G1	53,9	54,7	56,1	54,9±1,1	47,7±3	49,1	49,5	44,3	55,9	54,2	64,1	58±5,2	52,9±1	54,1	52,3	52,4	
S	26,6	26,7	23,5	25,6±1,8	24,7±2,2	25,6	26,4	22,1	16,9	21	20,6	19,5±2,2	12,3±0,8	13,2	12,2	11	
G2/M	15	13,6	16	14,8±1,2	23,9±3,1	22,9	21,5	27,5	26,1	21,8	14	20,6±6,1	32,1±1,8	30	33,4	33	
ESPERIMENTO 6 48h									ESPERIMENTO 6 72h								
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	
G0/G1	66,1	65,9	65,9	65,9±0,1	49,3±0,7	50	48,5	49,6	69,3	71,1	70,5	70,3±0,9	53,5±0,8	53,3	52,8	54,5	
S	21,6	22,1	22,7	22,1±0,5	26,1±0,5	26	26,8	25,7	20,7	18,8	19,3	19,6±0,9	29,5±0,9	30,3	29,9	28,5	
G2/M	11,3	10,9	10	10,7±0,6	22,2±0,6	21,7	22,2	22,9	7,7	7,9	7,6	7,7±0,1	14±0,6	13,3	14,5	14,3	
ESPERIMENTO 7 48h									ESPERIMENTO 7 72h								
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	
G0/G1	55,5	56,1	53	54,9±1,6	48,8±0,5	45	46	44,3	57,4	57,7	58,5	57,8±0,5	49,3±0,9	48,8	48,7	50,4	
S	29,2	30	32,4	30,5±1,6	22,3±0,5	25,6	23,5	21,3	27,1	27,9	27,3	27,4±0,4	25,2±0,5	25,9	24,9	25	
G2/M	11,8	10,4	10,4	10,8±0,8	24,6±0,3	24,1	24,3	26,6	10,5	11,2	11,3	11±0,4	21,2±0,4	21,7	21,2	20,8	

**Tab. A.** La tabella riporta i risultati di tutti i saggi di citofluorimetria condotti sul clone K13 dopo 48 e 72 ore di induzione. In particolare sono riportati i valori della percentuale di cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare, le medie e le deviazioni standard (M±DV). Le medie e le deviazioni standard sono state ottenute analizzando i valori ottenuti al citofluorimetro con il programma Microsoft Office Excel (2007).

ESPERIMENTO 1 48h									ESPERIMENTO 1 72h							
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3
G0/G1	72,4	78,6	74,3	75,1±3,1	70,2±0,6	69,8	69,9	71	56,6	60,4	60,3	59,1±2,1	54,6±1	53,6	54,8	55,6
S	15,5	13,7	11,3	13,5±2,1	14,2±0,7	14,4	14,9	13,5	17,4	17,5	17,6	17,5±0,1	17,9±0,7	17,3	17,6	18,8
G2/M	9,3	5,8	10,8	8,6±2,5	12,9±0,3	13,1	12,5	13,1	23	19,5	19,2	20,5±2,1	25±1,9	26,5	25,8	22,8
ESPERIMENTO 2 48h									ESPERIMENTO 2 72h							
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3
G0/G1	59,1	63,4	63,3	61,9±2,4	55,6±1,7	56,6	53,6	56,8	69,4	69	68,3	68,9±0,5	58,4±1,3	56,9	59	59,3
S	19,6	16,7	17,1	17,8±1,5	18,7±1,2	19,4	19,5	17,3	13,8	12,9	13,4	13,3±0,4	12,8±0,1	12,8	13	12,8
G2/M	18,2	18	17,8	18±0,2	20,6±4,4	21,9	24,4	15,7	15,5	15,5	15,7	15,5±0,1	26,4±1,6	28,3	25,3	25,8
ESPERIMENTO 3 48h									ESPERIMENTO 3 72h							
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3
G0/G1	56,2	55,2	57,8	56,4±1,3	49,6±1	50,5	48,4	50	53,3	53,1	53,5	53,3±0,2	42,3±2,7	40	41,7	45,4
S	15,1	16,6	15,5	15,7±0,7	19,7±0,9	19,1	19,3	20,8	25,2	26,5	23,2	24,9±1,6	30±1,6	30	31,6	28,4
G2/M	27,3	26,3	24,6	26±1,3	29,3±1	29,3	30,4	28,4	20,2	18,3	21,8	20,1±1,7	24,6±2,1	26,9	24,4	22,7
ESPERIMENTO 4 48h									ESPERIMENTO 4 72h							
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3
G0/G1	53,9	58,8	57,5	56,7±2,5	46,6±1	46,7	45,6	47,7	54,3	54,6	53,1	54±0,7	43,8±1	43,1	43,5	45
S	24,1	23,5	22,3	23,3±0,9	27±1,5	26	28,8	26,3	26,8	29,5	30,7	29±1,9	28,5±2,9	26,1	31,8	27,6
G2/M	16,6	14,4	17,6	16,2±1,6	23,4±1,1	24,4	22,2	23,6	16,6	13,5	13,3	14±1,8	23,9±2,4	26,7	21,9	23,2
ESPERIMENTO 5 48h									ESPERIMENTO 5 72h							
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3
G0/G1	55,5	54,1	53,6	54,4±0,9	47,2±1,7	46,7	45,8	49,2	51,1	60,2	54,5	55,2±4,5	45,6±0,9	44,6	46,4	46
S	21,7	22,4	23,7	22,6±1	27,3±0,9	28,4	27	26,5	28	27,3	27,6	27,6±0,3	28,3±1	29,6	27,6	27,9
G2/M	20,7	21,3	19,3	20,4±1	22,9±1,3	22,3	24,5	22	13,5	10,2	15,4	13±2,6	23,1±0,5	23	22,7	23,8
ESPERIMENTO 6 48h									ESPERIMENTO 6 72h							
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3
G0/G1	61,8	65,7	60,8	62,7±2,5	42,7±2,1	40,7	42,5	45	60,9	63,7	62,5	62,3±1,4	55,4±0,5	55,9	55,6	54,9
S	17,4	16,1	22,1	18,5±3,1	23,7±1,8	25,5	23,7	21,9	19,1	18	15,1	17,4±2	21,1±0,2	21,2	21,3	20,9
G2/M	19,2	17,2	15,9	17,4±0,4	31,7±0,2	32,7	31,6	30,9	18,3	17,6	21,4	19,1±0,4	21,5±0,2	21,1	21,6	21,8

**Tab. B.** La tabella riporta i risultati di tutti i saggi di citofluorimetria condotti sul clone K12 dopo 48 e 72 ore di induzione. In particolare sono riportati i valori della percentuale di cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare, le medie e le deviazioni standard (M±DV). Le medie e le deviazioni standard sono state ottenute analizzando i valori ottenuti al citofluorimetro con il programma Microsoft Office Excel (2007).

