

**DOTTORATO DI RICERCA**

**Biologia Cellulare, Molecolare e Industriale  
XXVI Ciclo**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/11

**Analisi fosfoproteomica di campioni di tumore:  
Il problema della stratificazione dei pazienti e  
dell'eterogeneità intratumorale nell'era della terapia  
personalizzata**

**Relatori:**

Prof. Enzo Spisni

Prof. Alfonso Colombatti

**Presentata da:**

Erika Maria Parasido

**Coordinatore:**

Prof. Vincenzo Scarlato

# Sommario

<b>PARTE 1: LA PIATTAFORMA LCM/RPPA.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUZIONE: CANCRO DEL COLON RETTO.....</b>	<b>2</b>
2.1 Anatomia del colon.....	3
2.2 Carcinogenesi.....	4
2.3 Epidemiologia, stadiazione e metastasi.....	7
2.4 Chemioterapia nel CRC e i suoi effetti collaterali.....	9
2.5 Terapia mirata e Terapia Personalizzata.....	11
2.5.1 Terapia mirata: chinasi e cancro.....	12
2.6 Microdissezione Laser e Reverse Phase.....	16
2.7 RPPA in clinica per Il trattamento del mCRC.....	20
<b>3. SCOPO DEL LAVORO .....</b>	<b>22</b>
<b>4. Materiali e Metodi.....</b>	<b>24</b>
4.1 Pazienti.....	25
4.2 Microdissezione Laser.....	26
4.2.1 Sezionamento e colorazione con ematossilina.....	27
4.2.2 Microdissezione Laser.....	27
4.3 Lisi cellular ed estrazione proteica.....	28
4.4 Deposizione delle Proteine su support (Printing).....	30
4.5 Rivelazione delle Proteine mediante Immunostaining (Protein Staining).....	32
4.6 Determinazione della proteina totale.....	34
4.7 Analisi dei dati.....	35
4.7.1 Determinazione dell'intensità degli spot.....	35
4.7.2 Analisi dei cluster (two-way unsupervised hierarchical clustering analysis).....	35
4.7.3 Analisi statistica.....	36
<b>5. Risultati.....</b>	<b>37</b>
5.1 La clusterizzazione delle biopsie rivela raggruppamenti “patiente-specifici”.....	38
5.2 L’anaisi del fold increase tra biopsia pre e post-trattamento mostra i meccanismi di resistenza al trattamento.....	40
5.3 La resecabilità di una metastasi epatica può essere determinata dal profilo proteomico.....	44
5.4 Identificazione dei possibili candidati per la terapia personalizzata delle metastasi non-resecabili.....	48
<b>6. DISCUSSIONE .....</b>	<b>51</b>

<b>Parte 2: Eterogeneità intratumorale</b>	<b>56</b>
7. Introduzione	57
7.1 Problematiche nei Trial	58
7.2 Eterogeneità intratumorale	58
<b>8. Scopo del Lavoro</b>	<b>61</b>
<b>9. Materiali e Metodi</b>	<b>63</b>
9.1 Pazienti	64
9.2 Analisi dei Dati	68
<b>10. Risultati</b>	<b>69</b>
10.1 La clusterizzazione gerarchica utilizzando tutti gli endpoint analizzati non mostra differenze all'interno dello stesso tumore	70
10.2 L'analisi dei singoli <i>pathways</i> non mostra differenze all'interno dello stesso paziente	73
10.2.1 Valutazione dei cluster gerarchici	73
10.2.2 Valutazione del fold increase tra le diverse biopsie derivate dalla stessa lesione: l'eterogeneità inter-tumorale è maggiore di quella intra-tumorale	79
10.3 Valutazione della correlazione tra il tempo di raccolta del campione e il livello del segnale: l'importanza del congelamento immediato ai fini dell'analisi proteomica	85
10.4 Valutazione dell'attivazione del segnale tra tessuto intero e LCM: il tessuto intero mostra una più elevata eterogeneità intratumorale	87
<b>11. DISCUSSIONE</b>	<b>89</b>
<b>Parte 3: Conditionally reprogrammed cells (CRCs)</b>	<b>94</b>
12. Introduzione	95
12.1 Conditionally reprogrammed cells (CRCs): un nuovo modo di concepire le colture cellulari primarie	96
<b>13. Scopo del lavoro</b>	<b>98</b>
<b>14 Materiali e Metodi</b>	<b>101</b>
14.1 Modello murino	102
14.2 Raccolta dei campioni	102
14.2.1 Terreno per il trasporto del tessuto	102

14.3	Processamento CRCs con arricchimento di cripte.....	104
14.3.1	Reagenti e terreni.....	104
14.4	Digestione del tessuto e arricchimento delle cripte.....	105
14.5	Mantenimento delle colture “cripte-CRCs” .....	106
14.6	Lisi delle cellule per RPPA.....	107
<b>15.</b>	<b>Risultati.....</b>	<b>109</b>
15.1	La valutazione dei tessuti di topo con RPPA ha mostrato omogeneità intra-tumorale a livello proteomico .....	110
15.2	Il protocollo per l’arricchimento di cripte del colon di topi può essere abbinato al procedimento di CRCs per la produzione di linee cellulari stabili nel tempo.....	112
15.3	Il confronto tra il segnale proteico delle linee cellulari e il rispettivo materiale LCM mostra una similarità nella maggioranza dei casi.....	113
<b>16.</b>	<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>118</b>
<b>17.</b>	<b>Conclusioni Generali.....</b>	<b>122</b>

**Bibliografia**

**La maggioranza degli esperimenti presentati in questa tesi sono stati effettuati presso il laboratori “Center of Applied Proteomics and Molecular Medicine”, George Mason Univesity, Manassas, VA, USA con la supervisione di Drs M. Pierobon e E. Petricoin e presso Georgetown University, Washington D.C., con la supervisione di Dr. C. Albanese.**

The strong influence of the presence of secondary masses on patients survival and the inadequate knowledge about molecular derangements inducing metastatic progression have been considered two essential reasons to increase studies aimed to better understand the molecular basis of metastatic progression.

In the present thesis we investigate the potentiality of Laser Capture Microdissection (LCM) and Reverse Phase Protein microarray (RPPA) in clinical trials. Also we analyze the possibility to create a primary cell lines bio-bank in order to achieve sensitivity drug tests before to make a treatment decision.

First of all, proteomic profiles of pre and post therapy biopsies were obtained from the first patients of a new clinical trial. The results demonstrate the ability of this platform to show the acquired resistance mechanism to the biological therapy. This had led us to discover a better stratification for patient with unresectable colorectal cancer liver metastasis. The RPPA data revealed distinct patterns activation between resectable and unresectable metastasis. Our results also show two potential new drug targets that could be combined for a new clinical trial for neo adjuvant treatment.

But the evaluation of the whole tumor with single biopsies seems to be a problem due to intra-tumor heterogeneity shown at genomic level by recent studies. We sought to investigate this problem in the functional signaling architecture of colorectal cancer liver metastasis and renal primary tumor. The results indicated an overall similarity in the proteomic profiles within the same tumor. Based on the idea that a single biopsy is representative of a whole lesion, we evaluated the possibility to create a primary cell lines bio-bank, in order to evaluate the molecular profile for each patient for best therapy for each of them and the progress during the treatment. To date there was not a protocol to create immortalized cell lines without any genetic change. The innovative approach of Georgetown University and the Conditionally Reprogrammed Cells (CRCs) leads us to better evaluate this technique. In fact, the mechanism of reprogramming of CRCs is not understood and it is still not clear if those cells reproduce the tissue profile or it changed with the *in vitro* passage. Based on a colorectal cancer mouse model, our preliminary data show a similar proteomic profile between the cell lines and the mouse tissue.

These data open infinity possibility in the use of the CRCs technique in the clinics field.

In conclusion, our data demonstrate the usefulness of LCM/RPPA platform in clinical trial and the possibility to create a primary cell lines bio-bank to improve treatment decision.

**A Pabuf**

*Il compito più alto di un uomo è sottrarre gli animali alla crudeltà.*  
*Emile Zola*

# **Parte 1**

## **La piattaforma LCM/RPPA**

## **2. Introduzione**

# **Cancro del colon-retto**

## 2.1 Anatomia del colon

L'intestino crasso è la parte terminale del tratto digerente e ha come ruolo principale l'assorbimento di acqua e sali, ed alberga più del 70% di tutti i microbi del corpo umano. Presenta un diametro maggiore dell'intestino tenue, ma una lunghezza minore che si approssima ai 2 metri.

Esso si divide anatomicamente in quattro porzioni: *cieco, colon, sigmoide e retto*.

Il colon a sua volta è diviso in ascendente, trasverso e discendente.

Le funzioni principali svolte dal colon sono l'assorbimento di acqua e altri nutrienti dal materiale che verrà scartato successivamente attraverso l'ano. Inoltre il microbiota intestinale esplica altre importanti funzioni, tra cui le principali sono: 1) difesa nei confronti dei germi patogeni tramite la produzione di acido lattico e perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 2) fermentazione e assorbimento di carboidrati che l'organismo non sarebbe in grado di metabolizzare se non vi fossero i batteri intestinali, 3) contrasto della crescita di germi patogeni e 4) interazioni con il sistema immunitario attraverso la maturazione del tessuto linfoidale intestinale.

L'organizzazione dell'intestino crasso è caratterizzata da diversi strati simili lungo le sue diverse parti, ad eccezione per il retto, l'appendice vermiforme e la valvola ileo cecale.

Si possono osservare, dall'interno verso l'esterno, la tonaca mucosa, la tonaca sottomucosa, la tonaca muscolare propria e la tonaca avventizia o sierosa.

La **tonaca mucosa** si divide in *epitelio di rivestimento, lamina propria e muscularis mucosae*.

L'*epitelio di rivestimento* è formato da enterociti e cellule caliciformi mucipare disposti alla superficie della mucosa.

La *lamina propria* della mucosa intestinale è formata da tessuto connettivo lasso, che accoglie le ghiandole intestinali o cripte; esse si presentano di forma tubulare semplice e per la maggior parte sono formate da cellule caliciformi mucipare. Localizzate alla base, si possono anche trovare poche cellule staminali che intervengono nel continuo rinnovamento degli strati superiori delle ghiandole, dove le cellule più mature sono disperse nel lume intestinale. Molto importanti sono anche le *cellule di Paneth* che giocano un ruolo cruciale nel proteggere il continuo turnover dell'epitelio intestinale. Numerose sono anche le cellule argentaffini, contenenti serotonina e capaci di assumere i precursori delle amine. Vi si possono trovare anche noduli linfatici, ma solo solitari, cioè mai aggregati in voluminose formazioni come succede nell'intestino tenue.

La *muscularis mucosae* è formata da un sottile strato di tessuto muscolare. La tonaca sottomucosa contiene il plesso nervoso sottomucoso.

La **tonaca muscolare propria** presenta due tipi di fasci muscolari, uno interno con fasci circolari e uno esterno con fasci longitudinali raggruppati in corrispondenza delle tenie. La tonaca muscolare permette, grazie a un movimento di peristalsi, lo spostamento verso l'ano del materiale di scarto.

La **tonaca sierosa** non è presente in tutte le parti dell'intestino crasso ed è sostituita da un'avventizia nelle pareti sprovviste di rivestimento peritoneale.

## 2.2 Carcinogenesi

Il cancro del colon-retto (CRC) ha origine per la maggior parte dei casi da una proliferazione incontrollata delle ghiandole della mucosa.

La trasformazione da tessuto normale a tessuto tumorale avviene nel momento in

cui il turnover delle cellule all'apice delle ghiandole intestinali subisce anomalie che evadono i sistemi di controllo. La prima manifestazione di alterazione epiteliale è la presenza di foci di cripte aberranti, costituiti da cripte di dimensioni maggiori rispetto a quelle normali, con forme ovali piuttosto che circolari. Esse presentano un incremento dello spazio tra una ghiandola e l'altra e ispessimento dello strato epiteliale che appare più scuro alla colorazione con ematossilina/eosina.

In generale, però, non tutti i focolai di cripte aberranti si trasformano in CRC, alcuni rimangono solo dei candidati ad alto rischio per la formazione di adenoma o CRC.

Mentre era stato provato nel 1958 da Foul che la tumorigenesi è un processo *multisteps*, nel 1988 Vogelstein riuscì a spiegare, con un modello genetico, come il tumore derivi da un accumulo di alterazioni genetiche che producono il fenotipo neoplastico (FIG.1) (1). Il modello di Volgestein include quattro step successivi salienti:

*Primo:* l'attivazione mutazionale di oncogeni abbinata alla disattivazione mutazionale di geni soppressori del tumore porta a una crescita della massa tumorale;

*Secondo:* almeno quattro o cinque geni devono essere mutati geneticamente affinché si abbia una formazione di tumore maligno;

*Terzo:* nonostante le mutazioni genetiche possano avvenire in una sequenza specifica e preferenziale, l'accumulo finale di queste è responsabile della formazione finale della massa tumorale e non l'ordine in cui avvengono.

*Quarto:* in alcuni casi, mutazioni in geni soppressori del tumore comportano effetti a livello fenotipico.

Vogelstein suggerì che le cellule epiteliali di colon si trasformino in polipi di piccole dimensioni quando perdono la funzionalità, per mutazione o delezione, dell' oncogene soppressore APC (Adenomatous Polyposis Coli). La perdita del gene APC comporta un aumento della crescita cellulare dovuta all'attivazione fuori controllo del gene MYC. Il passaggio che porta alla trasformazione da polipo a un piccolo e benigno adenoma prevede un'attivazione costante dell'oncogene della famiglia RAS. L'ultimo passaggio per la formazione maligna dell'adenocarcinoma è la perdita di funzionalità nei geni DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*) e p53 (2) (FIG.1).

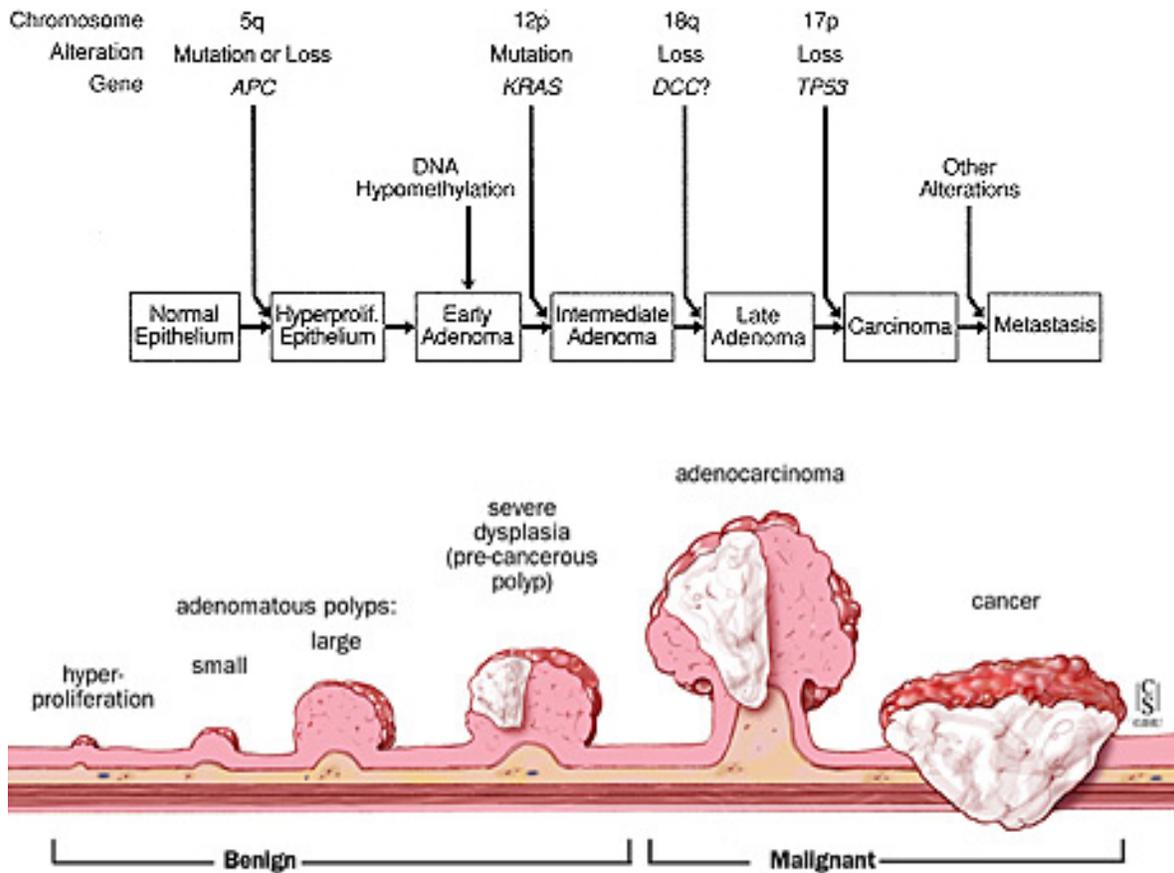


Fig.1 Modello genetico per la formazione del tumore descritto da Vogelstein, in cui ogni mutazione genetica comporta un cambiamento a livello epiteliale, fino alla formazione del tumore

## 2.3 Epidemiologia, stadiazione e metastasi

Il CRC è la quarta causa di morte per tumore a livello mondiale (3), nonostante le linee guida NCCN affermano un decremento nell'incidenza per 100.000 di circa 15 punti dal 1976 al 2005. Questa neoplasia si manifesta sporadicamente nell'85% dei casi, mentre è ereditaria nel restante 15% (4). Il CRC ereditario di può presentare in diverse forme, tra le più conosciute ci sono le forme poliposiche FAP (Familial Adenomatous Polyposis syndrome) e le forme non poliposiche HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer) che coprono tra l'1-5%.

Esistono diversi istotipi e il più comune è l'adenocarcinoma che si sviluppa seguendo la sequenza adenoma-carcinoma descritta in precedenza.

La malignità del tumore è caratterizzata da crescita diffusa, con invasione dei tessuti circostanti e linfonodi o metastasi ai siti distali, principalmente a fegato. Di conseguenza un trattamento chirurgico tempestivo dei polipi rappresenta tuttora il modo migliore per ridurre il rischio di contrarre il tumore. Questo è tuttavia molto difficile poiché il CRC può non manifestarsi per diversi anni, rimanendo asintomatico fino al momento della diagnosi.

Il primo sistema di stadiazione della malattia è stato il DUKE, oramai quasi del tutto sostituito dal più recente TNM, introdotto nel 2001 (TAB.1)

Il sistema TNM si basa su:

- ❖ *penetrazione del tumore primario nel lume dell'intestino (T);*
- ❖ *coinvolgimento dei linfonodi adiacenti (N)*
- ❖ *presenza/assenza di metastasi distanti (M)*

TNM Classification (American Joint Commission on Cancer)				Dukes' Classification
Stages	T	N	M	Stages
Stage 0	Tis	N0	M0	
Stage I	T1	N0	M0	A
	T2	N0	M0	B1
Stage II	T3	N0	M0	B2
	T4	N0	M0	B2
Stage III	T1, T2	N1 or N2	M0	C1
	T3, T4	N1 or N2	M0	C2
Stage IV	Any T	Any N	M1	D

Tab.1 Tabella di paragone tra classificazione TNM e Duke

A oggi, grazie alla diagnosi precoce dovuta allo screening e a migliori modalità di trattamento terapeutico, la mortalità dovuta a CRC si è ridotta di circa il 35% dal 1990 al 2007 (5).