ESPERIMENTO 1 48h																	
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3									
G0/G1	54,8	54,7	54,4	54,6±0,2	49,3±0,1	49,2	49,5	49,4									
S	28,1	29,9	29,2	29±0,9	25,8±1	24,7	26,8	26									
G2/M	13,4	13	12,7	13±0,3	20,9±1,4	22,1	19,3	21,5									
ESPERIMENTO 2 48h																	
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3									
G0/G1	69,9	68,7	72,1		60±0,2	59,8	60,2	60,2									
S	19,4	19,2	16,6	18,4±1,5	15,2±1,1	15,2	16,4	14,2									
G2/M	7,6	8,8	7,4	7,9±0,7	20,7±1	21,3	19,5	21,3									
ESPERIMENTO 3 48h con PD pozzetto									ESPERIMENTO 3 48h con PD fiasca								
	C1+ PD	C2+ PD	C3+ PD	M±DV	M±DV	M1+ PD	M2+ PD	M3+ PD	C1+ PD	C2+ PD	C3+ PD	M±DV	M±DV	M1+ PD	M2+ PD	M3+ PD	
G0/G1	58,4	61,2	61,1	60,2±1,5	53,8±0,1	53,8	53,7	54	68	69	69,3	68,7±0,6	64,8±0,2	65,1	64,7	64,8	
S	18,2	16,6	18,5	17,7±1	21±0,8	20,1	21,7	21,4	18,1	17,8	16,5	17,4±0,8	17,1±0,6	16,9	17,9	16,7	
G2/M	20,5	19,6	18,6	19,5±0,9	21,8±0,9	22,7	21,9	20,9	11,1	10,9	11,6	11,2±0,3	14,6±0,4	14,7	14,2	15,1	
ESPERIMENTO 3 48h con LY pozzetto									ESPERIMENTO 3 48h con LY fiasca								
	C1+ LY	C2+ LY	C3+ LY	M±DV	M±DV	M1+ LY	M2+ LY	M3+ LY	C1+ LY	C2+ LY	C3+ LY	M±DV	M±DV	M1+ LY	M2+ LY	M3+ LY	
G0/G1	60,7	61,8	62	61,5±0,7	57,8±0,2	57,7	57,7	58,1	71,1	69,8	68,5	69,8±1,3	65,8±0,6	65,2	66,5	65,7	
S	21,3	21,8	19	20,7±1,4	20,9±0,4	21,1	21,3	20,5	17,1	16,9	19,2	17,7±1,2	14,7±0,8	14,3	14,2	15,7	
G2/M	14	14,1	15,5	14,5±0,8	17,5±0,2	17,9	17,2	17,4	9,4	10,6	9,9	9,9±0,6	16,2±0,6	16,8	16,3	15,6	
ESPERIMENTO 3 48h									ESPERIMENTO 3 72h								
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	
G0/G1	62,8	61,3	63,2	62,4±1	54,2±0,4	54,2	53,9	54,7	68,9	67	66,3	67,4±1,3	61±1,1	60,9	62,2	59,9	
S	25	26,7	24,1	25,2±1,3	26,7±0,3	26,8	27	26,3	15,2	15,8	17,1	16±0,9	18,1±0,6	18,9	17,7	17,8	
G2/M	10,2	9,6	10	9,9±0,3	15,9±0	15,9	15,9	15,9	11,7	11,9	11,9	11,8±0,1	17±0,6	16,6	16,8	17,8	
ESPERIMENTO 3 48h con PD									ESPERIMENTO 3 72h con PD								
	C1+ PD	C2+ PD	C3+ PD	M±DV	M±DV	M1+ PD	M2+ PD	M3+ PD	C1+ PD	C2+ PD	C3+ PD	M±DV	M±DV	M1+ PD	M2+ PD	M3+ PD	
G0/G1	67	69,2	68,5	68,2±1,1	62,8±0,3	62,7	62,6	63,3	70,2	69,9	68,3	69,4±1	58,5±3,1	57,3	62,1	56,2	
S	19,4	17,9	18,9	18,7±0,7	20,1±0,2	20	20,4	20,1	13,3	13	12,6	12,9±0,3	14,4±2,6	15,1	11,5	16,6	
G2/M	9,7	9,4	10	9,7±0,3	14,3±0,1	14,2	14,4	14,3	13,2	13,2	13,8	13,4±0,3	21,1±0,7	20,8	20,6	21,9	
ESPERIMENTO 3 48h con LY									ESPERIMENTO 3 72h con LY								
	C1+ LY	C2+ LY	C3+ LY	M±DV	M±DV	M1+ LY	M2+ LY	M3+ LY	C1+ LY	C2+ LY	C3+ LY	M±DV	M±DV	M1+ LY	M2+ LY	M3+ LY	
G0/G1	61,5	61,4	60,7	61,2±0,4	58,5±0,1	58,7	58,5	58,4	71	70,7	72,8	71,5±1,1	74,2±0,5	73,7	74,2	74,7	
S	13,9	14,1	13,1	13,7±0,5	21,9±0,7	21,8	22,8	21,3	9,7	8,2	8,2	8,7±0,8	9,9±0,2	10	10,1	9,6	
G2/M	22,2	22,2	23,4	22,6±0,6	16,7±0,3	16,4	16,7	17	15,9	16,1	15,2	15,7±0,4	13,3±0,2	13,4	13,5	13,1	

ESPERIMENTO 4 48h									ESPERIMENTO 4 72h								
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	
G0/G1	61,4	61,7	60,5	61,2±0,6	52,7±0,7	52,4	53,6	52,2	65,2	65,1	65,5	65,2±0,2	53,8±1,5	55,1	54,3	52,1	
S	22,3	22,7	22,7	22,5±0,2	21,5±0,5	21	21,5	22,1	16,9	16,9	16,9	16,9±0	13,6±0,7	13	13,4	14,5	
G2/M	13,3	12,9	13,4	13,2±0,2	22,6±0,1	22,7	22,6	22,5	13,2	14,9	14,1	14±0,8	30,4±1	29,4	30,3	31,5	
ESPERIMENTO 4 48h con PD									ESPERIMENTO 4 72h con PD								
	C1+ PD	C2+ PD	C3+ PD	M±DV	M±DV	M1+ PD	M2+ PD	M3+ PD	C1+ PD	C2+ PD	C3+ PD	M±DV	M±DV	M1+ PD	M2+ PD	M3+ PD	
G0/G1	62,2	61,2	62,1	61,8±0,5	48,6±0,6	48,3	49,3	48,2	63,9	64,7	65	64,5±0,5	53,8±0,5	53,3	53,8	54,3	
S	20,3	20,6	20,5	20,4±0,1	23,3±0,9	23,7	22,2	24	15,4	16,2	15,6	15,7±0,4	14,4±0,1	14,3	14,4	14,6	
G2/M	15,3	15,7	15,5	15,5±0,2	24,4±0,3	24,3	24,8	24,1	17,1	16	16,5	16,5±0,5	28,7±0,6	28,1	28,8	29,3	
ESPERIMENTO 4 48h con LY									ESPERIMENTO 4 72h con LY								
	C1+ LY	C2+ LY	C3+ LY	M±DV	M±DV	M1+ LY	M2+ LY	M3+ LY	C1+ LY	C2+ LY	C3+ LY	M±DV	M±DV	M1+ LY	M2+ LY	M3+ LY	
G0/G1	60,4	61,5	61,1	61±0,5	56,9±0,1	57	56,8	57	55,9	56,1	56,4	56,1±0,2	51±0,7	51,8	51,1	50,3	
S	16,1	16,1	17,1	16,4±0,5	18,2±0,3	17,9	18,3	18,6	12,9	11,7	12,2	12,2±0,6	12,5±0,4	12,7	12,9	12,1	
G2/M	20,5	19,9	20,3	20,2±0,3	22±0,3	22,2	21,6	22,2	27,8	28	28,2	28±0,2	33±1,7	31,2	33,3	34,6	
ESPERIMENTO 4 48h con LY e PD									ESPERIMENTO 4 72h con LY e PD								
	C1+ LY+ PD	C2+ LY+ PD	C3+ LY+ PD	M±DV	M±DV	M1+ LY+ PD	M2+ LY+ PD	M3+ LY+ PD	C1+ LY+ PD	C2+ LY+ PD	C3+ LY+ PD	M±DV	M±DV	M1+ LY+ PD	M2+ LY+ PD	M3+ LY+ PD	
G0/G1	65,5	64,7	64,3	64,8±0,6	51,6±0,7	52,3	51,9	50,8	60,5	61,3	61,2	61±0,4	51,9±0,4	51,9	52,2	51,4	
S	12,7	12,7	13,4	12,9±0,4	18±0,4	18,5	17,9	17,7	8,8	9	8,7	8,8±0,1	13,1±0,6	13,4	12,4	13,6	
G2/M	19,4	20,5	19,9	19,9±0,5	27,5±0,5	27	27,5	28,1	28,7	28	27,7	28,1±0,5	32,9±0,8	32,2	32,7	33,8	

**Tab. C.** La tabella riporta i risultati di tutti i saggi di citofluorimetria condotti sul clone K12 dopo 48 e 72 ore di induzione con Mifepristone e/o con gli inibitori (PD e/o LY). In particolare sono riportati i valori della percentuale di cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare, le medie e le deviazioni standard (M±DV). Le medie e le deviazioni standard sono state ottenute analizzando i valori ottenuti al citofluorimetro con il programma Microsoft Office Excel (2007).

ESPERIMENTO 1 48h									ESPERIMENTO 1 72h							
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3
G0/G1	60,6	61,2	61,8	61,2±0,6	50±0,4	49,6	50,4	50,2	69	69,1	68,1	68,7±0,5	52,4±1,6	52,3	50,9	54,2
S	30,1	28,8	27	28,6±1,5	27,9±1,2	27,7	29,3	26,9	20,1	19,8	21,1	20,3±0,6	25,4±0,8	26,3	25,3	24,6
G2/M	7,1	7,6	7,7	7,4±0,3	18,7±1,7	20,3	16,9	19	9	9,1	8,5	8,8±0,3	19,1±1,4	17,5	20,2	19,7
ESPERIMENTO 1 48h con PD									ESPERIMENTO 1 72h con PD							
	C1+ PD	C2+ PD	C3+ PD	M±DV	M±DV	M1+ PD	M2+ PD	M3+ PD	C1+ PD	C2+ PD	C3+ PD	M±DV	M±DV	M1+ PD	M2+ PD	M3+ PD
G0/G1	66,3	67,6	66,9	66,9±0,6	49,2±1	48,2	49,2	50,3	61,8	61,4	61,9	61,7±0,2	53,6±0,7	52,8	54,1	54,1
S	19,5	20,6	19,4	19,8±0,6	29,6±0,05	29,6	29,7	29,6	26,3	26,3	25,6	26,0±0,4	27,5±0,7	27,8	28,2	26,7
G2/M	12,4	10,5	11,2	11,3±0,9	18,2±0,5	18,2	18,8	17,8	10,3	11,5	11,3	11,0±0,6	16,2±1	16,2	15,2	17,2
ESPERIMENTO 1 48h con LY									ESPERIMENTO 1 72h con LY							
	C1+ LY	C2+ LY	C3+ LY	M±DV	M±DV	M1+ LY	M2+ LY	M3+ LY	C1+ LY	C2+ LY	C3+ LY	M±DV	M±DV	M1+ LY	M2+ LY	M3+ LY
G0/G1	77,4	78,4	77,5	77,7±0,5	59,7±0,8	59,3	60,8	59,2	71,2	68,7	69	69,6±1,3	55,5±0,7	55,7	56,2	54,8
S	9,8	9,5	10,2	9,8±0,3	16,6±1	17,5	15,5	17	11,7	12,8	12,1	12,2±0,5	14,7±0,9	14,3	14,1	15,9
G2/M	9	8,1	8,5	8,5±0,4	21,7±0,6	21,1	21,8	22,4	14,3	15,8	16,8	15,6±1,2	27,4±0,9	28,3	27,5	26,4
ESPERIMENTO 1 48h con LY e PD									ESPERIMENTO 1 72h con LY e PD							
	C1+ LY+ PD	C2+ LY+ PD	C3+ LY+ PD	M±DV	M±DV	M1+ LY+ PD	M2+ LY+ PD	M3+ LY+ PD	C1+ LY+ PD	C2+ LY+ PD	C3+ LY+ PD	M±DV	M±DV	M1+ LY+ PD	M2+ LY+ PD	M3+ LY+ PD
G0/G1	84	83,3	84,1	83,8±0,4	58,6±0,2	58,9	58,5	58,4	71,1	68,9	67,4	69,1±1,8	54,2±0,2	54,1	54,2	54,5
S	6,9	7,2	6,9	7±0,1	20,3±0,1	20,5	20,3	20,3	10,4	10,2	11,4	10,6±0,6	17,6±0,7	17,3	18,4	17,1
G2/M	7,3	7,3	7	7,2±0,1	18,3±0,2	18,2	18,3	18,6	15	18	18,1	17±1,7	25,9±0,6	26,5	26	25,2
ESPERIMENTO 2 48h									ESPERIMENTO 2 72h							
	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M±DV	M±DV	M1	M2	M3
G0/G1	62,3	62	62,4	62,2±0,2	63,9±1,6	65	62	64,7	77,4	77,1	76,9	77,1±0,2	64±0,8	64,8	63,1	64,1
S	18,3	18,5	20,5	19,1±1,2	12,1±1	13	12,3	11	12	11,5	11,6	11,7±0,2	15±0,4	15,2	15,4	14,5
G2/M	15,7	16	16	15,9±0,1	20,7±1,1	19,6	21,8	20,8	9,4	9,9	9,9	9,7±0,2	18,8±0,7	18	18,9	19,5
ESPERIMENTO 2 48h con PD									ESPERIMENTO 2 72h con PD							
	C1+ PD	C2+ PD	C3+ PD	M±DV	M±DV	M1+ PD	M2+ PD	M3+ PD	C1+ PD	C2+ PD	C3+ PD	M±DV	M±DV	M1+ PD	M2+ PD	M3+ PD
G0/G1	74,6	73,9	74,4	74,3±0,3	67,1±0,5	67,6	66,6	67,2	78,7	78,8	79,8	79,1±0,6	65±0,4	64,7	65,5	64,9
S	11,9	12,3	12,9	12,3±0,5	12,6±0,4	12,9	12,9	12,2	8,6	8,6	8,4	8,5±0,1	14,2±0,3	14,6	14	14,2
G2/M	12,1	12,9	12,7	12,5±0,4	17,3±0,1	17,5	17,3	17,2	9,4	9,1	9,3	9,2±0,1	17,6±0,3	17,7	18	17,3