Il 50% dei pazienti con CRC svilupperanno una metastasi epatica. La resezione completa della metastasi (epatica o polmonare) comporta un aumento della sopravvivenza nel 35-60% dei casi, ma purtroppo l'80-90% dei pazienti non presenta metastasi resecabili. La maggior parte di questi ha una metastasi epatica (6) con possibilità di sopravvivenza nei 5 anni successivi inferiore al 10% (7,8). Diversi studi hanno riportato che un elevato numero di metastasi epatiche derivanti da CRC sia un fattore prognostico negativo (9,10). Ciò nonostante il numero di metastasi riscontrate in un paziente non viene usato come una controindicazione assoluta per il trattamento chirurgico. Se tutte le lesioni possono essere resecate con un margine negativo (R0), lasciando un'adeguata porzione di fegato, la chirurgia viene sempre presa in considerazione. È ovviamente da considerare che se il numero di metastasi aumenta, l'operazione chirurgica diventa

più impegnativa. Inoltre il numero di metastasi non reseccate durante l'operazione può influenzare la sopravvivenza del paziente.

In pazienti in cui la metastasi risultano reseccabili, la chemioterapia (terapia *neo-adiuvante*) sembra portare dei benefici nella riduzione della grandezza della massa metastatica e per questo è altamente raccomandata. (11)

La terapia sistemica mirata alle metastasi gioca un ruolo fondamentale anche in coloro che presentano metastasi non reseccabili. Nel 33% dei pazienti appartenenti a questa categoria, il trattamento chemioterapico ha portato a una riduzione della massa metastatica, con successiva possibile resezione e incremento della sopravvivenza. (12,13)

## **2.4 La chemioterapia del CRC ed i suoi effetti collaterali**

Il *5-Fluorouracil/Leucovorin* (5FU/LV) è stato considerato, per diversi anni, la terapia principale per il trattamento di cancro al colon retto metastatico (mCRC), con una sopravvivenza media dei pazienti di 11 mesi. Oggi, però, il trattamento 5FU/LV è preferito in combinazione di *oxaliplatino* (FOLFOX) e *irinotecan* (FOLFIRI) nella prima linea di trattamento. Grazie a questo regime, l'*outcome* dei pazienti è stato migliorato e la sopravvivenza media è aumentata fino a un massimo di 23 mesi (14).

In pazienti con metastasi non reseccabili la sopravvivenza aumenta se questi sono esposti a un elevato numero di chemioterapici durante il corso della malattia (15) Sfortunatamente, nel 30-47% dei pazienti sono state riportate steatosi epatiche a causa dell'uso di agenti chemioterapici e citotossici (16).

Dopo l'epatotomia, pazienti con steatosi mostrano molte più complicanze rispetto a quelli privi di steatosi e il grado di complicanze infettive è direttamente correlato

con il grado di steatosi (17).

In pazienti trattati con oxaliplatino sono state riscontrate dilatazioni sinusoidali ed emorragie con distruzione della barriera sinusoidale (18-21)

Queste complicanze e l'aumento continuo delle conoscenze nell'ambito molecolare del tumore, hanno portato all'introduzione delle terapie personalizzate al fine di scegliere a priori quali pazienti risponderanno meglio ad una determinata terapia, quali risconteranno forti effetti collaterali e quali trarranno il massimo beneficio da una specifica combinazione chemioterapica piuttosto che un'altra.

Ovviamente questo tipo di trattamento non può basarsi esclusivamente sulla stadiazione derivata dalle caratteristiche clinico-patologiche del paziente, ma richiede una più approfondita analisi molecolare del tumore.

A tale scopo, diversi studi hanno identificato **fattori prognostici e predittivi di risposta**.

Da un lato, i fattori predittivi di risposta giocano un ruolo fondamentale nella terapia neo-adiuvante, aiutando nella selezione della chemioterapia che ha più possibilità di successo. Dall'altro lato, i fattori prognostici sono utili nel riconoscere pazienti con un alto rischio di ricorrenza.

Un esempio di fattori prognostici possono essere la perdita di eterozigosi del braccio lungo nel cromosoma 18 (LOH) e l'instabilità dei microsatelliti (MSI).

LOH è riscontrata in almeno il 70% dei casi CRC e coinvolge il gene DCC, correlando con la comparsa di metastasi (22).

I microsatelliti sono unità di DNA composte da due, tre o più nucleotidi ripetuti più volte che per la loro stessa struttura rappresentano loci con alta probabilità di errore nel corso della replicazione. L'MSI può causare la perdita di funzionalità di proteine importanti come MLH1 e MLH2, appartenenti al sistema MMR (*Mismatch repair genes*). L'MSI è caratteristica della forma ereditaria non poliposica HNPCC,

nonostante si possa riscontrare anche nel 10-15% dei CRC sporadici. Pazienti che presentano questa caratteristica allo stadio II o III di CRC hanno un *outcome* migliore e un minore rischio di ricorrenza del tumore. (23)

Tra i fattori predittivi di risposta alla chemioterapia troviamo per esempio il polimorfismo germinale dell'enzima timidilato sintasi (Thymidylate synthase-TS). Quest'enzima catalizza l'ultimo passaggio nella sintesi del timidilato, che è essenziale in quanto target di 5-FU. La presenza del polimorfismo in TS è stata correlata con una migliore risposta a 5-FU, ma anche con una migliore sopravvivenza.(24,25)

## **2.5 Terapia mirata (*Target Therapy*) e Terapia Personalizzata**

Con l'evolvere della terapia personalizzata sono stati sviluppati nuovi farmaci, i cosiddetti i farmaci biologici, che usati in combinazione con la chemioterapia hanno incrementato la sopravvivenza dei pazienti metastatici.

Al contrario della medicina chemioterapica, che porta alla distruzione a livello genomico, di tutte le cellule in stato di iper-proliferazione, come cellule del midollo osseo, del tratto digestivo e follicoli piliferi, questi nuovi farmaci mirano alle cellule tumorali a livello proteico, colpendo una minor percentuale di cellule sane. Essi hanno, infatti, la capacità di riconoscere anomalie molecolari all'interno dei *pathways* di proliferazione, sopravvivenza e angiogenesi delle cellule tumorali.

Di conseguenza, mentre la chemioterapia causa effetti collaterali come immunosoppressione, mucositi e alopecia, i farmaci molecolari hanno mostrato un minore impatto negativo sulla vita quotidiana dei pazienti.

Aberrazioni della fosforilazione di proteine chinasi come EGFR, PDGFR, VVEGFR,

cKIT e FGFR, rendono i recettori di proteine chinasi e i loro substrati i migliori bersagli teorici per studiare i nuovi farmaci selettivi per le cellule cancerose.

### **2.5.1 Terapia mirata: chinasi e cancro**

Il chinoma umano comprende più di 500 distinte serine/treonine e tirosine chinasi (26) codificate dal genoma.

Da quando l'oncogene *v-SRC* ha mostrato una diretta correlazione tra chinasi e tumore nello studio di Spector nel 1978 (27), le proteine chinasi sono state il centro dell'attenzione di molte analisi al fine di comprendere il loro coinvolgimento nei processi di carcinogenesi, propagazione e metastatizzazione del tumore.

Molti ricercatori si sono focalizzati sul ruolo di EGFR, poiché ha mostrato espressione irregolare in molti tumori solidi, rendendolo quindi un possibile bersaglio per la terapia mirata.

Il legame di EGF, EREG, TGF $\alpha$  con il recettore EGFR induce la dimerizzazione ed attivazione dello stesso, con successiva attivazione del segnale nelle vie MAPK e PI3K/AKT, comportando proliferazione cellulare, crescita e apoptosi (FIG. 2).

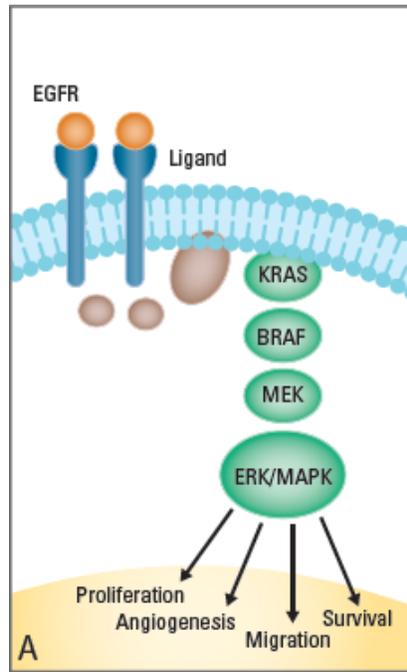


Fig.2 EGFR, una volta unito al suo ligando, dimerizza attivando il segnale della via delle MAPK ([www.clarientinc.com](http://www.clarientinc.com))

Contrariamente a molti tipi di tumori, nel cancro del colon-retto, le mutazioni nel dominio chinasi di EGFR sono rare. Al contrario è più frequente una polisomia nel cromosoma 7 o un'amplificazione nel *locus*, che quindi comporta una variazione del numero di copie del recettore.

Nonostante ciò, grazie a promettenti studi in vitro, sono stati sviluppati anticorpi monoclonali anti-EGFR (*Cetuximab* and *Panitumumab*) ed anche piccole molecole inibitrici del recettore (FIG.3).

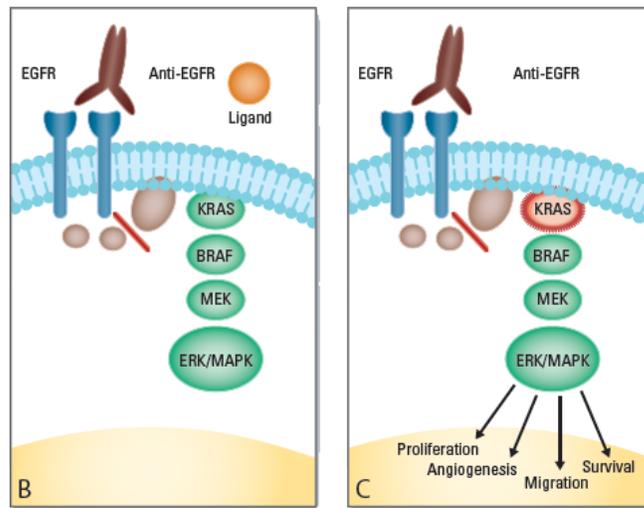


Fig.3 Meccanismo d'azione degli anticorpi monoclonali anti-EGFR. La cascata del segnale viene bloccata a monte, bloccando il legame di EGFR con i rispettivi ligandi (B). Se una delle proteine a valle, come KRAS, risulta iperattivata a causa di un'aberrazione genetica o una modificazione post-trasduzionale, la terapia anti-EGFR non avrà alcun effetto benefico sul paziente. (www.clarientinc.com)

Tra questi farmaci, ad oggi, gli anticorpi monoclonali sono stati approvati dal Food and Drug Administration (FDA) per la terapia dei pazienti affetti da CRC. Purtroppo solo il 20% dei pazienti affetti da CRC risponde a questo trattamento (TAB.2).

Regimen(s)	Study	n	Response KRAS WT (%)	P-value	PFS KRAS WT (months)	P-value
<i>Chemonaïve patients: 1st line</i>						
Cmab+FOLFOX vs FOLFOX	Bokemeyer et al (2009, 2010)	315	57.3 vs 34.0	0.0027	8.3 vs 7.2	0.0064
Cmab+FOLFIRI vs FOLFIRI	Van Cutsem et al (2009a,b, 2010)	1063	57.3 vs 39.7	<0.0001	9.9 vs 8.4	<0.0012
Pmab+FOLFOX vs FOLFOX	Douillard et al (2009)	1183	55.0 vs 48.0	NS	9.6 vs 8.0	0.02
<i>Chemorefractory patients: 2nd line</i>						
Pmab + FOLFIRI vs FOLFIRI	Peeters et al (2009)	1186	35 vs 10	<0.01	5.9 vs 3.9	0.004
<i>Chemorefractory patients: ≥2nd line</i>						
Cmab ± CT	Lièvre et al (2006)	30	40.7	—	—	—
Cmab ± CT	Di Fiore et al (2007)	59	27.9	—	5.5	—
Cmab ± CT	Lièvre et al (2008)	114	43.5	—	7.4	—
Cmab ± CT	De Roock et al (2008)	80	45.8	—	7.9	—
Cmab/Pmab ± CT	Benvenuti et al (2007)	48	31.2	—	—	—
<i>Chemorefractory patients: &gt; 3rd line</i>						
Cmab mono vs BSC	Karapetis et al (2008)	394	12.8 vs 0	—	3.7 vs 1.9	<0.001
Pmab mono vs BSC	Amado et al (2008)	427	17 vs 0	—	2.9 vs 1.7	<0.0001

Tab. 2 La tabella mostra gli studi effettuati negli anni per il trattamento con cetuximab e la percentuale di risposta alla terapia con il gene KRAS WT (non mutato). (Di Fiore, 2010)

La proteina K-RAS, a valle di EGFR, è considerata un fattore predittivo di risposta al trattamento con anticorpi monoclonali diretti contro EGFR, in quanto risulta essere mutata a livello genomico nel 40% dei casi di CRC.

Le mutazioni più frequenti avvengono a livello dei codoni 12 e 13, coinvolgendo il sito di legame del GTP e causando di conseguenza un'attivazione costitutiva della proteina e della cascata di segnale.

Le linee guida National Comprehensive Cancer Network (NCCN) raccomandano fortemente l'analisi dello stato mutazionale di K-RAS prima della somministrazione del trattamento anti-EGFR, mentre l'Agenzia Medica Europea approva l'uso di Cetuximab o Bevacizumab solo in pazienti che presentano KRAS nello stato *wild type*.

Questo è solo un esempio di come l'analisi del chinoma sia indispensabile a livello clinico per la scelta della terapia più adatta per ogni paziente.

Ovviamente l'analisi dei *pathways* proteomici ai fini della terapia mirata richiede

tecnologie che permettano lo studio del tessuto del paziente a livello proteomico.

## **2.6 Microdissezione Laser (LCM) e *Reverse Phase Protein Array* (RPPA)**

L'analisi morfologica delle cellule e del tessuto è sempre stata alla base per la diagnosi della malattia da parte del patologo. I tessuti, però, si presentano con una vasta eterogeneità a livello cellulare; infatti, una visualizzazione diretta al microscopio permette l'identificazione di cellule normali, tumorali, ma anche fibre stromali e linfociti.

Quest'eterogeneità tissutale, di facile identificazione per il patologo, può però confondere l'analisi molecolare, poiché è impossibile discernere quali cellule contribuiscono al segnale di un determinato lisato cellulare. Inoltre, a volte, le cellule d'interesse, come quelle epiteliali-tumorali, possono essere solo una bassa percentuale dell'intero campione. Di conseguenza è indispensabile usare una tecnica che sia capace di procurare una specifica sotto popolazione del tessuto. Questa è la microdissezione laser che permette, sotto la visualizzazione diretta del microscopio, l'arricchimento di una singola popolazione cellulare per evitare un segnale derivante dagli altri tipi cellulari.

Questa tecnologia usa un laser, infra-rosso (IR) o ultravioletto (UV), per tagliare le cellule di interesse. Queste sono poi trasferite tramite l'energia laser a un polimero termolabile, formando un composto polimero-cellula (FIG.4).

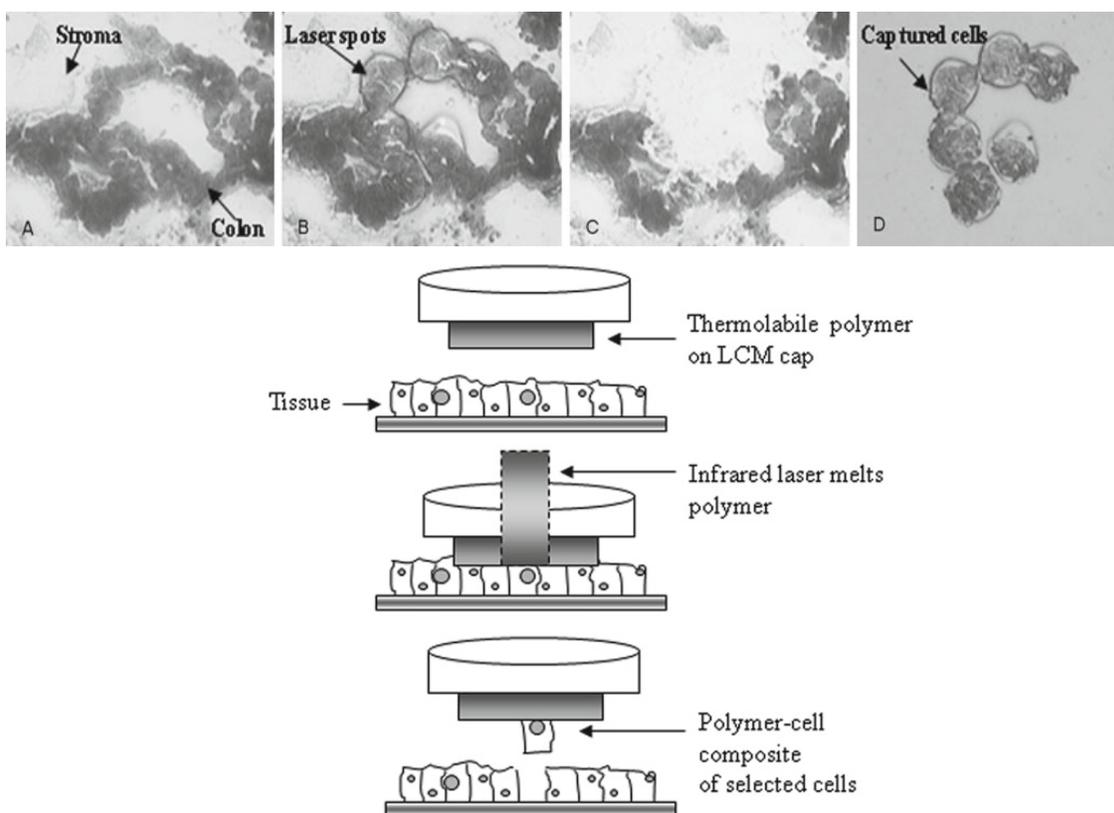


Fig. 4 Tecnica della microdissezione laser. Il cap, coperto dal polimero cattura le cellule di interesse al massaggio del laser. Le cellule risulteranno, poi adese al cap e pronte per essere lisate. (28)

A volte la popolazione di cellule maligne da analizzare è localizzata in una piccola area e può comprendere solo il 5% del volume totale del tessuto. Questo può causare un problema nell'analizzare la vasta gamma di proteine presente nel chinoma umano.

In generale, le tecnologie usate in precedenza per l'analisi proteomica, come l'elettroforesi bi-dimensionale (2D-E) o spettrometria di massa (MS), avevano significative limitazioni se applicate a un campione dalle dimensioni ridotte, come può essere una biopsia dove poche migliaia di cellule possono essere usate.