ESPERIMENTO 2 48h con LY									ESPERIMENTO 2 72h con LY								
	C1+ LY	C2+ LY	C3+ LY	M±DV	M±DV	M1+ LY	M2+ LY	M3+ LY	C1+ LY	C2+ LY	C3+ LY	M±DV	M±DV	M1+ LY	M2+ LY	M3+ LY	
G0/G1	79,8	81,3	80,5	80,5±0,7	69,1±0,2	68,9	69,3	69,1	78,2	78,2	79,3	78,5±0,6	62,1±0,6	62,5	61,3	62,5	
S	4,6	4,6	5,8	5±0,6	8,8±0,5	8,9	9,3	8,3	6,9	7	6,2	6,7±0,4	12,3±0,4	11,9	12,7	12,3	
G2/M	14,6	12,4	13,3	13,4±1,1	20±0,4	20,2	19,5	20,4	12,4	12,2	12	12,2±0,2	22,9±0,4	22,6	23,5	22,8	
ESPERIMENTO 2 48h con LY e PD									ESPERIMENTO 2 72h con LY e PD								
	C1+ LY+ PD	C2+ LY+ PD	C3+ LY+ PD	M±DV	M±DV	M1+ LY+ PD	M2+ LY+ PD	M3+ LY+ PD	C1+ LY+ PD	C2+ LY+ PD	C3+ LY+ PD	M±DV	M±DV	M1+ LY+ PD	M2+ LY+ PD	M3+ LY+ PD	
G0/G1	83,6	82,8	82,7	83±0,4	74,7±0,5	75,1	75	74,1	77,6	78,7	77,7	78±0,6	62,4±1	62,1	63,6	61,7	
S	4,9	4,5	5,4	4,9±0,4	4,6±0,3	4,2	4,9	4,8	6,2	6	7,6	6,6±0,8	14±0,8	14,5	13,1	14,6	
G2/M	10,1	11,5	10,3	10,6±0,7	19±1,4	18,4	18	20,7	12,7	11,5	12,1	12,1±0,6	21,1±0,7	20,6	20,7	22	

**Tab. D.** La tabella riporta i risultati di tutti i saggi di citofluorimetria condotti sul clone K13 dopo 48 e 72 ore di induzione con Mifepristone e/o con gli inibitori (PD e/o LY). In particolare sono riportati i valori della percentuale di cellule presenti nelle diverse fasi del ciclo cellulare, le medie e le deviazioni standard (M±DV).

## BIBLIOGRAFIA

**Abukhdeir A.M., Park B.H.** *P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance.* Expert Rev Mol Med., 1:10-e19 (2008).

**Alessi D.R., Cuenda A., Cohen P., Dudley D.T., Saltiel AR.** *PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo.* J Biol Chem., 270:27489-94 (1995).

**Al-Sohaily S., Biankin A., Leong R., Kohonen-Corish M., Warusavitarne J.** *Molecular pathways in colorectal cancer.* J Gastroenterol Hepatol. 27(9):1423-31 (2012).

**Armaghany T., Wilson JD., Chu Q., Mills G.** *Genetic alterations in colorectal cancer.* Gastrointest Cancer Res., 1:19-27 (2012).

**Banno K., Kisu I., Yanokura M., Tsuji K., Masuda K., Ueki A., Kobayashi Y., Yamagami W., Nomura H., Tominaga E., Susumu N., Aoki D.** *Epimutation and cancer: a new carcinogenic mechanism of Lynch syndrome.* Int J Oncol., 41:793-7 (2012).

**Bazan V., Migliavacca M., Zanna I., Tubiolo C., Grassi N., Latteri A., La Farina M., Albanese I., Dardanoni G., Tomasino R. M., Labianca R., Gebbia N. & Russo A.** *Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype.* Annals of Oncology., 13:1438-1446 (2002).

**Bauer J., Sporn J. C., Cabral J., Gomez J., Jung B.** *Effects of Activin and TGF $\beta$  on p21 in Colon Cancer.* PLoS One, 7:6 e39381 (2012).

**Baum B., Settleman J., Quinlan M.P.** *Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease.* Seminars in Cell & Developmental Biology, 19:294-308 (2008).

**Bellucci L., Dalvai M., Kocanova S., Moutahir F., Bystricky K.** *Activation of p21 by HDAC inhibitors require acetylation of H2A.Z.* PLoS One., 8:e54102 (2013).

**Berg M., Soreide K.** *Genetic and epigenetic traits as biomarkers in colorectal cancer.* Int J Mol Sci., 12:9426-39 (2011).

**Bos JL.** *Ras oncogenes in human cancer.* Cancer Research, 49:4682-4689 (1989).

**Bouali S., Chrétien AS., Ramacci C., Rouyer M., Becuwe P., Merlin J.L.** *PTEN expression controls cellular response to cetuximab by mediating PI3K/AKT and RAS/R AF/MAPK downstream signaling in KRAS wild-type, hormone refractory prostate cancer cells.* Oncol Rep., 21:731-5 (2009).

**Brenner C., Deplus R., Didelot C., Lorient A., Viré E., De Smet C., Gutierrez A., Danovi D., Bernard D., Boon T., Pelicci PG., Amati B., Kouzarides T., de Launoit Y., Di Croce L., Fuks F.** *Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor.* *EMB O J.*, 24:336-46 (2004).

**Castellano E., Santos E.** *Functional Specificity of Ras Isoforms: So Similar but So Different.* *Genes & Cancer*, 2:216-231 (2011).

**Cardoso J., Boer J., Morreau H., Fodde R.** *Expression and genomic profiling of colorectal cancer.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 1775:103-137 (2007).

**Cheng M., Olivier P., Diehl J.A., Fero M., Roussel M.F., Roberts J.M., Sherr C.J.** *The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts.* *EMBO J.*, 18:1571-83 (1999).

**Choy E., Chiu V.K., Silletti J., Feoktistov M., Morimoto T., Michaelson D., Ivanov I.E., Philips M.R.** *Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi.* *Cell.*, 98:69-80 (1999).

**Chow L., Lin P.C., Chang J.S., Chu P.Y., Lee P.K., Chen S.N., Cheng Y.M., Lee J.C., Chang J.Y., Liu T.W.,** *Differences in the frequencies of K-ras c12-13 genotypes by gender and pathologic phenotype in colorectal tumors measured using the allele discrimination method.* *Environ Mol Mutagen*, 53:22-31 (2012).

**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).

**Delgado M.D., Vaqué J.P., Arozarena I., Lòpez-Illasaca M.A., Martínez C., Crespo P., Leòn J.** *H-, K- and N-Ras inhibit myeloid leukemia cell proliferation by a p21<sup>WAF1</sup>-dependent mechanism.* *Oncogene*, 19:783-790 (2000).

**Davies H., Bignell G.R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett M.J., 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 B.A., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins G.J., Bigner D.D., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho JW., Leung S.Y., Yuen S.T., Weber B.L., Seigler H.F., Darrow T.L., Paterson H., Marais R, Marshall C.J., Wooster R., Stratton M.R., Futreal P.A.** *Mutations of the BRAF gene in human cancer.* *Nature*, 417:949-54 (2002).

**De Roock W., Jonker D.J., Di Nicolantonio F., Sartore-Bianchi B., Tu D., Siena S., Lamba S., Arena S., Frattini M., Piessevaux H., Van Cutsem E., O'Callaghan C.J., Khambata-Ford S., Zalberg J.R., Simes J., Karapetis C.S., Bardelli A., Tejpar S.** *Association of KRAS p.g13d mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab.* JAMA, 304:16 (2010).

**Dotto G.P.** *p21<sup>WAF1/Cip1</sup> : more than a break to the cell cycle?* Biochimica et Biophysica Acta, 1471:M43-M56 (2000).

**D'Orazi G., Soddu S., Sacchi A.** *Activation of p53/p21waf1 pathway is associated with senescence during v-Ha-ras transformation of immortal C2C12 myoblasts.* Anticancer Res., 20:3497-502 (2000).

**Dvory-Sobol H., Cohen-Noyman E., Kazanov D., Figer A., Birkenfeld S., Madar-Shapiro L., Benamouzig R., Arber N.** *Celecoxib leads to G2/M arrest by induction of p21 and down-regulation of cyclin B1 expression in a p53-independent manner.* Eur J Cancer, 42:422-6 (2006).

**El-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W., Vogelstein B.** *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.* Cell., 75:817-25 (1993).

**Engelman J.A., Luo J., Cantley L.C.** *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism.* Nat Rev Genet., 7:606-19 (2006).

**Fabian J.R., Daar I.O., Morrison D.K.** *Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase.* Mol Cell Biol, 13:7170-9 (1993).

**Fang J.Y., Lu Y.Y.** *Effects of histone acetylation and DNA methylation on p21( WAF1) regulation.* World J Gastroenterol, 8:400-5 (2002).

**Fearon E.R. and Vogelstein B.** *A genetic model for colorectal tumorigenesis.* Cell, 61:759-767 (1990).

**Fearon E.R.** *Molecular Genetics of Colorectal Cancer.* The 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.* PLoS One, 8:e63187 (2013).

**Fujita F., Torashima Y., Kuroki T., Eguchi S.** *The risk factors and predictive factors for anastomotic leakage after resection for colorectal cancer: reappraisal of the literature.* Surg Today, 1-8 (2013).

**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).

**Gartel A.L., Ye X., Goufman E., Shianov P., Hay N., Najmabadi F., Tyner A.L.** *Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3.* Proc Natl Acad Sci USA, 98:4510-5 (2001).

**Gartel A.L., Tyner A.L.** *Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene.* Exp Cell Res., 246:280-9 (1999).

**Gartel A.L., Radhakrishnan S.K.** *Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences.* Cancer Res., 65:3980-5 (2005).

**Grewal T., Koese M., Tebar F., Enrich C.** *Differential Regulation of RasGAPs in Cancer Genes & Cancer* 2:288-297 (2011).

**Guan K.L., Figueroa C., Brtva T.R., Zhu T., Taylor J., Barber T.D., Vojtek A.B.** *Negativeregulation of the serine/threoninekinase B-Raf by Akt.* J Biol Chem., 275:27354-9 (2000).

**Gupta K., Thakur V.S., Bhaskaran N., Nawab A., Babcook M.A., Jackson M.W., Gupta S.** *Green tea polyphenols induce p53-dependent and p53 independent apoptosis in prostate cancer cells through two distinct mechanisms.* PLoS One, 7:e52572 (2012).

**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, fifferentiation 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.* Curr Opin Cell Biol, 25:177-83 (2013).

**Han E.K., Leverson J.D., McGonigal T., Shah O.J., Woods K.W., Hunter T., Giranda V.L., Luo Y.** *Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1inhibition.* Oncogene, 26:5655-61 (2007).