A questo scopo è stata sviluppata una nuova tecnica, *Reverse Phase Protein Array* (RPPA). Questa permette di superare la limitazione della quantità di campione riscontrata nelle altre tecniche, consentendo l'analisi di un lisato cellulare di soli pochi microlitri. Inoltre, grazie ad un'elevata sensibilità, ha il vantaggio di individuare analiti nell'ordine dei picogrammi all'interno di un lisato misto. L'RPPA oggi è diventata un potente mezzo di analisi per la scoperta di farmaci (*drug discovery*), per l'identificazione di biomarcatori, per l'analisi del profilo del segnale proteomico derivante da materiale cellulare, come quello microdissezionato (FIG.5).

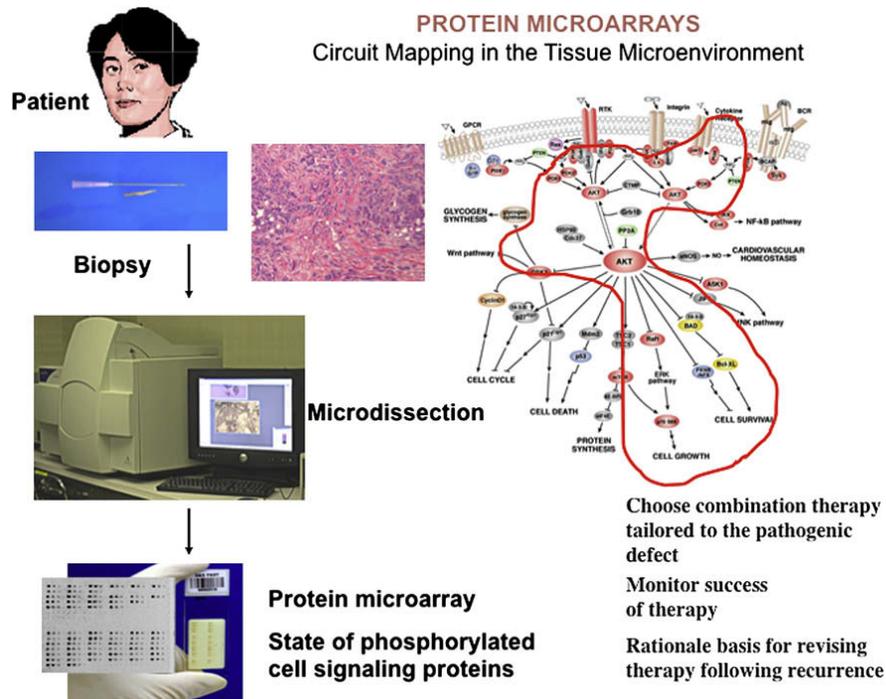


Fig. 5 *Workflow* per l'analisi dei pathway proteici. Questo prevede la microdissezione della biopsia del paziente, con arricchimento delle cellule tumorali, RPPA e seguente analisi dei pathways attivati per la scelta del trattamento personalizzato (Espina, 2009).

Un primo esempio di RPPA è stato il "*dot blot*", in cui un campione di proteine

veniva manualmente depositato su una membrana. Il dot blot prevedeva un lavoro manuale intensivo e poteva ospitare solo pochi campioni per volta. Con l'avanzamento della tecnologia e gli *arrayers robotici*, il processo si è migliorato e semplificato.

In breve, un RPPA comprende una serie di lisati cellulari o siero immobilizzati su un vetrino rivestito di nitrocellulosa. Quindi la molecola d'interesse viene poi rilevata, contemporaneamente in tutti i lisati, tramite un complesso anticorpo primario/anticorpo secondario con sistema di amplificazione.

Da questa particolarità deriva il nome "*Reverse*".

Infatti, nei *microarrays* classici, o a fase diretta (*Forward Phase Microarray, FPM*), i diversi anticorpi o altre molecole esca (*bait*) sono immobilizzati sulla matrice solida; quindi l'analita d'interesse si legherà alla molecola immobilizzata. La rivelazione del segnale avviene tramite marcatura dell'analita stesso o l'uso di un altro anticorpo (metodo *sandwich*).

Il termine *Reverse Phase Protein Array* fu coniato da Pawelwitz nel 2001.

Nel RPPA ogni spot contiene il lisato cellulare derivante del campione del paziente, che di solito è in duplicato o triplicato. Ogni array può contenere centinaia di diversi campioni, oltre a calibratori e controlli. Il tutto verrà analizzato con una classe di anticorpo diversa per ogni vetrino e il segnale verrà poi amplificato chimicamente (FIG 6)

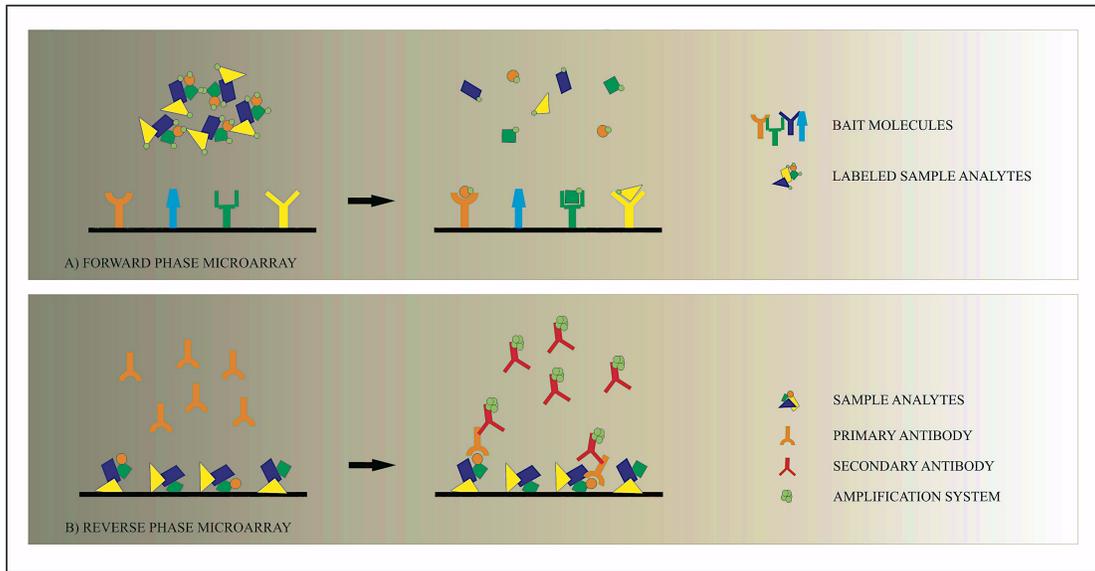


Fig.6 Differenza tra un microarray a fase diretta –forward- (A) e un a fase inversa –reverse- (B). Mentre nel primo caso gli anticorpi sono adesi sulla membrana, permettendo l’analisi di un solo campione per ogni array, nella RPPA ogni spot conterrà un diverso campione, e ogni array sarà analizzato per uno specifico anticorpo.

## 2.7 RPPA in clinica per il trattamento del mCRC

Diversi studi presentati dal gruppo di Petricoin (29, 31) hanno mostrato che il profilo chinamico del mCRC nel fegato è diverso rispetto a quello del tumore primario (FIG.7).

Per ogni paziente è stato microdissezionato materiale derivante dal tumore primario e dalla corrispettiva metastasi epatica.

Il risultato finale ha mostrato dei cambiamenti a livello del segnale proteico tra la lesione primaria e quella metastatica; questi potrebbero essere quindi influenzati dal microambiente dell’organo di riferimento. Di conseguenza è stato enfatizzato il bisogno di compiere l’analisi dei pathway molecolari dei tessuti metastatici quando si considera il trattamento dei pazienti con terapia biologica.

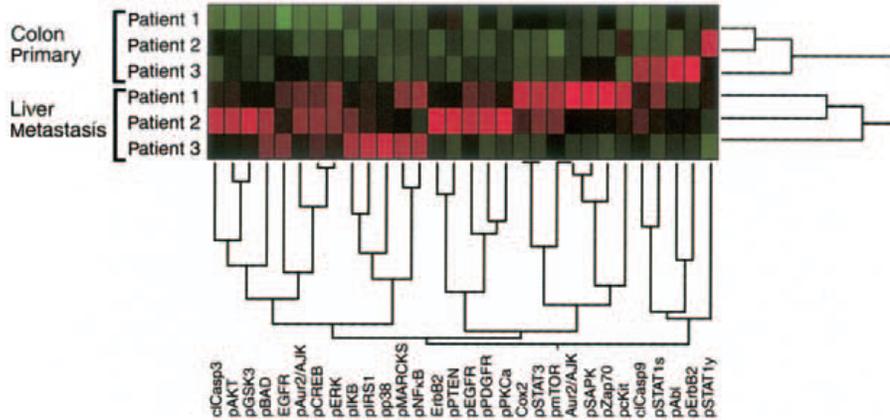


Fig.7 Cluster derivante dall'analisi dei dati di RPPA per uno studio comprendente tumore primario e rispettiva metastasi. I risultati mostrano una diversa attivazione proteica tra primario e metastasi (28).

Nel 2013, lo studio effettuato da Silvestri ha confermato, con un più ampio numero di campioni, questa netta differenza tra metastasi epatica e rispettivo tumore primario (30).

Questi studi hanno documentato quanto sia necessaria l'analisi della lesione metastatica e non solo del tumore primario. Un'indagine specifica delle metastasi può, infatti, portare a una terapia mirata alla lesione epatica e non genericamente alle cellule tumorali.

Considerando ciò, diversi trial clinici sono in atto.

Nel 2009, un trial di fase I/II, NITMEC (#NCT00867334), ha determinato la tollerabilità e sicurezza di Imatinib, inibitore di c-Kit e Abl, in combinazione con Panitumumab per il trattamento del cancro al colon-retto metastatizzante al fegato. I pazienti sono stati soggetti ad ago-biopsia prima e dopo la somministrazione della terapia, per valutare l'efficienza di Imatinib come singola terapia o in combinazione con Cetuximab, ma anche per determinare se per mezzo della piattaforma LCM e RPPA fosse possibile prevedere la risposta dei pazienti a questo trattamento.

## **3. Scopo del lavoro**

I lavori presentati dal gruppo Petricoin (29, 30, 31), così come lo studio clinico NITMEC hanno portato alla luce la peculiarità molecolare della lesione metastatica al fegato, la sua differenza a livello proteico rispetto al tumore primario e l'utilità nell'uso di LCM e RPPA per la valutazione della terapia.

Alla base della prima parte del mio studio vi è la consapevolezza che l'unica terapia veramente efficace per la cura delle metastasi epatiche è la resezione della stessa.

Come accennato in precedenza, non tutte le metastasi epatiche sono resecabili.

I canoni di resecabilità sono definiti a livello chirurgico e a volte la valutazione può avere carattere soggettivo.

Lo scopo di questo lavoro è di:

-Testare l'uso della piattaforma LCM e RPPA per la valutazione di un trial clinico.

-Investigare i networks delle metastasi epatiche derivate da CRC, al fine di identificare biomarcatori che ne possano accertare la resecabilità o meno, usando le tecniche LCM e RPPA;

-Formulare delle ipotesi iniziali di quali farmaci potrebbero essere considerati per futuri trial clinici.

# **4. Materiali e Metodi**

## 4.1 Pazienti

Per valutare l'uso della piattaforma combinata LCM e RPPA, sono stati presi in considerazione i primi 3 pazienti arruolati in uno studio clinico di fase 1 (*clinical trial* #NCT01871311). I pazienti sono stati arruolati nello studio clinico seguendo i successivi criteri di inclusione: 1) presenza di CRC ricorrente o metastatico, con genotipo Kras non mutato (wild type), o carcinoma della testa e del collo e 2) presenza di progressione dopo la terapia standard.

Inoltre, tra le caratteristiche è stata accettata la precedentemente somministrazione di Cetuximab o Panitumumab. Al contrario sono stati esclusi pazienti precedentemente sottoposti al trattamento con Nilotinib, Desatinib o Imatinib.

I pazienti sono stati sottoposti a prelievo di agobiopsia prima e dopo la somministrazione del trattamento.

I campioni sono stati crio-preserved in OCT nei 5 minuti seguenti la raccolta, al fine di garantire la stabilità del fosfo-segnale. Essi sono stati poi conservati a -80°C fino al processamento.

Al fine di investigare i *networks* delle metastasi epatiche derivate da CRC, un totale di 39 metastasi epatiche derivanti da CRC sono state raccolte presso il Centro di Riferimento Oncologico di Aviano (14 biopsie incisionali), Istituto Regina Elena in Roma (10 biopsie incisionali), Istituto Nazionale Tumori, Milano (10 biopsie incisionali) e l'Istituto Europeo Oncologico, Milano (5 ago biopsie) (Tab.6)

Collecting site	Type of biopsies	Biopsies collected	Biopsies processed	Non-resectable lesions
CRO, Aviano	Incisional	14	10	6
IRE, Rome	Incisional	10	10	0
INT, Milan	Incisional	10	6	6
IEO, Milan	Needle	5	2	2

Tab.6 Centri di raccolta e numero di biopsie collezionate e processate

I campioni sono stati raccolti e congelati nei 20 minuti dopo l'intervento chirurgico, tramite esposizione ai fumi di azoto e quindi inclusi in OCT. Essi sono stati poi conservati a -80°C fino al processamento. L'uso di tessuti congelati ha molti vantaggi rispetto a campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE). Il campione congelato, infatti, riflette in modo più accurato l'effettivo stato della malattia e inoltre la qualità delle proteine estratte da materiale congelato è migliore rispetto a quella di proteine derivanti da tessuti FFPE.

Dopo la valutazione della colorazione con ematossilina/eosina, solo 28 sono risultate idonee al processamento.

Le restanti 11 biopsie presentavano una scarsa qualità dovuta a un'errata inclusione in OCT (soluzione crio-preservante), o una troppo bassa percentuale di cellule epiteliali.

## 4.2 Microdissezione Laser

In questo studio lo strumento utilizzato è stato Arcturus XT (FIG.8).

Ogni campione è stato soggetto a microdissezione laser (LCM) sotto la guida di un medico patologo certificato, al fine di ottenere un arricchimento (>90%) di cellule epiteliali tumorali.



Fig.8 Arcturus XT ([www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com))

#### **4.2.1 Sezionamento e colorazione con ematossilina**

Le sezioni di tessuto sono state tagliate con uno spessore di 8  $\mu\text{m}$  in un criostato, mantenendo una temperatura di  $-20^{\circ}\text{C}$  e posizionate su vetrini da microscopio non carichi positivamente.

I vetrini completi sono conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino a processamento, così come pure il rimanente tessuto incluso in OCT.

Per ogni campione, un vetrino è colorato con Ematossilina/Eosina al fine di confermare la diagnosi patologica ed essere certi che il frammento analizzato contenesse cellule tumorali.

I vetrini sono poi fissati in 70% etanolo, colorati con ematossilina e deidratati in 70, 95 e 100% etanolo, e xylene. Nelle soluzioni di 70% etanolo,  $\text{H}_2\text{O}$  deionizzata, ematossilina e *Scott's tap water substitute*, vengono aggiunti inibitori delle proteasi (Complete<sup>TM</sup> Mini protease inhibitor tablets -Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA).

#### **4.2.2. Microdissezione Laser**

La microdissezione è effettuata senza olio per immersione, in modo da prevenire la rifrazione della luce dall'immagine.

Il processo di microdissezione consiste di 5 steps:

1) Caricamento dei vetrini e LCM caps (CapSure®Macro LCM Caps, Arcturus, Mountain View, CA, USA), 2) localizzazione delle cellule d'interesse, 3) posizionamento del cap sul vetrino. A questo punto, è molto importante testare la potenza del laser e la dimensione dello spot provocato al laser. In questo studio, è stato usato uno spot dal diametro di 22  $\mu\text{m}$ , adatto alle dimensioni delle cellule epiteliali di colon (FIG.9). 4) Selezione delle cellule d'interesse tramite lo schermo *touch-screen*, e 5) finale cattura delle cellule epiteliali.

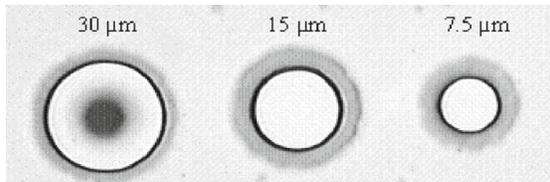


Fig.9 La dimensione dello spot e la potenza del laser sono fattori molto importanti durante la microdissezione. La presenza di un cerchio nero interno e la perdita dell'alone intorno dimostrano un'eccessiva potenza del laser (28).

Il cap contenente le cellule è inserito in una eppendorf da 0.5 ml e posto a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

In questo studio, una media di 5000 spot sono stati raccolti per ogni campione.

Una volta raccolto il numero di shots desiderato, le cellule vengono sottoposte a lisi per l'estrazione delle proteine.

### 4.3 Lisi cellulare ed estrazione proteica

Il buffer ottimale per l'estrazione di proteine dalle cellule di tessuto raccolte con la microdissezione laser necessita di un detergente, un agente denaturante e un buffer.

Questo è un buffer di estrazione con un livello di denaturazione medio, ideale per la solubilizzazione di proteine cellulari.

Contiene:

- 2-mercaptoetanol (BME) (2.5%)
- 2X Tris-Glycine SDS Sample Buffer (47.5%)
- TPER (50%)

I caps appartenenti allo stesso campione, sono stati posizionati con la superficie verso l'alto, dove è stato aggiunto il buffer di lisi.

In questo studio 5000 *shots* sono stati lisati in 5  $\mu$ l di buffer, con una concentrazione di 1000 cellule/ $\mu$ l di buffer.

I caps sono incubati per un totale di 5 minuti e infine il lisato è raccolto in una nuova eppendorf con tappo a vite (FIG.10).

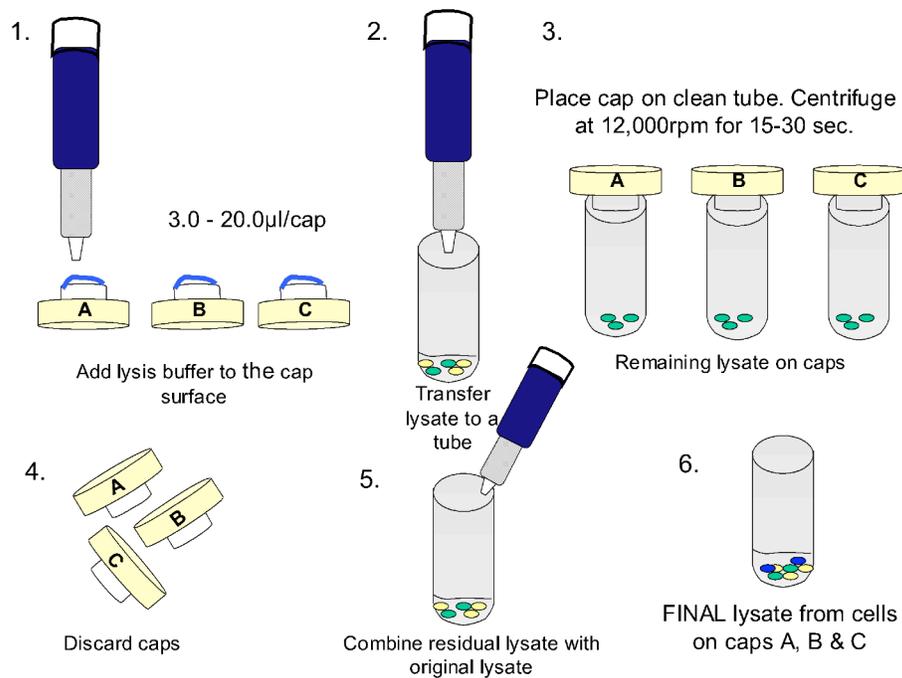


Fig. 10 Passaggi della lisi cellulare ed estrazione proteica dai caps contenenti le cellule microdissezzate

I lisati sono stati centrifugati per 30 secondi a 12.000 rpm e infine riscaldati a 100°C per una completa denaturazione delle proteine.