**Hermanová M., Lukàs Z., Kroupová I., Kleibl Z., Novotný J., Nenutil R., Pazourková M., Bràzdil J., Kren L., Dìte P.** *Relationship between K-ras mutation and the expression of p21 WAF1/CIP1 and p53 in chronicpancreatitis and pancreatic adenocarcinoma.* Neoplasma, 50:319-25 (2003).

**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  $\beta$ -cells.* Am J Physiol Endocrinol Metab., 304:E1281-90 (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).

**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.* Mol Cell Biol, 26:8267-80 (2006).

**Hirsch E., Ciraolo E., Ghigo A., Costa C.** *Taming the PI3K team to hold inflammation and cancer at bay.* Pharmacol Ther., 118:192-205 (2008).

**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.* Int J Biol Sci., 8:596-605 (2012).

**Jun J.E., Rubio I., Roose J.P.** *Regulation of Ras Exchange Factors and cellular localization of Ras activation by lipid messengers in T cells.* Front Immunol., 4:239 (2013).

**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 Dis., 4:e775 (2013).

**Jass J.R.** *Colorectal Cancer: A Multipathway Disease.* Oncogenesis, 12:273-287 (2006).

**Jung, Y.S., Qian Y., Chen, X.** *Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity.* Cell. Signal, 22:1003-1012 (2010).

**Kanthan R., Senger J.L., Kanthan S.C.** *Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review.* Patholog Res Int., 4:239 (2012).

**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.* PLoS Biol., 2:E242 (2004).

**Kennedy S.G., Kandel E.S., Cross T.K., Hay N.** *Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria.* Mol Cell Biol., 19:5800-10 (1999).

**Kern F., Niaux T., Baccarini M.** *Ras and Raf pathways in epidermis development and carcinogenesis.* Br J Cancer, 104:229-34 (2011).

**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.* Biochem Biophys Res Commun, 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.* Pathol Oncol Res., 1:7 (2013).

**Kops G.J., Medema R.H., Glassford J., Essers M.A., Dijkers P.F., Coffey P.J., Lam E.W., Burgering B.M.** *Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors.* Mol Cell Biol., 22:2025-36 (2002).

**Kortum R.L., Johnson H.J., Costanzo D.L., Volle D.J., Razidlo G.L., Fusello A.M., Shaw A.S., Lewis R.E.** *The molecular scaffold kinase suppressor of Ras 1 is a modifier of Ras<sup>V12</sup>-induced and replicative senescence.* Molecular and Cellular Biology, 26:2202-2214 (2006).

**Koster R., di Pietro A., Timmer-Bosscha H., Gibcus J.H., van den Berg A., Suurmeijer A.J., Bischoff R., Gietema J.A., de Jong S.** *Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer.* J Clin Invest, 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., e Hamatani S.** *Depressed-Type Colonic Lesions and ‘De Novo’ Cancer in Familial Adenomatous Polyposis: A Colonoscopist’s Viewpoint.* Gastroenterology, 2013:6 (2013).

**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 Dev., 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.** *Tautomycetin inhibits growth of colorectal cancer cells through p21cip/WAF1 induction via the extracellular signal-regulated kinase pathway.* Mol Cancer Ther., 5:3222-31 (2006).
- Lee J.W., Juliano R.L.** *alpha5beta1 integrin protects intestinal epithelial cells from apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B-dependent pathway.* Mol Biol Cell., 11:1973-87 (2000).
- Levidou G., Saetta AA. 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 J Surg Oncol., 10:47 (2012).
- Liang J., Slingerland J.M.** *Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression.* Cell Cycle, 2:339-45 (2003).
- Li Y., Dowbenko D., Lasky L.A.** *AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival.* J Biol Chem., 277:11352-61 (2002).
- Lin A.W., Barradas M., Stone J.C., van Aelst L., Serrano M., Lowe SW.** *Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling.* Genes Dev., 12:3008-19 (1998).
- Lowy D.R., Willumsen B.M.** *Function and regulation of ras.* Annu. Rev. Biochem., 62:851-891 (1993).
- Mallawaarachy 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).
- Matallanas D., Romano D., Yee K., Meissl K., Kucerova L., Piazzolla D., Baccarini M., Vass JK., Kolch W., O'neill E.** *RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein.* Mol Cell., 27:962-75 (2007).
- Matallanas D., Romano D., Hamilton G., Kolch W., O'Neill E.** *A Hippo in the ointment: MST signalling beyond the fly.* Cell Cycle, 7:879-84 (2008).
- 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.* Mol Cell, 44:893-906 (2011).

**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.* Advan. Enzyme Regul., 46:249-279 (2006).

**Miranda F.** *Effetti di mutazioni diverse di Ras in cellule di carcinoma coloretale (HT29).* Tesi di Dottorato 2010.

**Milutinovic S., Knox J.D., Szyf M.** *DNA methyltransferase inhibition induces the transcription of the tumor suppressor p21(WAF1/CIP1/sdi1).* J Biol Chem., 275:6353-9 (2000).

**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 Kras mutations and prognosis.* Eur J Gastroenterol Hepatol., 19:883-9 (2007).

**Moelling K., Schad K., Bosse M., Zimmermann S., Schweneker M.** *Regulation of Raf-Akt Cross-talk.* J Biol Chem., 277:31099-106 (2002).

**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 J Gastrointest Oncol., 2:151-15 (2010).

**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.* J. Pathol., 187: 433-438 (1999).

**Murga C., Fukuhara S., Gutkind J.S.** *A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase beta in signaling from G protein-coupled receptors to Akt.* J Biol Chem., 275:12069-73 (2000).

**Nieminen T.T., Shoman S., Eissa S., Peltomäki P., Abdel-Rahman W.M.** *Distinct genetic and epigenetic signatures of colorectal cancers according to ethnic origin.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., 21:202-11 (2012).

**Noda A., Ning Y., Venable S.F., Pereira-Smith O.M., Smith J.R.** *Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen.* Exp Cell Res., 211:90-8 (1994).

**Oda K., Okada J., Timmerman L., Rodriguez-Viciano 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 Res., 68:8127-36 (2008).

**Ogawara Y., Kishishita S., Obata T., Isazawa Y., Suzuki T., Tanaka K., Masuyama N., Gotoh Y.** *Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53.* J Biol Chem., 277:21843-50 (2002).

**Oh S.Y., Park K.S., Kim J.A., Choi K.Y.** *Differential modulation of zinc-stimulated p21(Cip/WAF1) and cyclin D1 induction by inhibition of PI3 kinase in HT-29 colorectal cancer cells.* Exp Mol Med., 34:27-31 (2002).

**Osaki M., Oshimura M., Ito H.** *PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer.* Apoptosis, 9:667-76 (2004).