A questo punto, i campioni possono essere conservati a -20°C fino al successivo passaggio, il trasferimento dei campioni sul vetrino rivestito di nitrocellulosa.

#### 4.4 Deposizione delle Proteine su supporto (*Printing*)

Per il printing dei campioni su vetrino rivestito di nitrocellulosa è stato usato lo strumento Aushon 2470 arrayer (FIG.11).



Fig. 11 Aushon Arrayer 2470 ([www.Aushon.com](http://www.Aushon.com), Aushon BioSystem, Billerica, MA)

Aushon 2470 è una piattaforma automatizzata che permette la deposizione dei campioni sul substrato di nitrocellulosa in modo accurato e preciso tramite dei “pin”, che trasferiscono una quantità di lisato nell’ordine del nanolitro, determinando la formazione di uno spot.

I pin sono progettati con la tecnologia di deposizione *soft-touch* e si trovano in una camera di printing isolata dall'ambiente esterno (FIG.12).

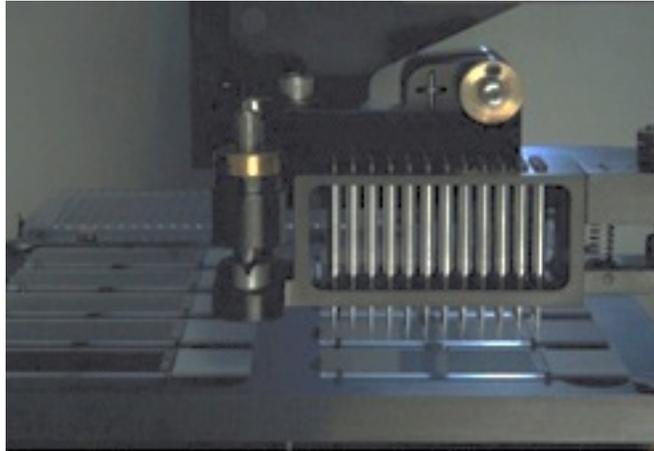


Fig. 12 camera di printing, contenente i pin, isolata dall'ambiente esterno ([www.Aushon.com](http://www.Aushon.com), Aushon BioSystem, Billerica, MA)

All'interno della camera di printing, venti pin sono assemblati insieme in un formato 4X5, divisi tra di loro di uno spazio di 4.5 mm. Per questo studio sono stati usati pin del diametro di 185  $\mu\text{m}$ .

La velocità nella deposizione del lisato e la presenza di umidità interna allo strumento eliminano il problema dell'evaporazione del campione, incrementando quindi la qualità dell'array.

Per effettuare il printing, i campioni vengono caricati su una piastra da 384 well, in un ordine preciso, stabilito in precedenza, in base al risultato finale desiderato.

La testa di printing si muove solo lungo l'asse Z, mentre la piastra si muove sull'asse X e Y.

I vetrini rivestiti da membrana di nitrocellulosa sono posizionati su una speciale piastra e numerati in ordine crescente.

La durata del printing varia dal numero di vetrini usati, che corrisponde al numero di anticorpi (*endpoints*) che si vogliono analizzare.

In questo caso sono stati usati 20 vetrini, considerando anche i vetrini per la valutazione delle proteine totali e i negativi.

In ogni vetrino vengono depositati dei calibratori, o controlli positivi, con diluizioni scalari (HeLa, HeLa+Pervanadate, Jurkat+Calyculin) e una diluizione scalare di BSA.

Ogni campione è depositato 3 volte nello stesso punto e in triplicato. Depositare il campione in triplicato è indispensabile durante l'analisi finale, in quanto permette la valutazione del coefficiente di variazione (CV) tra i 3 punti, riducendo eventuali errori o artefatti causati da un unico punto.

## **4.5 Rivelazione delle Proteine mediante Immunostaining** ***(Protein Staining)***

Prima di sottoporre i campioni all'immunostaining, i siti di legame aspecifici sulla membrana di nitrocellulosa devono essere bloccati.

Il blocco avviene in un processo diviso in due parti principali:

- ❖ Recupero dell'antigene tramite un reagente di *stripping* di media forza (Re-blot buffer) per 15 min, seguito da due lavaggi in PBS.
- ❖ Blocco dei legami aspecifici con I-Block per almeno un'ora.

A questo punto i vetrini possono essere sottoposti al processo di *staining*.

Lo *staining* avviene con DAKO autostainer (FIG.13).



Fig 13 DAKO autostainer

Questo strumento permette il processamento automatico dei vetrini.

Esso è dotato di un programma che permette l'uso di diversi protocolli. Si possono processare un massimo di 36 vetrini durante lo stesso ciclo.

I singoli vetrini possono essere programmati per ricevere anticorpi diversi.

Il programma prevede che ogni vetrino sia trattato con:

1. Blocco di  $H_2O_2$  endogena
2. Avidina per il blocco della biotina endogena
3. Biotina per il blocco dell'avidina endogena
4. *Protein block* è un reagente pronto all'uso che blocca i legami aspecifici sulla membrana di nitrocellulosa
5. Anticorpo primario prescelto (endpoint)
6. Anticorpo secondario
7. SABC- complesso streptavidina-biotina
8. Reagente di amplificazione, responsabile dell'amplificazione del segnale
9. LI-COR IRDye 680, usato per la rivelazione del segnale

LI-COR IRDye 680 è un fluoroforo che emette nel range del NIR (vicino infrarosso-near infrared), con un'assorbanza massima di 683 nm e un'emissione massima di 710 nm.

Il metodo della fluorescenza permette all'operatore di analizzare segnali molto diversi tra loro presenti sullo stesso vetrino.

Per ogni ciclo di immunostaining è presente un vetrino negativo, processato esclusivamente con anticorpo secondario.

In questo studio sono stati usati 16 endpoints per il primo set e 160 per il secondo, scelti considerando i maggiori pathways coinvolti nello sviluppo e progressione del tumore.

## **4.6 Determinazione delle proteine totali**

Il processo di normalizzazione del segnale d'intensità durante l'analisi dei dati è basato sui valori di proteine totali. La valutazione della possibile variazione di proteine totali nei campioni è importante se si considera il volume finale dei lisati che sono usati per la deposizione su vetrino. Infatti, essendo il volume molto ridotto e considerando che il numero di array usati può variare da 10 a 100, è molto frequente assistere a fenomeni di evaporazione del buffer di lisi. Questo evento comporta, quindi, una variazione di proteine totali, che non è costante per ogni campione.

Determinare questa variazione permette la comparazione di campioni con differente concentrazione proteica.

La valutazione delle proteine totali viene eseguita tramite *Sypro Ruby blot stain (Molecular Probes)*. Essa è una colorazione permanente delle proteine, rivelabile tramite fluorescenza, con una lunghezza d'onda in eccitazione di 300 o 480 nm e un pico di emissione a 618 nm.

La colorazione è composta di un complesso di rutenio ed è fotostabile nel tempo.

Prima della colorazione, i vetrini sono incubati con una soluzione fissativa (7% acido acetico e 10% metanolo, diluiti in acqua deionizzata) per 15 min su piastra rotante. A seguito di 4 lavaggi da 5 minuti ciascuno con acqua deionizzata, il vetrino è incubato con *Sypro Ruby blot stain* per un minimo di 30 minuti, protetto dalla luce, al fine di evitare una riduzione dell'intensità del segnale. Dopo 4 lavaggi da 1 minuto con acqua deionizzata, il vetrino viene fatto asciugare lontano da sorgenti di luce. Le immagini sono acquisite tramite uno scanner laser (Power Scanner™, Tecan) e l'analisi del segnale viene effettuata tramite il software MicroVigene 5.999 (Vigentech Carlisle, MA, USA).

## **4.7 Analisi dei dati**

### **4.7.1 Determinazione dell'intensità degli spot**

Dopo la colorazione con gli anticorpi, l'immagine dei vetrini viene acquisita con PowerScanner™, Tecan, e analizzata con il software MicroVigene 5.999 (Vigenetech, Carlisle, MA, USA), il quale identifica i singoli spot corrispondenti ai singoli campioni, sottrae il valore del *background* usando il vetrino negativo, effettua una media tra i tre replicati e normalizza ogni campione per il corrispettivo valore verificato dall'analisi delle proteine totali.

### **4.7.2 Analisi dei cluster gerarchici (Two-way unsupervised cluster analysis)**

La presenza di gruppi di campioni con profilo simile è stata analizzata con JMP 5.1 software (SAS, Cary, NC, USA). La sequenza del cluster è visualizzata con l'aiuto del dendrogramma. Nelle nostre heat map i campioni (variabili) sono raggruppati sulla

base dell'intensità degli endpoints (caratteristiche delle variabili), ottenendo una mappa dove campioni della stessa famiglia sono caratterizzati da un simile profilo dei pathways. Questo tipo di analisi mostra le differenze tra i profili dei campioni usando un sistema colorimetrico: il rosso indica un relativo alto livello di attivazione proteica o espressione, il nero un valore medio e il verde un relativo valore basso di attivazione o espressione proteica.

### **4.7.3 Analisi statistica**

Per lo studio 1, la valutazione dei pathway prima e dopo la terapia è stata effettuata tramite analisi del *fold increase* dei valori di intensità del segnale ottenuti tramite l'analisi con il software MicroVigene 5.999.

In breve, per ogni endpoint considerato, entrambi i valori corrispondenti alla biopsia pre e post-trattamento sono stati normalizzati sul valore della biopsia pre-trattamento. Al valore ottenuto è stato sottratto 1, per meglio visualizzare la differenza delle due biopsie.

Di conseguenza le biopsie collezionate prima della terapia saranno rappresentate da un valore 0 per tutti gli endpoint, mentre quelle collezionate dopo il trattamento mostreranno l'effettivo valore di *fold increase*.

Per lo studio 2, la comparazione delle medie dei valori di intensità tra metastasi resecabili e metastasi non resecabili è stata effettuata tramite test non parametrico. I grafici sono stati rappresentati tramite GraphPad 5.02.

# 5. Risultati

## 5.1 La clusterizzazione delle biopsie rivela raggruppamenti “paziente-specifici”

In questo studio sono state analizzate biopsie collezionate dai primi pazienti arruolati nel trial clinico #NCT01871311 (TAB.3).

SAMPLE	TYPE	PRIMARY	MET	COLLECTED/FIXED/STORAGE
2013_0039_01	Bx1-PreTX	COLON	LUNG	10:48/10:49/13:30
2013_0039_01	Bx2-C1D8	COLON	LUNG	9:23/9:28/11:35
2013_0039_02	Bx1-PreTX	COLON	LIVER	14:39/14:40/15:00
2013_0039_02	Bx2-C1D8	COLON	LIVER	11:12/11:13/11:36
2013_0039_03	Bx1-PreTX	COLON	OMENTUM	12:07/12:08/12:20
2013_0039_03	Bx2-C1D8	COLON	OMENTUM	12:05/12:06/12:30

Tab.3 Elenco dei campioni processati con relativa ora di raccolta e inclusione in OCT

I pazienti presentavano lesioni metastatiche da CRC a polmone (paziente 1), fegato (paziente 2) e omento (paziente 3).

Questo trial clinico è stato disegnato per valutare la massima dose tollerabile di Nilotinib (inibitore di BCR-ABL Kinase) e Cetuximab in pazienti KRAS wild type, che quindi possono ricevere Cetuximab secondo le linee guida NCCN.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a un ciclo di Nilotinib per 28 giorni con due somministrazioni giornaliere e Cetuximab 400 mg/m<sup>2</sup> il primo giorno e poi 250 mg/m<sup>2</sup> con somministrazione settimanale. Per Nilotinib sono state usate 3 diverse concentrazioni (TAB.4).

Nilotinib Concentration	Somministrazione
200 mg (Dose level 1)	Once a day
200 mg (Dose level 1)	Twice a day
300 mg (Dose level 2)	Twice a day

Tab. 4 concentrazioni crescenti usate nella valutazione di tollerabilità di Nilotinib

Ogni ciclo è durato 4 settimane e settimanalmente sono stati valutati i livelli di tossicità.

La biopsia dopo il trattamento è stata collezionata dopo la fine del ciclo.

La mia parte del progetto ha previsto il processamento delle biopsie raccolte prima e dopo il ciclo di trattamento.

Tra le 6 biopsie collezionate e processate, solo 5 hanno rivelato una quantità di proteina adeguata per l'analisi.

La scelta degli endpoints da valutare è stata effettuata considerando la terapia a cui i pazienti sono stati sottoposti e i maggiori pathway implicati nei processi di tumorigenesi.

Di conseguenza sono stati valutati i targets di Nilotinib (c-ABL-T735, cKIT703 e PDGFR751) così come EGFR in due diversi siti di fosforilazione (Y1173 e Y1068) e erbB2/HER2-Y1248 per il Cetuximab.

Sono poi state considerate le principali proteine coinvolte nei pathways di MAPK (BRAF S445, ERK1/2 S202/204, MEK1/2 S217/221, ELK S383) e mTOR (mTOR S2448, AKT S473, p70S6 Kinase T389, S6RibosomalProtein S240/244).

L'attenzione si è concentrata sulle forme fosforilate delle proteine considerate, per analizzare il livello di attivazione dei pathways.

Il cluster gerarchico delle 5 biopsie derivanti dai 3 pazienti ha mostrato un raggruppamento “paziente specifico” (FIG. 14)

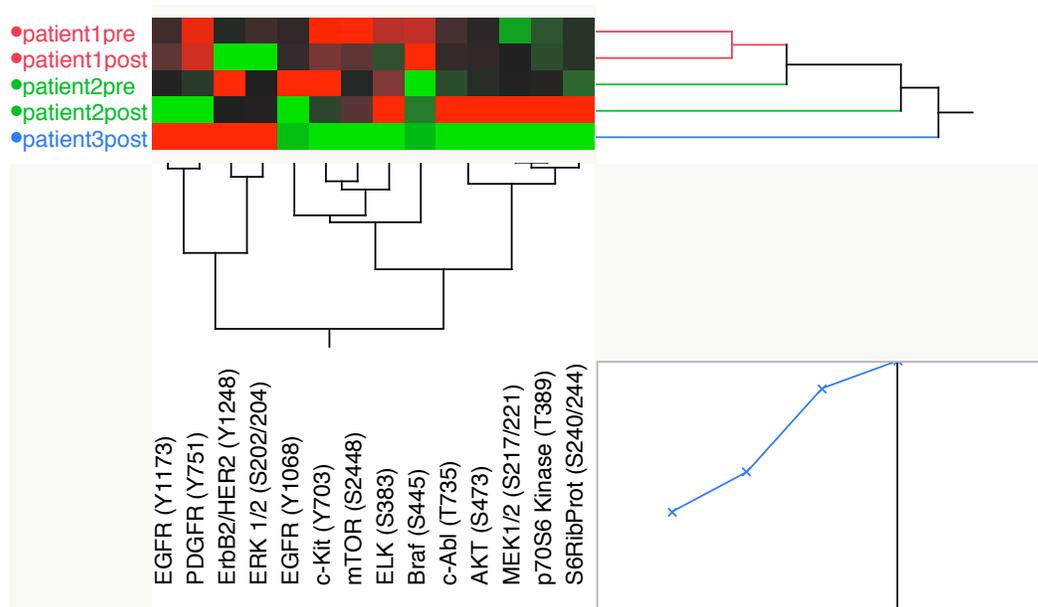


Fig.14 Clusterizzazione gerarchica delle biopsie raccolte durante il trial clinico, prima e dopo il trattamento. Lo stesso colore è stato attribuito a biopsie derivanti dallo stesso paziente. Rosso indica un relativo alto livello di attivazione proteica o espressione, il nero un valore medio e il verde un relativo valore basso di attivazione o espressione proteica.

## 5.2 L'analisi del *fold increase* tra biopsia pre e post-trattamento mostra i meccanismi di resistenza al trattamento.

Per valutare la risposta al trattamento è stato determinato il *fold increase* tra il valore del segnale della biopsia raccolta prima e quella raccolta dopo il trattamento per i pazienti 1 e 2.

Le figure 15 e 16 rappresentano la differenza di intensità del segnale tra biopsia pre trattamento (rappresentata dal valore standard 0) e la biopsia post trattamento.

Dalle figure si deduce che i due pazienti una tendenza di attivazione /disattivazione dei pathways considerati molto diversa tra loro.

Si può notare, infatti, che nella biopsia post trattamento del paziente 1, i valori delle proteine considerate differiscono non più del 10-20% rispetto ai valori della biopsia raccolta prima del trattamento.

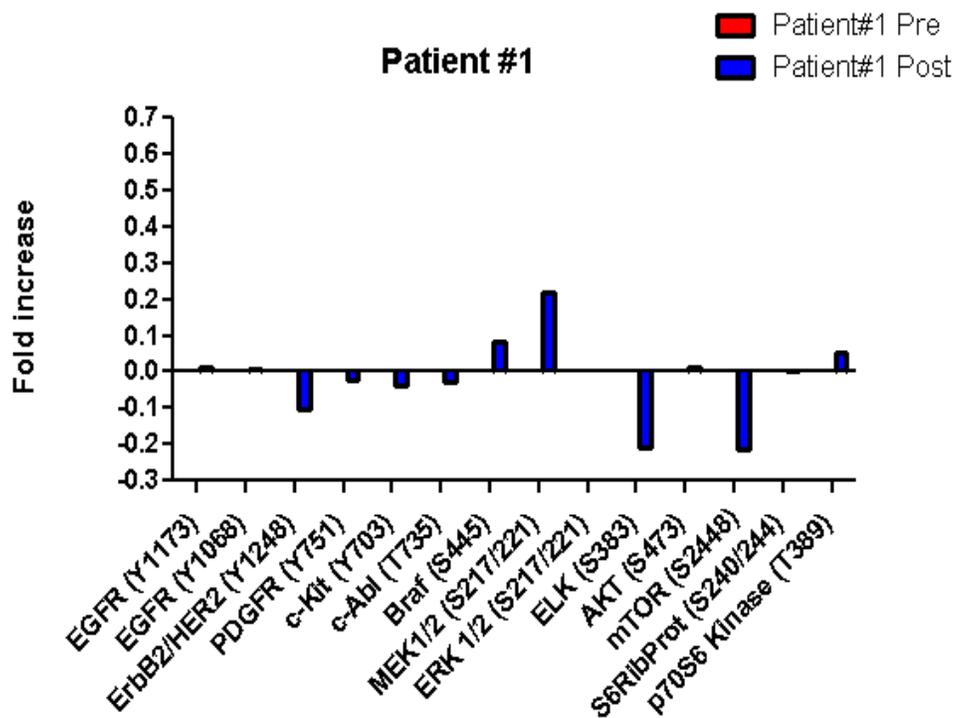


Fig.15 Rappresentazione del fold increase della biopsia post-trattamento rispetto alla biopsia pre-trattamento nel paziente#1. I valori della biopsia pre terapia sono usati per la normalizzazione e assumono il valore 0.

I grafici, infatti, mostrano una riduzione dei valori di fosforilazione di erbB2/HER2 del 10%, e di ELK ed mTOR rispettivamente del 20% e 21%.

Al contrario MEK sembra presentare un aumento del segnale di fosforilazione del 21% dopo la terapia.

Gli altri endpoints mantengono un segnale di fosforilazione abbastanza costante durante il trattamento.

Per quanto riguarda il paziente 2 si può osservare che la biopsia post trattamento ha un decremento del segnale di fosforilazione per i target di Cetuximab, e per alcuni targets di Nilotinib.

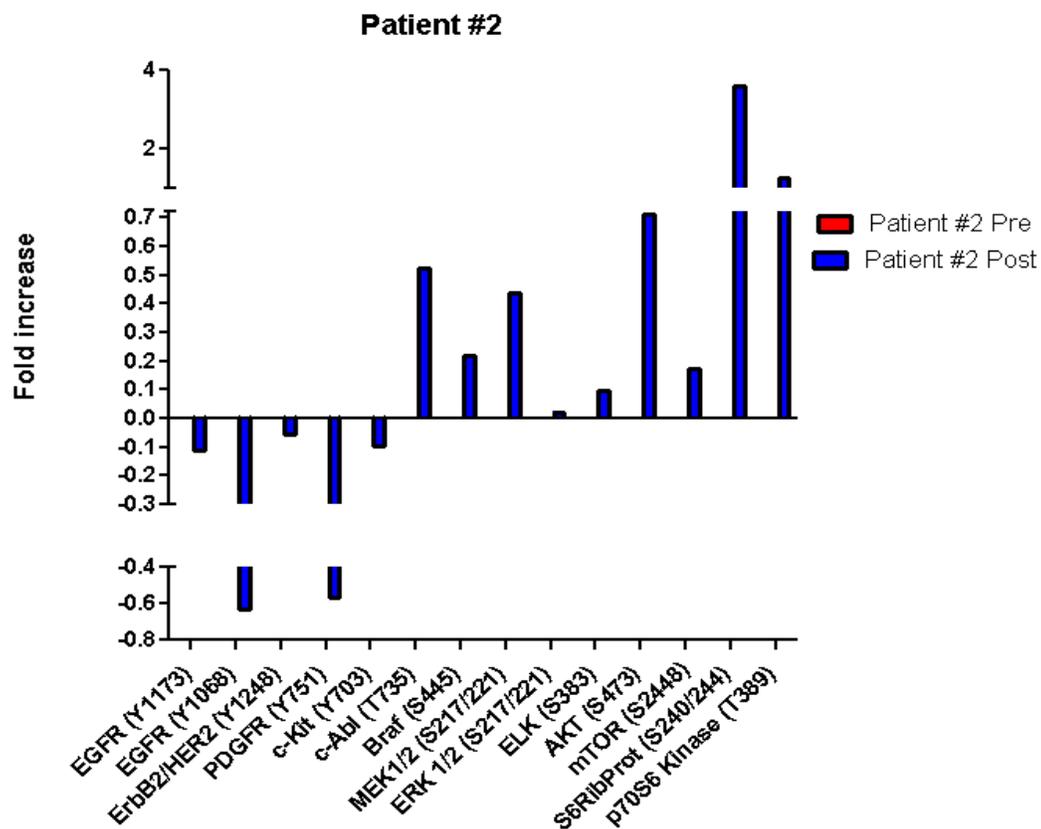


Fig. 18 Rappresentazione del fold increase della biopsia post-trattamento rispetto alla biopsia pre-trattamento nel paziente#1. I valori della biopsia pre terapia sono usati per la normalizzazione e assumono il valore 0.

Dal grafico si osserva che EGFR Y1173 presenta una diminuzione del segnale del 10% rispetto alla biopsia pre-trattamento, mentre l'altro sito di fosforilazione (Y1068) ha un decremento che raggiunge il 63%.

Un valore simile è riscontrato per la variazione del recettore PDGFR, mentre cABL, target di Nilotinib, mostra un aumento del valore della fosforilazione del 52%.

Tutti gli altri endpoints consideranti esibiscono un livello di fosforilazione più alto nella biopsia post trattamento, con punti massimi di fold increase che raggiungono lo 0.71 per la fosforilazione di AKT, e 3.5 e 1.27 rispettivamente per S6RibosomalProtein e p70S6Kinase.

La differenza mostrata nell'attivazione dei pathways dei due pazienti è molto importante se si considera il loro diverso *outcome*.

Infatti, mentre il paziente 1 ha mostrato una risposta al trattamento, il paziente 2 ha attivato un meccanismo di resistenza ad esso e di conseguenza non ha manifestato nessun miglioramento nell'esito della malattia dopo la fine del ciclo terapeutico.

Mediante quest'analisi è stato possibile confermare l'importanza della piattaforma LCM /RPPA nei trial clinici.

Di conseguenza, abbiamo utilizzato questa tecnica al fine di investigare i *networks* delle metastasi epatiche derivate da CRC, per identificare biomarcatori che ne possano accertare la resecabilità o meno, e valutare la presenza di eventuali proteine bersaglio per una nuova combinazione terapeutica.

## 5.3 La resecabilità di una metastasi epatica può essere determinata dal profilo proteomico

Lo studio iniziale comprendeva 39 biopsie derivanti da pazienti affetti da metastasi epatica da cancro del colon retto. Dal totale iniziale, solo 28 campioni sono stati processati con LCM e RPPA.

	CODE	SITE PRIMARY TUMOR	T	N	M	METS Synchronous (S) or Metachronous (M)	Chemotherapy for Primary	Neo-adjuvant Radio (RT) or Chemiotherapy (CT) for primary	Chemotherapy for Metastases	RESECTABLE Liver Metastasis (YES or NO)	Tipo di intervento (metastasectomia / biopsia)
Centro Riferimento Oncologico, AVIANO	207101	sigma	1	0	0	M	NO	NO	NO	YES	Metastasectomia
	210812	caecum	4	2	1	S	NO	NO	NO	NO	Biopsia
	211345	transverse colon	3	2	1	S	NO	NO	NO	NO	Biopsia
	213418	low rectum	3	2	1	S	NO	RT	NO	YES	Metastasectomia
	215527	ascending colon	3	1	1	S	NO	NO	NO	NO	Biopsia
	216323	sigma, high rectum	3	1	1	S	NO	NO	NO	NO	Biopsia
	216606	middle rectum	2	0	0	M	NO	RT/CT	NO	YES	Metastasectomia
	218942	high rectum	3	1	1	S	NO	RT	NO	NO	Biopsia
	219655	sigma	1	X	1	S	NO	NO	NO	NO	Biopsia
221228	sigma	4	1	1	S	NO	NO	NO	YES	Metastasectomia	
ISTITUTO REGINA ELENA, ROMA	IRE1	adk sigma	4a	2b	1a		NO	NO	NO	YES	Metastasectomia
	IRE2	adk sigma	3	2a	x	M	NO	NO	NO	YES	Metastasectomia
	IRE3	colon				M	NO	NO	NO	YES	Metastasectomia
	IRE4	k sigma	3	0	1a	S	NO	NO	NO	YES	Metastasectomia
	IRE5	colon dx	3	2b	1	S	NO	NO	NO	YES	Metastasectomia
	IRE6	k sigma	3	1a	1a	S	NO	NO	NO	YES	Metastasectomia
	IRE7	k sigma	4a	2b	1a	S	NO	NO	NO	YES	Metastasectomia
	IRE8	colon dx	3	1	1	S	NO	NO	NO	YES	Metastasectomia
	IRE9	colon dx	3	2b	1	S	NO	NO	NO	YES	Metastasectomia
	IRE10	sigma			1	M			NO	YES	Metastasectomia
ISTITUTO NAZIONALE TUMORI, MILANO	2111	proximal colon	3	2b	1a	S	NO	NO		NO	Biopsia
	2211	rectum	3	1a	1a	S	NO	NO	YES adiuvante	NO	Biopsia
	2311	rectum	3	1			NO	NO		NO	Biopsia
	2611	left colon	4a	2	1a	S	NO	NO	YES adiuvante	NO	Biopsia
	2711	sigmoid	3	2b	1a	S	NO	NO	YES adiuvante	NO	Biopsia
	2911	proximal colon	4a	1b	1a	S	NO	NO	YES adiuvante	NO	Biopsia
	21011	proximal colon	4a	2b	1a	S	NO	NO	YES adiuvante	NO	Biopsia
ISTITUTO EUROPEO ONCOLOGICO, MILANO	1	colon dx	pT3	pN1	1	S	NO	NO	YES adiuvante	NO	Biopsia
	2	colic flexure left	pT4b	pN1b	1	S	NO	NO	YES adiuvante	NO	Biopsia

Tab7. Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti analizzati. In verde, i pazienti che hanno ricevuto trattamento per il tumore primario e quindi esclusi dall'analisi.

Per l'analisi finale dei dati sono stati considerati pazienti che non avevano ricevuto chemio e/o radioterapia per il tumore primario (TAB.7).

Questi pazienti sono stati esclusi dall'analisi poiché il trattamento chemio/ radio terapeutico avrebbe potuto modificare il profilo proteomico delle cellule tumorali.

La valutazione dei livelli di espressione e fosforilazione delle proteine è servita per capire se alla base della resecabilità di una metastasi epatica ci sia, non solo la valutazione chirurgica, ma anche una chiave nei processi di trasduzione del segnale che rende la lesione resecabile o meno.

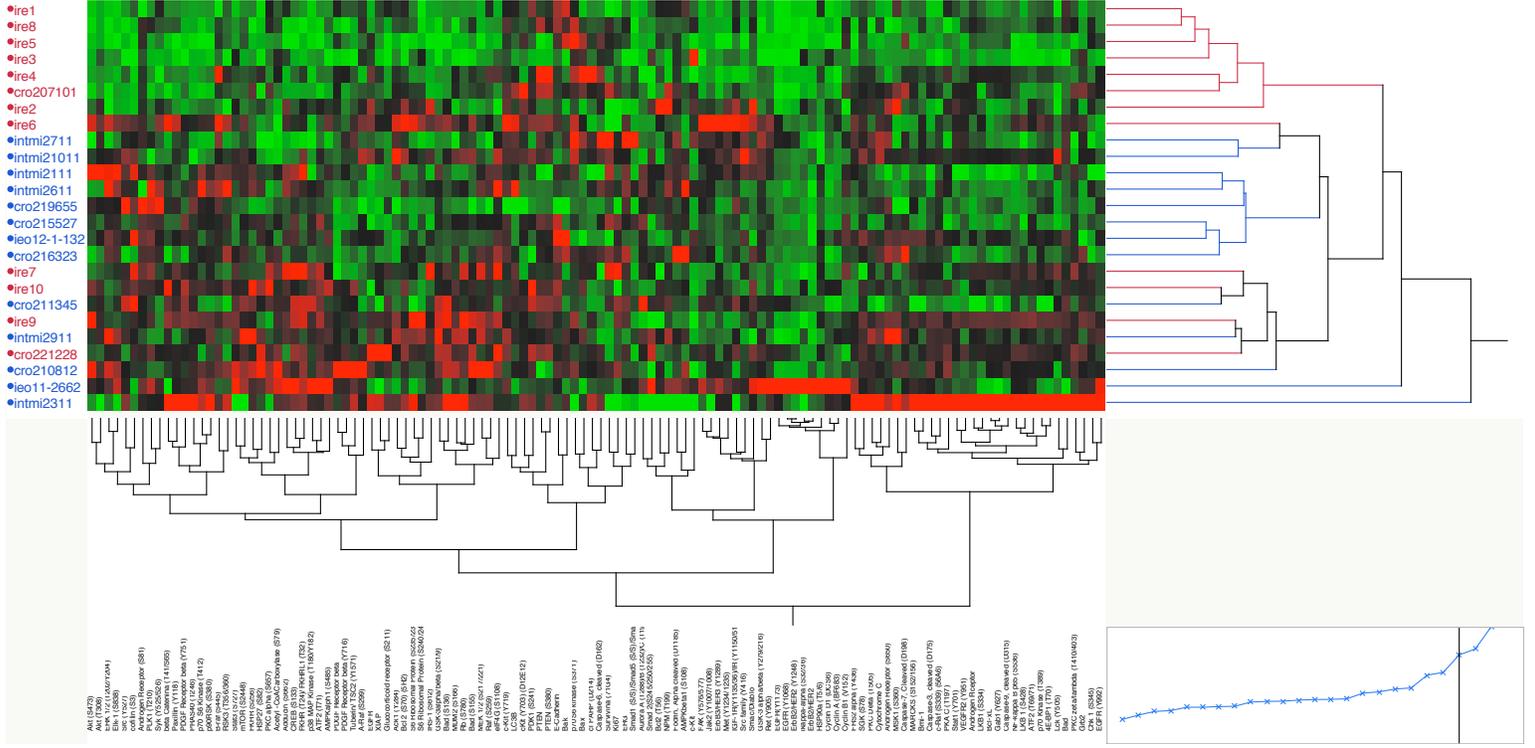
A tale scopo, si è valutato se le lesioni resecabili avessero un profilo proteomico diverso da quello delle lesioni definite non resecabili.

I campioni sono stati sottoposti a immunostaining con 160 diversi anticorpi, ma solo 121 hanno mostrato valori nel *range* dei calibratori.

Gli altri sono stati esclusi dall'analisi.

È stato usato quindi il cluster gerarchico effettuato con il programma JMP tramite valutazione di un'*heatmap* (FIG. 19).

A



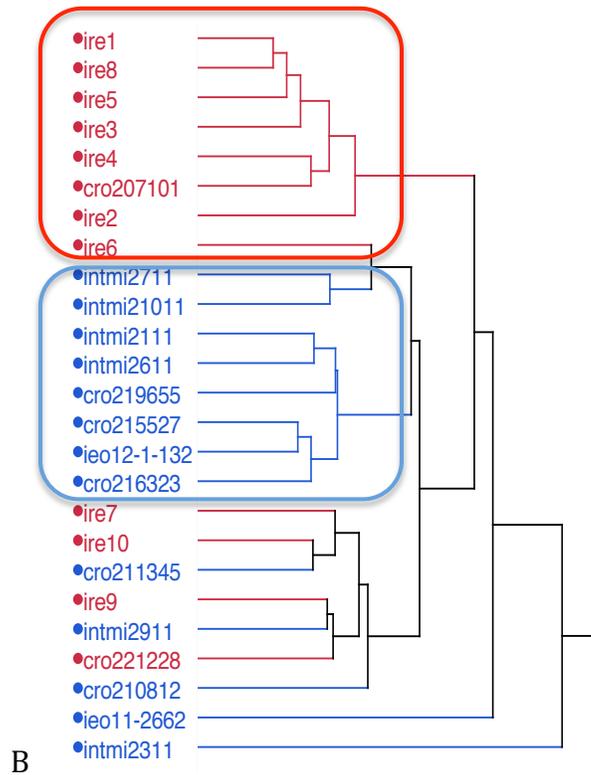


Fig.19 Il cluster gerarchico (A) delle metastasi epatiche resecabili (in rosso) e non resecabili (blu). Il corrispettivo dendrogramma (B) mostra la clusterizzazione dei due gruppi.

Come mostrato dalla figura 19, otto delle 13 (61%) biopsie derivanti da metastasi definite *non resecabili* (in azzurro) si raggruppano nello stesso cluster, rivelando un profilo proteomico simile tra loro, ma diverso dalle biopsie definite *resecabili* (in rosso).

Da questo si è potuto dedurre che i principi di resecabilità delle lesioni epatiche metastatiche potrebbero essere guidati da biomarcatori espressi nei diversi pathways.

## **5.4 Identificazione di possibili candidati per la terapia personalizzata delle metastasi non-resecabili**

Considerando il risultato dell'*heatmap*, sono stati valutati potenziali candidati per la terapia mirata specifici per l'uno o l'altro gruppo.

A questo fine, sono stati eseguiti dei grafici per la comparazione delle medie dei valori d'intensità dei potenziali targets nei due gruppi. Test non parametrico è stato usato per la valutazione del p-value.

Due endpoints molto importanti hanno mostrato un p-value significativo, EGFR (Y1173) e Aurora Kinase A (T288)/ B (T232)/ C (T198) (FIG.14).

Come mostrato nella figura, entrambe queste proteine presentano una maggiore attivazione nelle biopsie derivanti da metastasi definite chirurgicamente non resecabili.

Sono stati quindi valutate le proteine a valle di questi due endpoints, al fine di analizzare quale potrebbe essere la risposta al farmaco diretto contro questi marcatori.

Ancora una volta è stata determinata la variazione delle medie dell'intensità del segnale tramite test parametrico (FIG.20). Questi grafici hanno mostrato un'iper-attivazione nelle metastasi non resecabili non solo del recettore EGFR, ma anche dell'intero pathway a valle di esso.

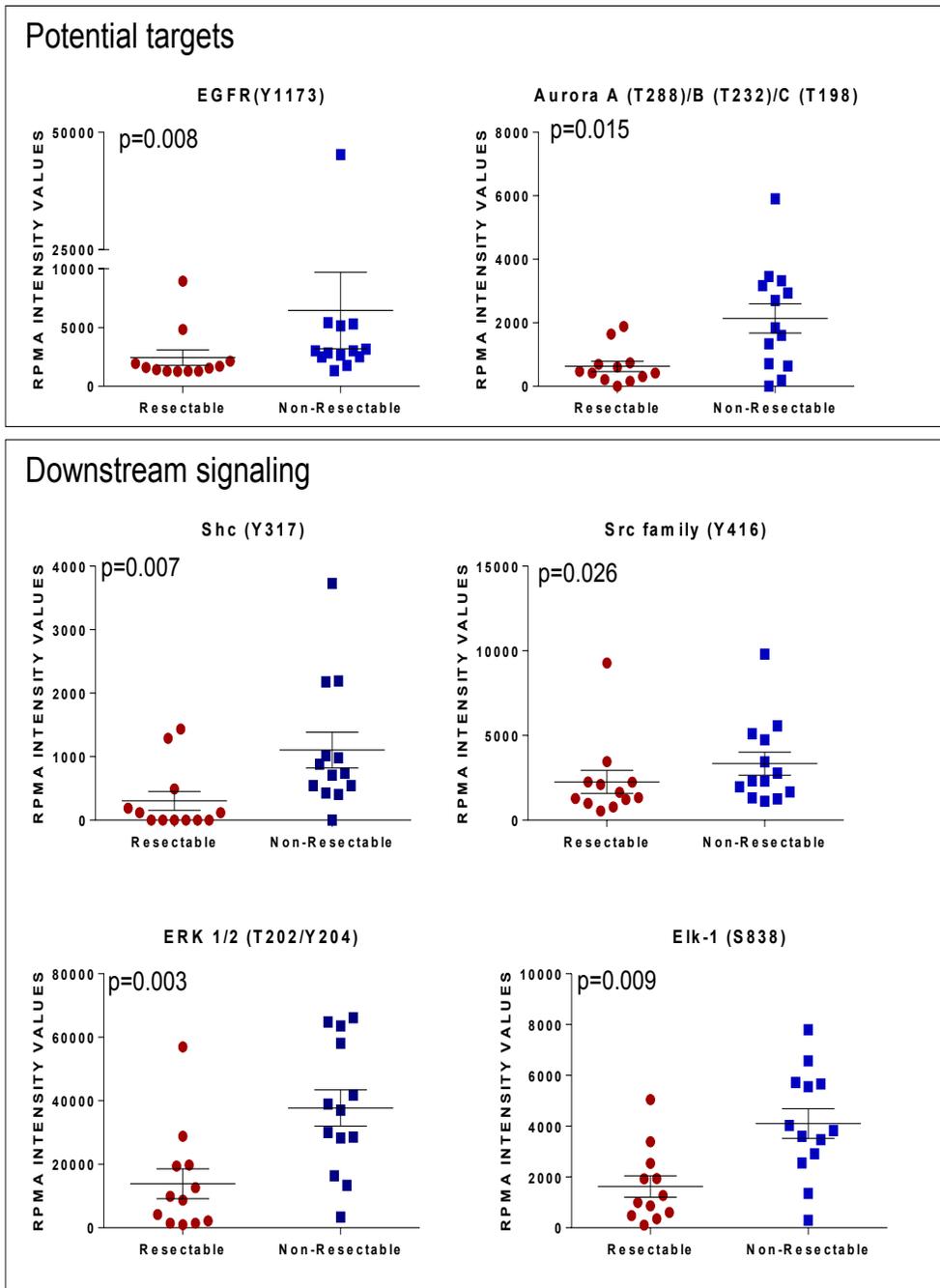


Fig.20 Valutazione delle medie dei valori d'intensità dei segnali per EGFR (Y1173) e Aurora Kinase e relative proteine a valle del segnale

Considerando che Aurora è coinvolta nei processi di proliferazione cellulare, è stato confrontato il valore di mediana tra i valori delle metastasi resecabili e quelli non resecabili per Ki67, e cyclin B1, marcatori di proliferazione.