**Palmero I., Pantoja C., Serrano M.** *p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras.* Nature, 395:125-6 (1998).

**Palmirotta R., Savonarola A., Ludovici G., Laura De Marchis M.L., Covello R., Ettorre 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, 49:729-733 (2011).

**Pancione M., Remo A., Colantuoni V.** *Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression.* Patholog Res Int., 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.* Int. J. Cancer, 120:7-12 (2006).

**Patai A.V., Molnàr B., Tulassay Z., Sipos F.** *Serrated pathway: alternative route to colorectal cancer.* World J Gastroenterol, 19:607-15 (2013).

**Petiot A., Ogier-Denis E., Blommaert E.F., Meijer A.J., Codogno P.** *Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells.* J Biol Chem., 275:992-8 (2000).

**Prior I.A., Hancock J.F.** *Compartmentalization of Ras proteins.* Journal of Cell Science, 114:1603-1608 (2001).

**Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y.** *Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips.* Nat Protoc., 2:1896-906 (2007).

**Roberts P.J., Der C.J.** *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer.* *Oncogene*, 26:3291-310 (2007).

**Romano D., Matallanas D., Weitsman G., Preisinger C., Ng T., Kolch W.** *Proapoptotic kinase MST2 coordinates signaling crosstalk between RASSF1A, Raf-1, and Akt.* *Cancer Res.*, 70:1195-203 (2010).

**Romano D., Maccario H., Doherty C., Quinn NP., Kolch W., Matallanas D.** *The differential effects of wild-type and mutated K-Ras on MST2 signaling are determined by K-RAs activation kinetics.* *Mol Cell Biol.*, 33:1859-68 (2013).

**Roman-Gomez J., Castillejo J.A., Jimenez A., Gonzalez M.G., Moreno F., Rodriguez Mdel C., Barrios M., Maldonado J., Torres A.** *5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21(CIP1/WAF1/SD11) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia.* *Blood.*, 99:2291-6 (2002).

**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).

**Rommel C., Clarke B.A., Zimmermann S, Nuñez L., Rossman R., Reid K., Moelling K., Yancopoulos G.D., Glass D.J.** *Differentiation Stage-Specific Inhibition of the Raf-MEK-ERK Pathway by Akt.* *Science*, 286 (1999).

**Saiz-Ladera C., Lara M.F., Garín M., Ruiz S., Santos M., Lorz C., García-Escudero R., Martínez-Fernández M., Bravo A., Fernández-Capetillo O., Segrelles C., Paramio J.M.** *p21 suppresses inflammation and tumorigenesis on pRB-deficient stratified epithelia.* *Oncogene*, 417 (2013).

**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).

**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).

**Serrano M., Lin AW., McCurrach M.E., Beach D., Lowe S.W.** *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a.* *Cell*, 88:593-602 (1997).

**Shirasawa S., Furuse M., Yokoyama, N., Sasazuki, T.** *Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras.* Science, 260:85-88 (1993).

**Shima K., Nosho K., Baba Y., Cantor M., Meyerhardt J.A., Giovannucci EL., Fuchs CS., Ogino S.** *Prognostic significance of CDKN2A (p16) promoter methylation and loss of expression in 902 colorectal cancers: Cohort study and literature review.* Int J Cancer, 128:1080-94 (2011).

**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 Pharmacother, 67:305-11 (2013).

**Syed Sameer A., Shah Z.A., Abdullah S., Chowdri NA., Siddiqi M.A.** *Analysis of molecular aberrations of Wnt pathway gliadators in colorectal cancer in the Kashmiri population.* Hum Genomics, 5:441-52 (2011).

**Stein G.H., Drullinger F.L., Soulard A., Dulic V.** *Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts.* Molecular and Cellular Biology, 2109-2117 (1999).

**Stephens L.R., Eguinoa A., Erdjument-Bromage H., Lui M., Cooke F., Coadwell J., Smrcka A.S., Thelen M., Cadwallader K., Tempst P., Hawkins P.T.** *The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101.* Cell., 89:105-14 (1997).

**Stott F.J., Bates S., James M.C., McConnell B.B., Starborg M., Brookes S., Palmero I., Ryan K., Hara E., Vousden K.H., Peters G.** *The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2.* EMBO J., 17:5001-14 (1998).

**Suire S., Coadwell J., Ferguson G.J., Davidson K., Hawkins P., Stephens L.** *p84, a new Gbetagamma-activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110gamma.* Curr Biol., 15:566-70 (2005).

**Sung P.J., Tsai F.D., Vais H., Court H., Yang J., Fehrenbacher N., Foscett JK., Philips MR.** *Phosphorylated KRas limits cell survival by blocking BclxL sensitization of inositol trisphosphate receptors.* Proc Natl Acad Sci USA, 110:20593-8 (2013).

**Suzuki H., Yabuta N., Okada N., Torigata K., Aylon Y., Oren M., Nojima H.** *Lats2 phosphorylates p21/CDKN1A after UV irradiation and regulates apoptosis.* J Cell Sci, 126:4358-68 (2013).

**Talseth-Palmer B.A. , Holliday E.G., Evans T.J., McEvoy M., Attia J., Grice D.M., Masson A.L., Meldrum C., Spigelman A., 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.** *KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer.* World J Gastroenterol, 18:5171-5180 (2012).

**Tarakji B., Baroudi K., Hanouneh S., Nassani M.Z., Alotaibi A.M., Kharma M.Y., Azzeghaiby S.N.** *Expression of p21 is dependent on or independent of p53 in carcinoma ex pleomorphic adenoma (undifferentiated and adenocarcinoma type).* Pol J Pathol., 63:286-91 (2012).

**Takayama T., Ohi M., Hayashi T., Miyanishi K., Nobuoka A., Nakajima T., Satoh T., Takimoto R., Kato J., Sakamaki S., Niitsu Y.** *Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis.* Gastroenterology, 121:599-611 (2001).

**Valin A., Ouyang J., Gill G.** *Transcription factor Sp3 represses expression of p21<sup>CIP1</sup> via inhibition of productive elongation by RNA polymerase II.* Mol Cell Biol., 33:1582-93 (2013).

**Van Aelst L., Barr M., Marcus S., Polverino A., Wigler M.** *Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6213-6217 (1993).

**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.* Clin Epigenetics, 5:2 (2013).

**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-4-one (LY294002).* J Biol Chem., 269:5241-8 (1994).

**Velho S., Moutinho C., Cirnes L., Albuquerque C., Hamelin R., Schmitt F., Carneiro F., Oliveira C., Seruca R.** *BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis?* BMC Cancer, 8:255 (2008).