Come presentato dalla figura 21, anche questi endpoints mostrano un'espressione maggiore nelle metastasi non resecabili.

Questo sottolinea un'iper-proliferazione delle cellule epiteliali caratterizzanti le metastasi non resecabili, probabilmente guidata da Aurora kinase.

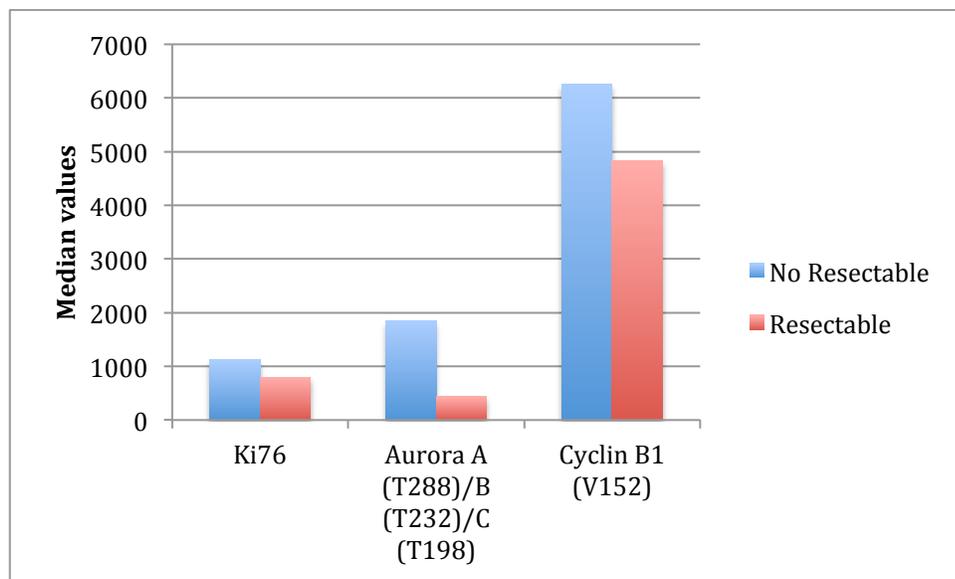


Fig.21 Confronto dei valori di mediana tra i due gruppi per Ki67, Aurora kinase e Cyclin B1

# **6. DISCUSSIONE**

Dopo l'approvazione dei farmaci molecolari da parte di FDA, sono stati effettuati numerosi trial clinici per capire l'impatto che questi potrebbero avere sull'*outcome* dei pazienti.

La loro associazione ai farmaci chemioterapici ha sicuramente migliorato la risposta alla terapia di molti pazienti ma ora molti studi clinici sono in atto per valutare qual è l'impatto che possono avere terapie combinate di 2 farmaci biologici.

Nel trial considerato per la prima parte dello studio, si sta valutando la massima dose tollerabile di Nilotinib associato all'uso di Cetuximab su pazienti metastatici da CRC.

Parte del trial è anche la valutazione dei profili proteomici dei pazienti prima e dopo la terapia, al fine di verificare il cambiamento molecolare che avviene durante il trattamento.

Nonostante questo fosse solo un trial di fase I, grazie alla piattaforma LCM/RPPA è stato possibile identificare i meccanismi di resistenza che hanno caratterizzato uno dei due pazienti analizzati.

Dai grafici mostrati (FIG.15,16), si nota, infatti,, una netta differenza tra il paziente 1 che ha risposto alla terapia combinata e il paziente 2 che non ha beneficiato del trattamento.

Per il paziente 1 si osserva un segnale relativamente stabile, con poche oscillazioni dei livelli di fosforilazione delle proteine considerate. Anche il recettore per EGF, target di Cetuximab e c-Abl e c-Kit, targets di Nilotinib, mostrano livelli stabili di attivazione prima e dopo il trattamento.

Al contrario nel paziente 2, i dati mostrano un decremento consistente (63%) nel segnale di attivazione di EGFR, mentre c-Abl, principale target di Nilotinib, sembra mostrare un'iper-attivazione dopo il trattamento.

Quest'iper-attivazione del segnale potrebbe essere originata da meccanismi di resistenza che hanno causato una successiva attivazione dei pathways, quali MAPK, ma soprattutto quello di mTOR-AKT.

In questo pathway, infatti, si osserva un'attivazione di mTOR maggiore del 10% rispetto alla biopsia pre-trattamento, ma al tempo stesso si nota che le proteine ad esso associate, quali S6RibosomalProtein e p70S6kinase hanno un segnale fino a 4 volte maggiore se paragonate al segnale della biopsia pre-trattamento.

Nilotinib è un inibitore di tirosin-chinasi di seconda generazione, disegnato specificatamente per inibire la regione di fusione di BCR-Abl e sviluppato per trattare la leucemia mieloide cronica (CML). In accordo con i nostri dati, diversi recenti studi (32-34) hanno mostrato che la resistenza a Nilotinib in CML può essere correlata con un'iper-attivazione del pathway di mTOR.

La piattaforma LCM/RPPA, quindi, risulta essere uno strumento molto importante non solo per valutare biomarcatori predittivi di risposta, ma anche per capire i meccanismi d'azione della resistenza a una determinata terapia e quindi trovare le giuste soluzioni farmaceutiche ad essi.

Di conseguenza, si sono analizzate 28 metastasi epatiche derivate da CRC.

Queste hanno mostrato una forte diversificazione a livello molecolare tra metastasi definite resecabili e quelle definite non resecabili.

In queste ultime, infatti, diverse vie di trasduzione del segnale risultano iperattivate e in particolare la via delle MAPK con il recettore EGFR e Aurora Kinase.

Questi due biomarcatori risultano particolarmente importanti a livello clinico.

EGFR, infatti, è il target molecolare di specifici inibitori approvati dall'FDA, tra i cui Cetuximab è già in uso clinico.

Questi anticorpi monoclonali bloccano l'attività del recettore, portando di conseguenza a una diminuzione del segnale del pathway delle MAPK e quindi a un arresto dei processi di proliferazione, angiogenesi e sopravvivenza.

Tra questi farmaci, Cetuximab e Panitumumab vengono usati, associati con FOLFIRI o FOLFOX, nella terapia neo-adiuvante per il trattamento di metastasi non resecabili.

Nel nostro studio viene inoltre evidenziata anche un'iperattivazione di Aurora kinase nelle lesioni non trattabili chirurgicamente.

Aurora kinase comprende una famiglia di proteine chinasi che giocano un ruolo chiave nel processo mitotico. Aurora A è una proteina localizzata nei centrosomi che recluta il complesso ciclina B1-CDK1, guidando la cellula alla mitosi.

L'amplificazione di Aurora A è coinvolta nei processi tumorigenesi di CRC, tumore gastrico, tumore alla prostata e al seno (37), ma anche in leucemia acuta (38).

Aurora B kinase, invece gioca un ruolo importante nella condensazione cromosomica, regolazione delle funzioni del citocore e citochinesi.

Ad oggi, l'uso di diversi inibitori di Aurora Kinase è impiegato in molti studi clinici su pazienti con CRC in stadio avanzato o altri tumori solidi (Clinical trial #NCT00099346, #NCT00560716, #NCT00424632).

Uno studio *in vivo* e *in vitro* pubblicato nel 2012 (39), propone un inibitore di Aurora chinasi, Danusertib, per l'inibizione della crescita delle metastasi epatiche da tumori endocrini gastro-pancreatici.

Inoltre uno studio recente (40) ha mostrato, usando una coorte di 500 pazienti, che l'espressione di Aurora Kinase A nelle metastasi epatiche da colon retto è associata a una cattiva prognosi.

Un altro consenso ai dati da noi ottenuti, viene dallo studio prodotto da Astsaturòv presso la Georgetown University (41). Qui è dimostrato un effetto sinergico nell'uso di inibitori per EGFR e Aurora Kinase *in vitro*. Infatti, l'inibizione combinata di queste due proteine porta all'apoptosi cellulare circa due volte in più delle cellule non trattate.

Considerando i risultati ottenuti in questa parte dello studio e le conferme riportate in letteratura, ciò che si propone è un trial clinico di fase I con inibitore di EGFR e Aurora kinase su pazienti con metastasi epatiche derivanti da CRC.

Questo permetterebbe di valutare la dose massima di tolleranza per la terapia combinata di questi due farmaci.

Il fine ultimo della combinazione dei due sarebbe quindi di condurre a resecabilità il maggior numero possibile di metastasi non resecabili, permettendo una maggiore sopravvivenza del paziente.

**Parte 2**

**Eterogeneità intra-  
tumorale**

# **7. Introduzione**

## **7.1 Problematiche nei Trial**

La prima parte di questo studio ha portato alla luce la possibilità di sviluppare un trial clinico specifico per pazienti che presentano metastasi epatiche non resecabili derivanti da CRC usando LCM/RPPA sia a fini predittivi che prospettici.

L'obiettivo di questo trial è di ottenere un'eventuale riduzione della lesione, per aumentare quindi la possibilità di sottoporre il paziente a una terapia chirurgica.

Come accennato in precedenza, però, la valutazione clinica delle metastasi epatiche è effettuata su una singola biopsia della lesione.

Recentemente diversi studi hanno evidenziato il problema dell'eterogeneità intra-tumorale, sottolineando la possibilità che una singola biopsia possa non essere rappresentativa dell'intero tumore.

## **7.2 Eterogeneità intra-tumorale**

Nonostante il modello genetico per la tumorigenesi presentato da Volgestein conduca all'idea che il cancro del colon-retto sia un tumore omogeneo a livello genetico, l'instabilità genomica nel tumore è un argomento che da sempre ha mosso la curiosità di molti studiosi.

L'instabilità cromosomica (CIN) è considerata come una condizione necessaria per la formazione del tumore. Essa è causata da una crisi telomerica che guiderà successive traslocazioni cromosomiche e aneuploidie (42,43). Tuttavia, sebbene la maggior parte di cellule pre-maligne vanno incontro a processi di apoptosi o senescenza, una percentuale di esse riesce a sopravvivere attraverso un processo che genera una notevole quantità di mutazioni e diversità geniche.

Nel 2011, Goronova ha presentato uno studio che ha mostrato una differenza nei livelli di mutazione dei geni APC, TP53 e KRAS in CRC primario e rispettive metastasi, come anche all'interno dello stesso tumore primitivo (45).

In altri studi, l'analisi di tumori primitivi e rispettive metastasi ha rivelato che sottocloni riscontrati nelle lesioni metastatiche sono già presenti nel tumore primitivo. Alcune di queste sottopopolazioni, successivamente, possono acquisire ulteriori mutazioni che potrebbero comportare la metastatizzazione della malattia o essere correlate specificatamente all'organo bersaglio della metastasi (44-47).

Oggi, parlare di eterogeneità intra-tumorale esclusivamente a livello genetico porta a una riduzione della problematica.

Infatti, non va dimenticato che non tutte le mutazioni genetiche presentano una manifestazione fenotipica, ma solo una piccola percentuale di esse ha conseguenze biologiche. Inoltre, bisogna anche considerare che le proteine subiscono successive modificazioni post-traduzionali, come fosforilazione, acetilazione, ubiquitinazione o clivaggio.

Ovviamente l'alterazione dei processi di modificazione post-traduzionale delle proteine può determinare attivazioni e/o disattivazioni aberranti nelle pathway delle segnalazioni cellulari che non possono essere riscontrabili dal punto di vista genetico.

In generale, oggi, per eterogeneità intra-tumorale si intende la presenza, all'interno della stessa lesione, di diverse sotto-popolazioni cellulari, guidate da distinte aberrazioni molecolari (44).

Descrivere la lesione tumorale come un insieme di diversi sottogruppi di cellule diviene particolarmente rilevante in ambito clinico e per la decisione della terapia.

Infatti, diversi studi hanno affermato che l'eterogeneità potrebbe essere la causa del fallimento della terapia.

Solo un recente studio ha sostenuto che biopsie derivanti dal medesimo tumore presentano livelli di attivazione delle chinasi simili tra loro; questo dimostrerebbe che la presenza di eterogeneità a livello genetico non influisce sulla funzionalità della terapia molecolare (48).

In generale alcune domande molto importanti circa l'argomento rimangono ancora senza risposta:

1. Come qualificare e quantificare l'eterogeneità?
2. L'eterogeneità può influenzare il valore predittivo di tutti biomarcatori, o solo di alcuni di essi?
3. Che impatto ha l'eterogeneità sulla risposta alla terapia con anticorpi monoclonali?

# **8. Scopo del lavoro**

Individuare possibili target molecolari per un nuovo trial clinico per metastasi epatiche non resecabili ha posto l'attenzione sul problema dell'eterogeneità intra-tumorale.

*Può una singola biopsia essere rappresentativa per la valutazione del profilo proteomico dell'intera lesione?*

Nella seconda parte di questo studio, quindi, si è analizzata la possibile presenza di diverse popolazioni clonali all'interno della stessa lesione, al fine di comprendere se l'analisi di una singola biopsia fosse sufficiente per decidere il trattamento da somministrare al paziente.

Oggi, diversi studi hanno già mostrato una varietà cellulare nello stesso tumore a livello genomico.

I farmaci biologici d'interesse per il trial clinico da noi proposto hanno come target proteine specifiche e le loro modificazioni aberranti presenti nelle cellule tumorali di metastasi epatiche non resecabili.

Di conseguenza in questa parte dello studio, l'attenzione è stata focalizzata sull'eterogeneità intra-tumorale a livello proteomico, per assicurarsi che il trial possa essere effettuato con la valutazione di una singola biopsia.

# **9. Materiali e Metodi**

## 9.1 Pazienti

Tre studi indipendenti sono stati analizzati (TAB.6).

StudySet1	StudySet2	StudySet3
<b>Epithelium Enrichment</b>	<b>Epithelium Enrichment</b>	<b>Epithelium Enrichment</b>
Study1_Sample2_A	Study2_Sample1_A	Study4_Sample2_A
Study1_Sample2_B	Study2_Sample1_B	Study4_Sample2_B
Study1_Sample3_A	Study2_Sample2_A	Study4_Sample2_C
Study1_Sample3_B	Study2_Sample2_B	Study4_Sample2_D
Study1_Sample4_A	Study2_Sample3_A	Study4_Sample3_A
Study1_Sample4_B	Study2_Sample3_B	Study4_Sample3_B
Study1_Sample5_A	Study2_Sample4_A	Study4_Sample3_C
Study1_Sample5_B	Study2_Sample4_B	Study4_Sample3_D
Study1_Sample6_A	Study2_Sample5_A	Study4_Sample3_E
Study1_Sample6_B	Study2_Sample5_B	Study4_Sample3_F
Study1_Sample7_A	Study2_Sample6_A	Study4_Sample3_G
Study1_Sample7_B	Study2_Sample6_B	Study4_Sample4_A
	Study2_Sample7_A	Study4_Sample4_B
	Study2_Sample7_B	Study4_Sample4_C
	Study2_Sample8_A	Study4_Sample4_D
	Study2_Sample8_B	Study4_Sample4_E
	Study2_Sample9_A	Study4_Sample5_A
	Study2_Sample9_B	Study4_Sample5_B
		Study4_Sample5_C
		Study4_Sample6_A
		Study4_Sample6_B
		Study4_Sample7_A
		Study4_Sample7_B
		Study4_Sample7_C
		Study4_Sample7_D

Tab.6 Nelle tre tabelle sono elencati i campioni processati per ogni singolo studio

Ogni studio è stato approvato dalle commissioni etiche delle singole istituzioni e tutti i pazienti sono stati arruolati volontariamente, tramite consenso informato, consegnato e firmato prima della raccolta del campione.

Lo studio 1 e 2 include metastasi epatiche da CRC raccolte presso il Centro di Riferimento Oncologico di Aviano.

Per ciascuno di questi studi sono state raccolte rispettivamente un totale di 6 e 18 biopsie.

I campioni sono stati congelati nei 30 minuti seguenti la raccolta e poi conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al processamento.

Per lo studio 1 sono state scelte solo biopsie con un lato maggiore di 1.1 cm.

I campioni sono stati tagliati con un criostato in sezioni di  $8\ \mu\text{m}$ .

All'interno della stessa sezione sono state individuate 2 regioni distanti almeno 4 mm e definite *North* e *South* (FIG.19).

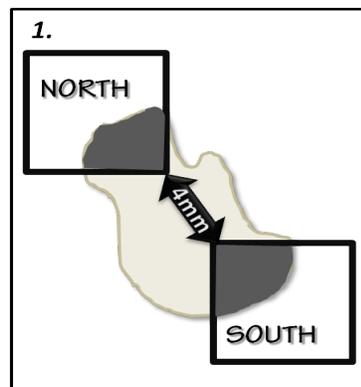


Fig. 19 Studio 1. Due regioni distanti almeno 4 mm all'interno dello stesso campione sono state analizzate indipendentemente e trattate come due distinti campioni.

Le due regioni sono poi state trattate come se fossero state due campioni indipendenti, per un totale di 12 campioni.

Questo studio ha un importante valore dal punto di vista dell'omogeneità in termini di tempi nella collezione e conservazione dei campioni.

Come è stato già mostrato in precedenza dal gruppo Petricoin-Liotta, in il fosfo-segnale delle proteine è altamente sensibile alle variazioni di temperatura (49).

Contemporaneamente, però, bisogna considerare che le due regioni analizzate derivano da due aree del tumore relativamente molto vicine tra loro.

Per il secondo studio, un totale di 18 ago-biopsie sono state collezionate indipendentemente dopo l'escissione chirurgica (FIG.20) da 9 pazienti affetti da metastasi epatica.

Sebbene questo studio comprenda un numero relativamente basso di campioni, esso rappresenta il miglior modo possibile per valutare il profilo proteomico di due diverse aree della stessa lesione.

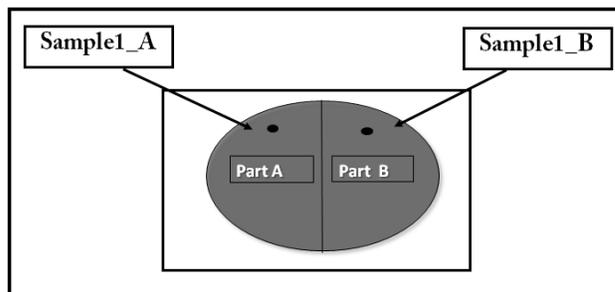


Fig. 20 Studio 2. Due distinte ago biopsie (A e B) sono state prelevate da due diverse regioni della stessa lesione metastatica dopo resezione chirurgica

Lo studio 3 comprende biopsie derivate da 7 pazienti *chemo naive* affetti da cancro a cellule chiare del rene (ccRCC).

Per ogni paziente sono state raccolte diverse biopsie da differenti aree del tumore, per un totale di 25 campioni (FIG.21).

Purtroppo le biopsie non sono state raccolte nei tempi definiti dalla procedura standard (SOP). Alcuni campioni sono stati congelati in tempi superiori ai 20 minuti.

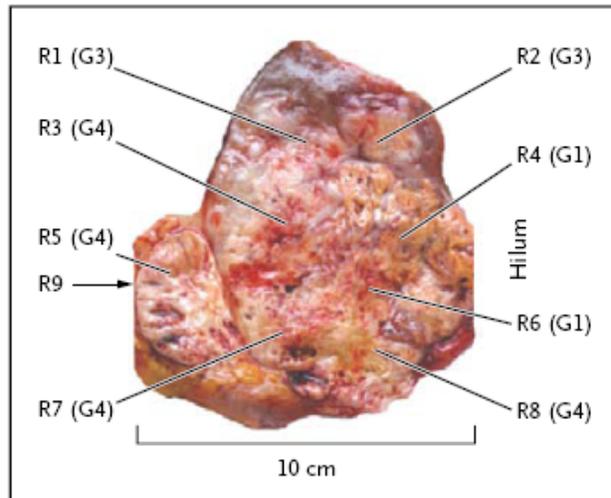


Fig.21 Studio 3. Esempio di collezione delle biopsie dallo stesso tumore primario ccRCC. (47)

I campioni dei 3 studi sono stati processati con microdissezione laser e RPPA, come descritto per la prima parte del progetto.

Per lo studio 3, inoltre, intere sezioni di tessuto sono state lisate e processate mediante RPPA per la valutazione del tessuto totale.

Rispettivamente un totale di 160, 99 e 149 endpoints sono stati analizzati per lo studio 1, 2 e 3.

Successivamente, sono stati valutati solo endpoints nel *range* di valori dei calibratori e tra questi, sono stati eliminati gli endpoints rappresentanti le proteine totali. Si sono, invece, considerati importanti per l'analisi solo endpoints specifici per il fosfo-segnale proteico.

Il numero finale di endpoints analizzati è stato di 56, 34 e 54 rispettivamente per gli studi 1, 2 e 3.

## 9.2 Analisi dei Dati

Al fine di valutare l'eterogeneità intra-tumorale, per ogni studio sono stati creati cluster gerarchici per la visualizzazione dei raggruppamenti all'interno dei singoli pazienti.

Inoltre per le proteine appartenenti ai pathways di AKT-mTOR e ERK-MAPK è stato calcolato l'incremento del valore d'intensità (*fold increase*) in ogni biopsia all'interno di ogni singolo paziente.

Per visualizzare il *fold increase* è stata effettuata la somma dei valori di intensità per le proteine d'interesse per ogni pathway. Per ogni paziente, il campione con valore inferiore è stato usato per la normalizzazione. Il valore 1 è stato poi sottratto ai valori normalizzati. Quindi, per ogni paziente, il valore 0 è stato assegnato alla biopsia con valore più basso.

I dati sono stati rappresentati con scatter plot creati con Graphpad 5.02 (GraphPad Software, Inc.)

La valutazione della differenza tra il lisato totale dei tessuti appartenenti allo studio 3 e i rispettivi tessuti LCM è stata valutata tramite calcolo del coefficiente di variazione (CV) all'interno dello stesso campione. In breve, sono stati valutati i pathway ERK-MAPK e AKT-mTOR. Per ogni biopsia, i valori d'intensità delle proteine scelte per i due pathways sono stati sommati per un valore finale corrispondente al valore di attivazione dell'intero pathway.

In seguito, sia per il materiale LCM che per il tessuto totale di ogni paziente è stata calcolata la deviazione standard e la media tra le biopsie ad esso appartenenti, per la valutazione finale del CV.

Infine i valori sono stati normalizzati sui valori di CV del tessuto LCM.

# **10. Risultati**

## 10.1 La clusterizzazione gerarchica utilizzando tutti gli endpoints analizzati non mostra differenze all'interno dello stesso tumore

Per ogni studio è stata eseguita la valutazione della clusterizzazione gerarchica analizzando tutti gli endpoints usati nel processo di RPPA.

Per l'epitelio microdissezionato nello studio 1, sono stati scelti per l'analisi 56 endpoints, caratterizzanti i principali siti di fosforilazione di proteine coinvolte nei maggiori pathways cellulari.

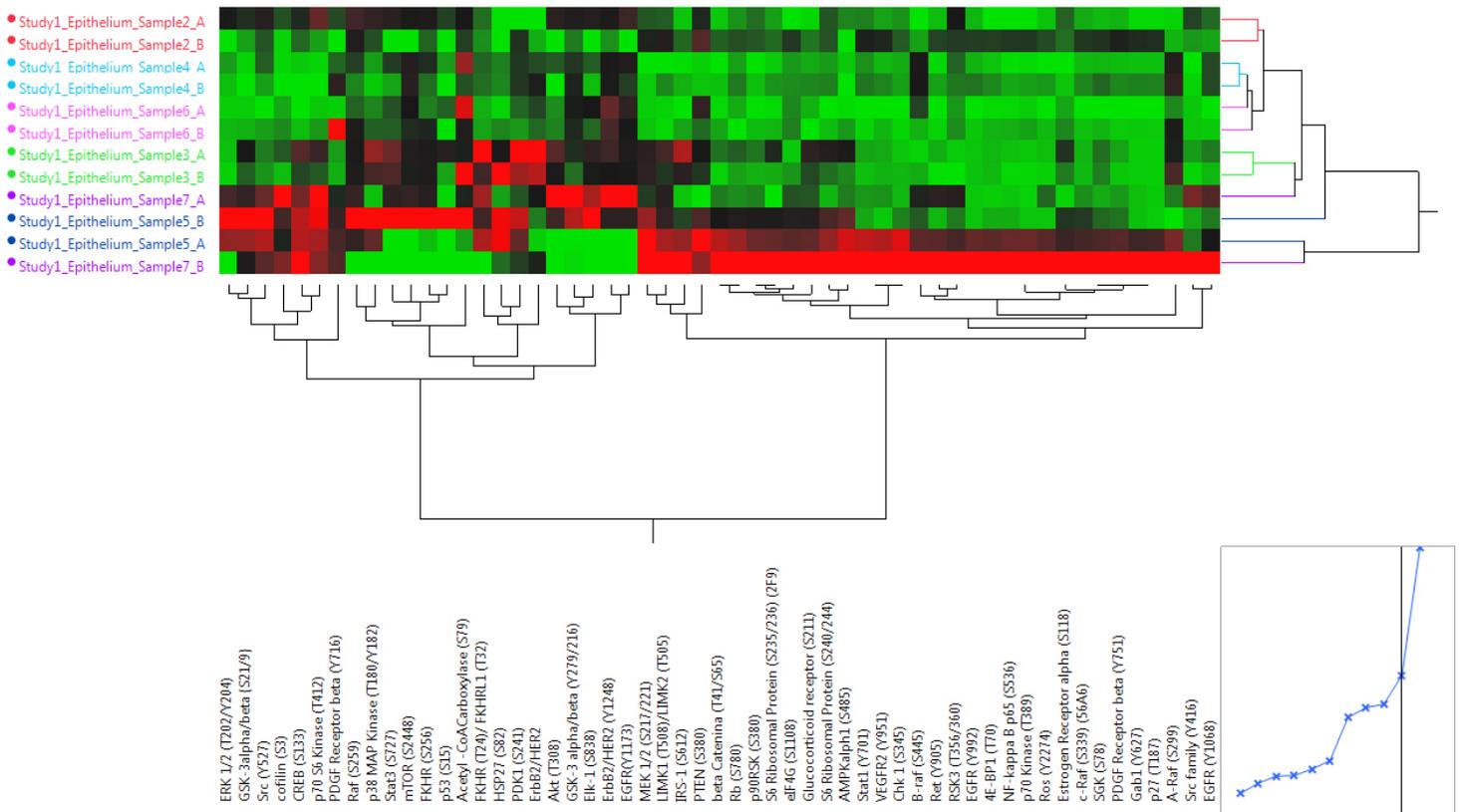


Fig. 22 Clusterizzazione gerarchica dei campioni presenti nello studio 1. Lo stesso colore indica la provenienza dallo stesso paziente. 5 dei 6 campioni considerati clusterizzano insieme.

Come mostrato dalla figura 22, le due aree microdissezzate dallo stesso tumore clusterizzano insieme in 5 dei 6 campioni analizzati, mantenendo quindi la stessa architettura del segnale.

Nello studio 2, sono stati analizzati 34 endpoints.

Ancora una volta il raggruppamento gerarchico dei campioni mostra che la maggioranza delle biopsie derivanti dallo stesso paziente (intra-metastasi) si raccoglie insieme.

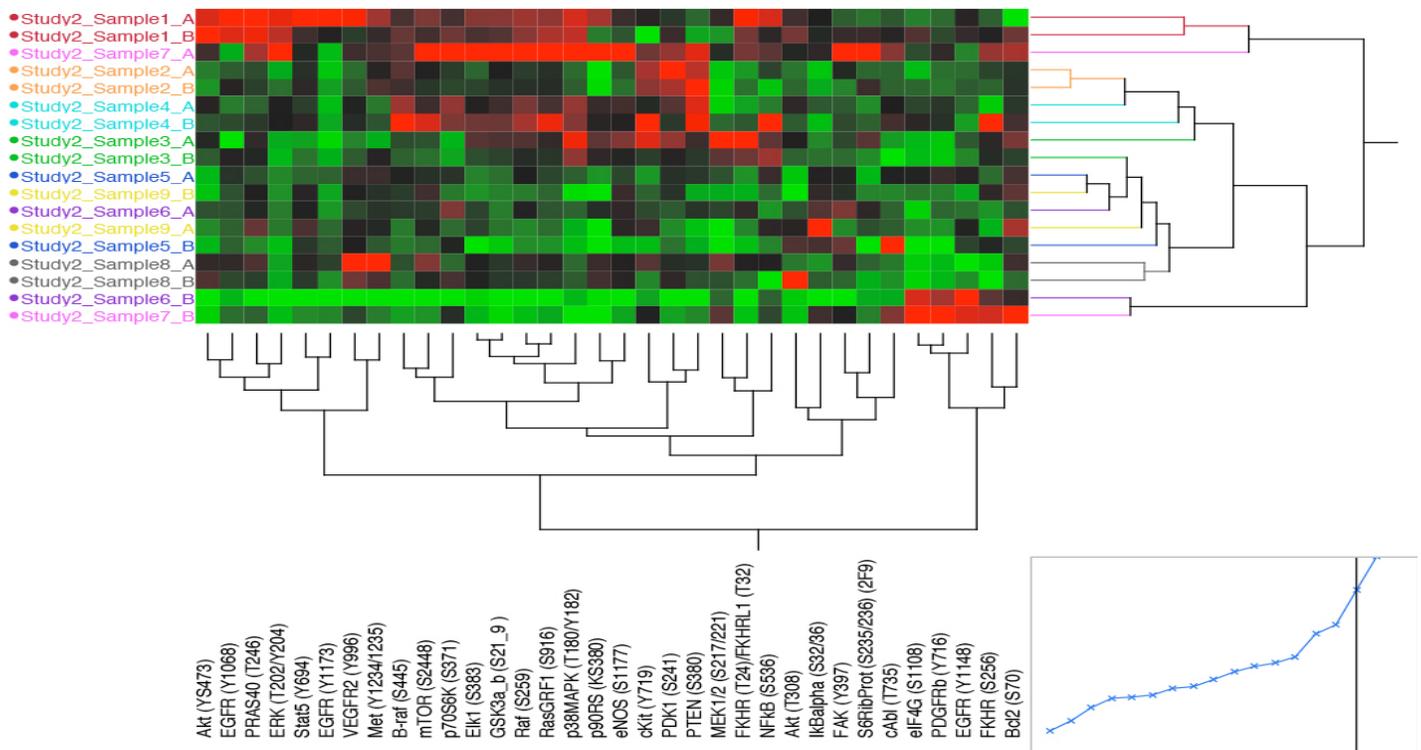


Fig. 23 Clusterizzazione gerarchica dei campioni dello studio 2. Lo stesso colore indica la provenienza dallo stesso paziente. 5 delle 9 coppie considerate clusterizzano insieme.

La figura 23 mostra, infatti, che il 55.5% delle coppie di biopsie derivanti dalla stessa lesione clusterizzano insieme (5 su 9 coppie).

Per lo studio 3, è stato analizzato un totale di 54 anticorpi.

Come mostrato dalla figura 24, solo le biopsie derivanti dal campione 3 si raggruppano in un cluster più ampio.

Al contrario, le altre biopsie non creano dei cluster secondo il campione di provenienza, ma restano separate.

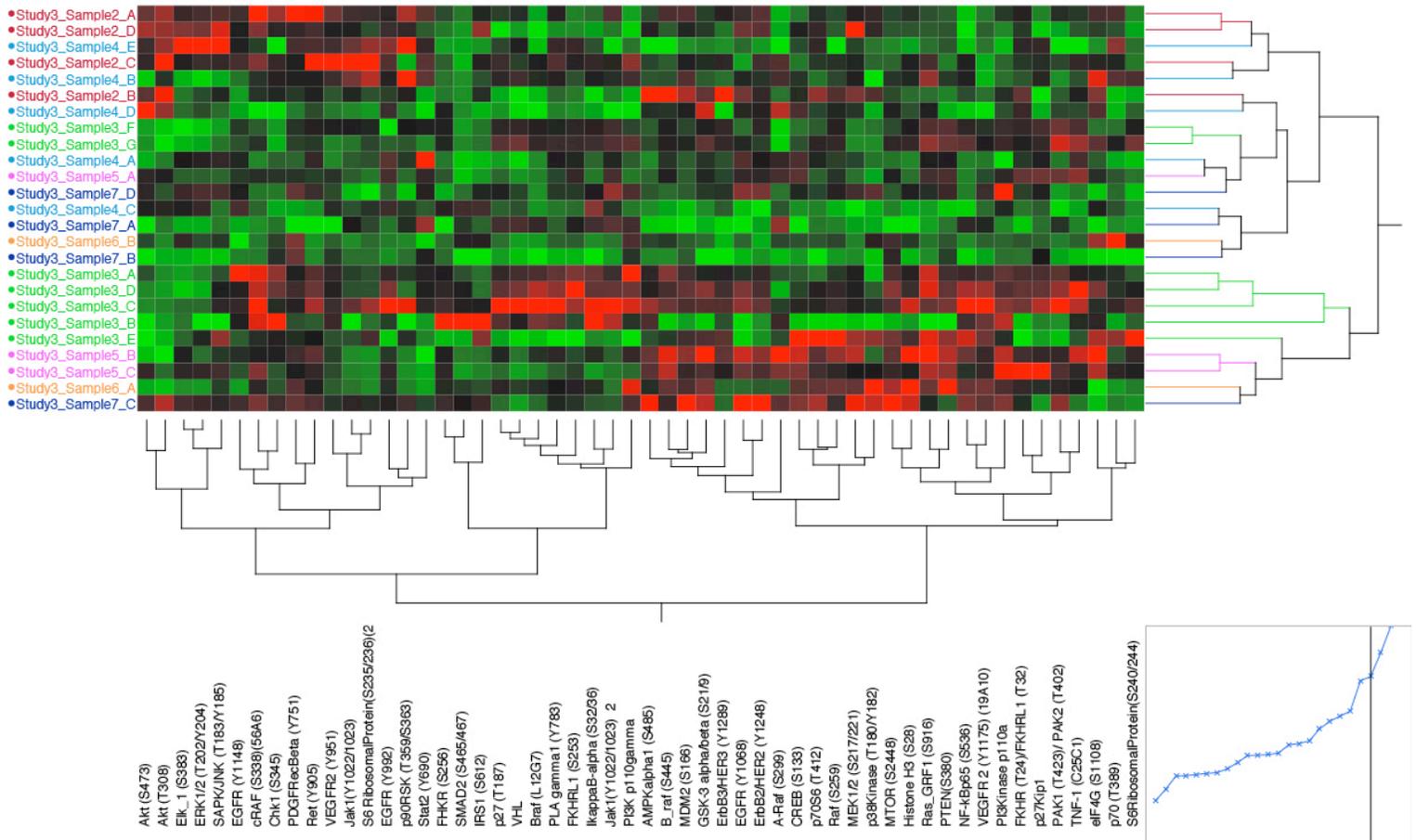


Fig. 24 Clusterizzazione gerarchica dei campioni presenti nello studio 3. Lo stesso colore indica la provenienza dallo stesso paziente . Solo nel caso del campione 3, una maggioranza le biopsie si raggruppa nello stesso cluster

## 10.2 L'analisi dei singoli *pathways* non mostra differenze all'interno dello stesso paziente

Come sottolineato in precedenza, i nuovi farmaci biologici sono studiati per riconoscere e colpire cellule tumorali con un segnale proteomico aberrante.

Abbiamo quindi considerato i due più importanti *pathways* coinvolti nella tumorigenesi, ERK-MAPK e AKT-mTOR.

È stata valutata non solo la clusterizzazione dei campioni, ma soprattutto la differenza dei valori d'intensità tra le biopsie derivanti dalla stessa lesione.

Per il pathway ERK-MAPK sono stati selezionati i seguenti endpoints:

B-Raf (S445), ERK 1/2 (T202/Y204), MEK 1/2 (S217/221), ELK (S838).

Per il pathway AKT-mTOR sono, invece stati valutati i seguenti endpoints: mTOR (S2448), p70 Kinase (T389), S6 Ribosomal Protein (S240/244), eIFG (S208).

### 10.2.1 Valutazione dei cluster gerarchici

Per ogni studio sono stati creati i cluster gerarchici, usando esclusivamente gli endpoints appartenenti ad ogni singolo *pathway*.