**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-4-one (LY294002).* J Biol Chem., 269:5241-8 (1994).

**Vogelstein B., Kinzler K.** *The multistep nature of cancer.* TIG, 9:138-141 (1993).

**von Thun A., Preisinger C., Rath O., Schwarz J.P., Ward C., Monsefi N., Rodríguez J., Garcia-Munoz A., Birtwistle M., Bienvenut W., Anderson K.I., Kolch W., von Kriegsheim A.** *Extracellular signal-regulated kinase regulates RhoA activation and tumor cell plasticity by inhibiting guanine exchange factor H1 activity.* Mol Cell Biol., 33:4526-37 (2013).

**Wicki A., Herrmann R., Christofori G.** *Kras in metastatic colorectal cancer.* Swiss Med Wkly, 140:w13112 (2010).

**Willet WC.** *Diet and cancer: one view at the start of the millennium.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 10:3-8 (2001).

**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.* Mol. Cell Biol, 17:5598-5611 (1997).

**Wright L.P., Philips M.R..** *Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras.* J Lipid Res., 47:883-91 (μ6).

**Xiong Y., Hannon G.J., Zhang H., Casso D., Kobayashi R., Beach D.** *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases.* Nature, 366:701-4 (1993).

**Xu X.L. Yu J., Zhang H.Y., Sun M.H., Gu J., Du X., Shi D.R., Wang P., Yang Z.H., Zhu J.D.** *Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis.* World J Gastroenterol, 10:3441-54 (2004).

**Yan J., Roy S., Apolloni A., Lane A., Hancock J.F.** *Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase.* J Biol Chem., 273:24052-6 (1998).

**Zimmermann S., and Moelling K.** *Phosphorylation and Regulation of Raf by Akt (Protein Kinase B).* Science, 286 (1999).

**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.* Int J Oncol, 43:289-96 (2013).

**Zhao B., Kimura W., Futakawa N., Muto T., Kubota K., Harihara Y., Takayama T., Makuuchi M.,** *p53 and p21/Waf1 protein expression and Kras codon 12 mutation in carcinoma of the papilla of Vater.* Am J Gastroenterol, 94:2128-34 (1999).

**Zhu W.G., Srinivasan K., Dai Z., Duan W., Druhan L.J., Ding H., Yee L., Villalona-Calero M.A., Plass C., Otterson G.A.** *Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21(Cip1) promoter.* Mol Cell Biol, 23:4056-65 (2003).

## ***Ringraziamenti***

*Ringrazio il Professore Walter Kolch che mi ha ospitato presso l'University College of Dublin (UCD) e tutto il team del Dipartimento Systems Biology Ireland (SBI). In particolare, ringrazio i ricercatori David Matallanas e Cinzia Raso.*

# INDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	1
<b>INTRODUZIONE</b> .....	3
IL CARCINOMA DEL COLORETTO .....	3
LA FAMIGLIA DEI PROTONCOGENI RAS .....	6
RUOLO DI RAS NELLA TUMORIGENESI DEI TUMORI UMANI.....	11
I PATHWAYS ATTIVATI DA RAS .....	13
LA PROTEINA RAS E IL CONTROLLO DEL CICLO CELLULARE .....	19
LA PROTEINA p21CIP1/WAF1 .....	22
K-RAS REGOLA I PATHWAYS RASSF1A-MST2-LATS1 E RAF1-MST2.....	28
<b>PREMESSA</b> .....	30
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	34
COLTURE CELLULARI.....	34
TRIPSINIZZAZIONE .....	36
CONGELAMENTO CELLULARE.....	36
SCONGELAMENTO DI CELLULE CONSERVATE IN AZOTO LIQUIDO .....	36
ANALISI CITOFLUORIMETRICHE CON PROPIDIO IODURO SU CELLULE A FRESCO.....	37
ANALISI CITOFLUORIMETRICHE CON PROPIDIO IODURO SU CELLULE FISSATE IN ETANOLO .....	37
SAGGIO DELLE CASPASI .....	38
PREPARAZIONE DEI LISATI TOTALI.....	38
ELETTROFORESI MONODIMENSIONALE .....	39

WESTERN BLOT .....	40
INIBIZIONE DEI PATHWAYS PI3K/AKT E RAF/MAPK .....	41
SAGGI DI PROLIFERAZIONE E TEST DI VITALITÀ CELLULARE .....	42
SAGGI DI IMMUPRECIPITAZIONE .....	43
TRASFEZIONE DELLE CELLULE CON LIPOFECTAMINA .....	43
SPETTROMETRIA DI MASSA (MS) “TANDEM” O MASSA-MASSA (MS/MS) .....	44
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	47
ANALISI DEL CICLO CELLULARE SU CELLULE K13 E K12 .....	47
ANALISI DELL’ESPRESSIONE DELLA PROTEINA p21 .....	52
SAGGI DI PROLIFERAZIONE E DI VITALITÀ CELLULARE SUL CLONE K12 TRATTATO CON GLI INIBITORI PD98059 E LY294002.....	53
SAGGI DI PROLIFERAZIONE E DI VITALITÀ CELLULARE SUL CLONE K13 TRATTATO CON GLI INIBITORI PD98059 E LY294002 .....	55
ANALISI DEGLI EFFETTI DEGLI INIBITORI PD98059 E LY294002 SUL CICLO CELLULARE E SULL’ESPRESSIONE DELLA PROTEINA p21 IN CELLULE K12.....	57
ANALISI DEGLI EFFETTI DEGLI INIBITORI PD98059 E LY294002 SUL CICLO CELLULARE E SULL’ESPRESSIONE DELLA PROTEINA p21 IN CELLULE K13.....	63
ANALISI DEGLI EFFETTI DEL MIFEPRISTONE SULL’ESPRESSIONE DI RAS E K-RAS IN CELLULE K13 E K12 .....	69
ANALISI DEL PATHWAY PRO-APOPTOTICO RASSF1A-MST2-LATS1 E ANTI-APOPTOTICO RAF-1-MST2 IN CELLULE HT-29, K12 E K13 .....	71
ANALISI DELL’ESPRESSIONE DELLA PROTEINA MAP CHINASI BRAF IN CELLULE HT-29, K12 E K13.....	75

ANALISI DEI EFFETTI DI RAS SULLA MORTE CELLULARE.....	76
ANALISI DI SPETTROMETRIA DI MASSA IN CELLULE HKE3 TRASFETTATE CON K-RASG13D O K-RAS WILD TYPE .....	81
<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>87</b>
<b>APPENDICE.....</b>	<b>92</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>98</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>111</b>