All'interno di ogni studio, il dendrogramma ha mostrato una clusterizzazione tra alto e basso livello di segnale per ogni *pathway*. Quindi si è valutato se la coppia di campioni (studio 1 e 2) o l'insieme dei campioni derivanti da uno stesso tumore (studio 3) fosse presente nella stessa clusterizzazione (alto o basso segnale) o si dividesse tra le due.

La figura 25 mostra l'analisi dello studio 1 per il pathway di ERK-MAPK.

Si può vedere che nessuna delle coppie di campioni raccolti dalla stessa lesione si divide tra i due gruppi.

Infatti, 2 delle 6 coppie mostrano un profilo con un alto livello di segnale, mentre 4 di esse creano dei cluster separati per ogni campione di provenienza e si posizionano nel più ampio gruppo del basso segnale.

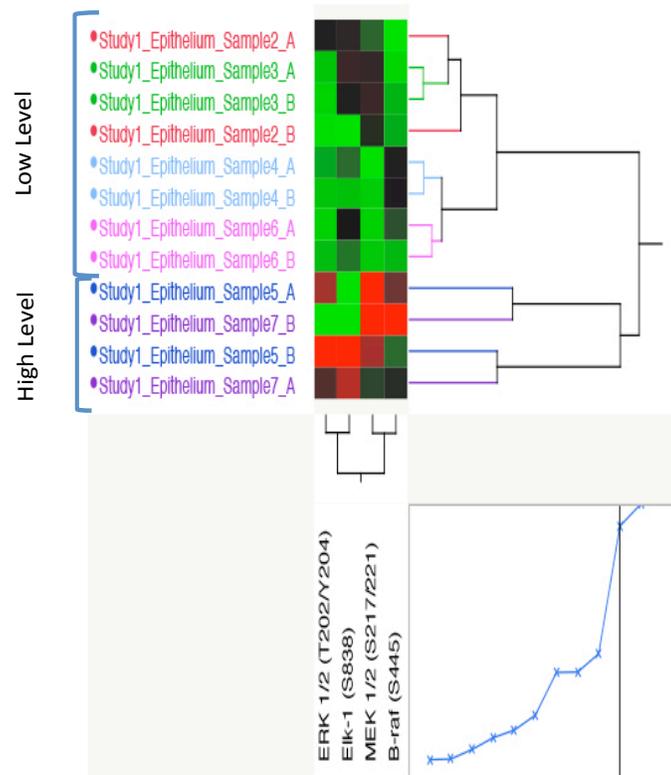


Fig.25 Cluster gerarchico del pathway di ERK-MAPK, per lo studio 1 mostra che nessuna coppia di campioni si divide tra i gruppi di alto e basso livello di segnale

Anche osservando la clusterizzazione per il pathway di mTOR (FIG.26), non si nota una grande divisione delle coppie tra alto e basso segnale. Infatti, anche in questo caso solo i campioni Sample5 e Sample7 si separano tra alto e basso segnale.

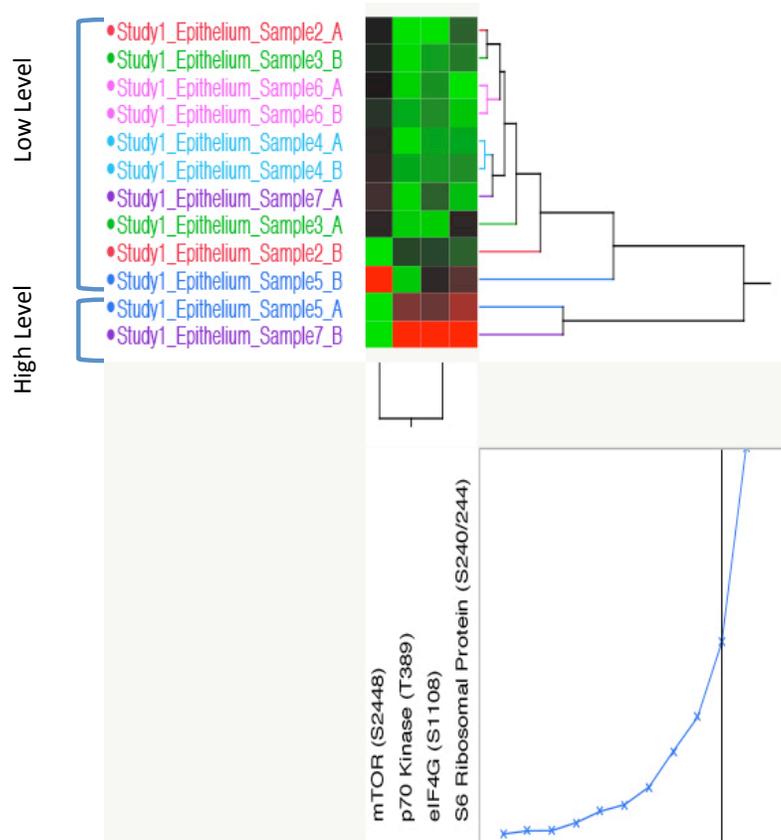


Fig.26 Cluster gerarchico del pathway di AKT-mTOR, per lo studio 1 mostra che solo una coppia di campioni (Sample5) si divide tra i due gruppi.

Nello studio 2, si può notare che in entrambi i *pathways* solo una coppia di campioni su 9 clusterizza separatamente. (FIG 27 e 28)

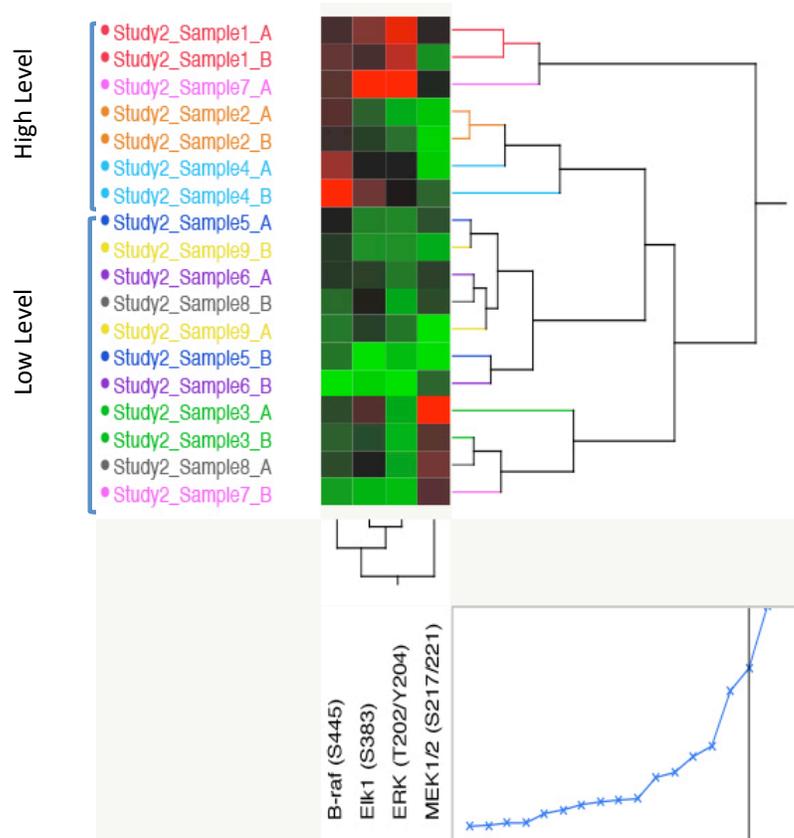


Fig.27 Cluster gerarchico del pathway di ERK-MAPK, per lo studio 2 mostra che solo una coppia di campioni (Sample7) si divide tra i due gruppi.

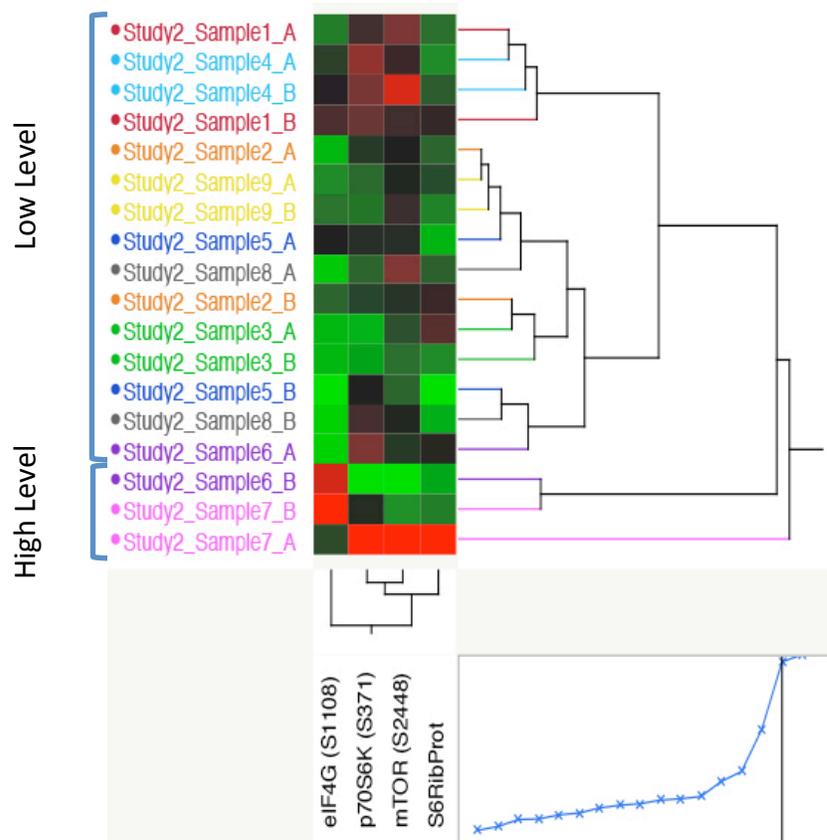


Fig.28 Cluster gerarchico del pathway di AKT-mTOR, per lo studio 2 mostra che solo una coppia di campioni (Sample6) si divide tra i due gruppi.

Per quanto riguarda lo studio 3, il risultato dei cluster è ben diverso.

La figura 29, illustrante la clusterizzazione per il pathway ERK-MAPK, presenta sempre una netta differenziazione tra alto e basso livello di segnale

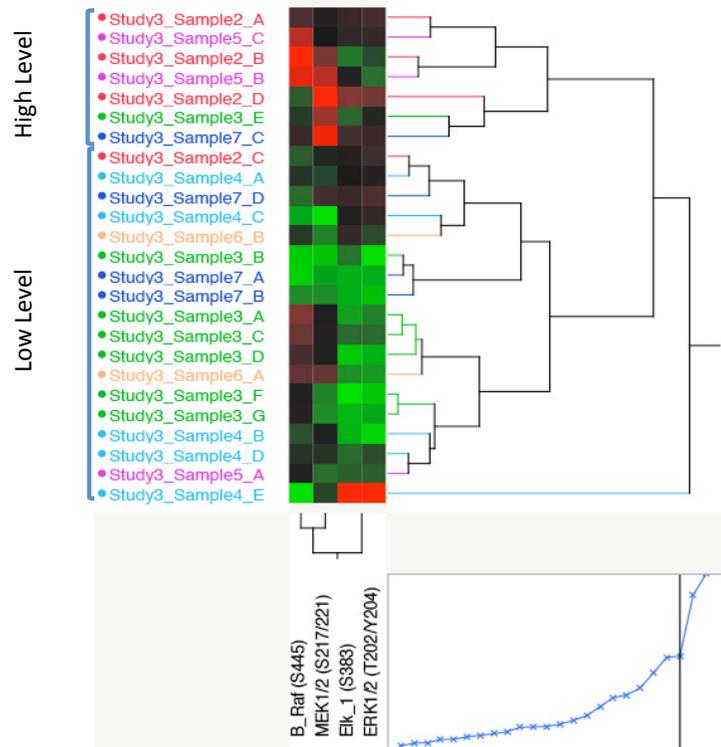


Fig.29 Cluster gerarchico del pathway di ERK-MAPK, per lo studio 3

Quello che si nota, però, è che il raggruppamento delle biopsie derivanti dalla stessa lesione non è chiaro come negli studi 1 e 2.

Analizzando il pathway di ERK-MAPK, si può notare che per 2 lesioni (*Sample4* e *Sample6*), le biopsie si raggruppano nello stesso livello di attivazione.

Gli altri campioni presentano una divisione minima tra i due livelli di attivazione.

Nella tabella 7, infatti si può constatare che per ogni campione, la maggior parte

delle biopsie collezionate si raccoglie in uno dei due cluster e solo una piccola percentuale diverge dal gruppo (TAB.7).

ERK-MAPK Pathway			
Sample	# Biopsie Alto Segnale	# Biopsie Basso Segnale	Major cluster
Sample2	3 (A, B, D)	1 (C)	3/4
Sample3	1 (E)	6 (A, B, C, D, F, G)	6/7
Sample4	-	5 (ALL)	5/5
Sample5	2 (C, B)	1 (A)	2/3
Sample6	-	2 (ALL)	2/2
Sample7	1 (C)	3 (A, B, D)	3/4

Tab.7 Distribuzione delle biopsie derivanti dalla stessa lesione per il pathway di ERK-MAPK

Per quanto riguarda il pathway di AKT-mTOR, invece, la distribuzione delle biopsie per ogni singola lesione è meno omogenea tra i gruppi alto e basso livello di attivazione (FIG 30, TAB. 8).

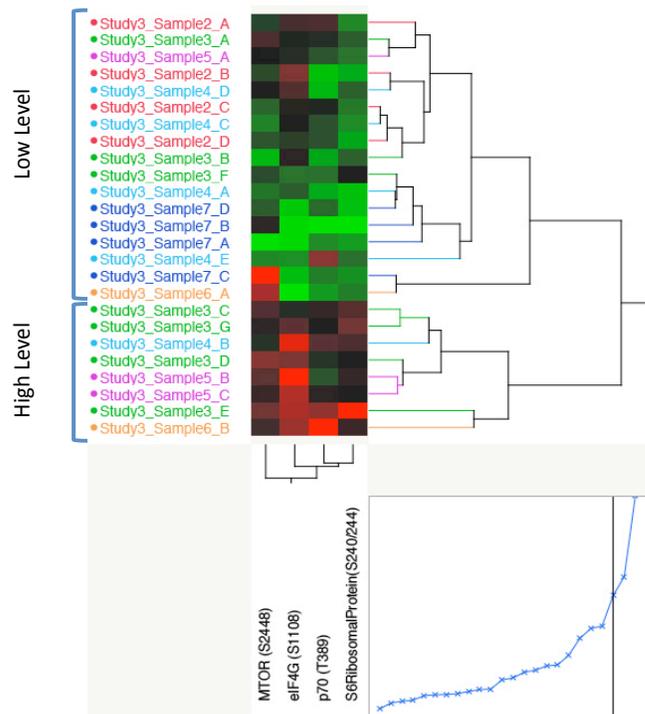


Fig.30 Cluster gerarchico del pathway AKT-mTOR per lo studio 3

Nella tabella 8, infatti notiamo che per il campione 3, come per il campione 6, esiste una separazione delle biopsie tra alto e basso segnale in un numero pressoché eguale.

Infatti, il campione 3 presenta il 57% delle biopsie (4 su 7) collocate nel gruppo dell'alto segnale, mentre il campione 6 presenta 1 biopsia situata nel gruppo del basso segnale e l'altra nella posizione opposta.

I campioni derivanti dagli altri pazienti, invece, non mostrano una così forte divisione tra i due gruppi.

AKT-mTOR Pathway			
Sample	# Biopsie Alto Segnale	# Biopsie Basso Segnale	Major cluster
Sample2	-	4 (ALL)	4/4
Sample3	4 (C, G, D, E)	3 (A, B, F)	3/7
Sample4	1 (B)	4 (D, C, A, E)	4/5
Sample5	1 (A)	2 (B, C)	2/3
Sample6	1 (B)	1 (A)	1/2
Sample7	-	4 (ALL)	4/4

Tab.8 Distribuzione delle biopsie derivanti dalla stessa lesione per il pathway di AKT-mTOR

### **10.2.2 Valutazione del *fold increase* tra le diverse biopsie derivate dalla stessa lesione: l'eterogeneità inter-tumorale è maggiore di quella intra-tumorale.**

Per meglio visualizzare le differenze di attivazione dei pathway tra le biopsie derivanti dalla stessa lesione, si è valutato il *fold increase* del segnale, tramite scatter plot.

Questo ha permesso di meglio visualizzare l'eterogeneità a livello proteomico non solo all'interno dello stesso tumore, ma anche tra i pazienti.

La figura 31 permette di constatare che la differenza nei livelli di attivazione del pathway ERK-MAPK sono minimi se valutati all'interno della stessa lesione (31A). Al contrario, nel momento in cui la valutazione è fatta tra pazienti, si può notare un notevole aumento dei valori di *fold increase*. Infatti, mentre all'interno della stessa lesione si ha una variazione nei livelli del segnale che non supera mai il 50%, tra i pazienti questa può raggiungere livelli 6 volte superiori rispetto al paziente usato per la normalizzazione.

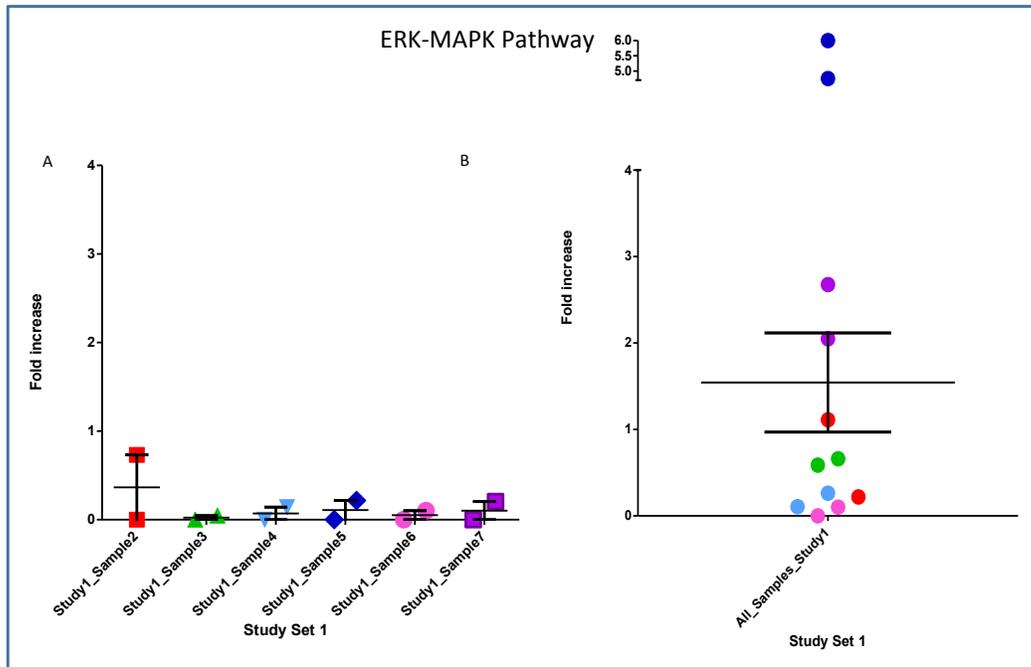


Fig.31 *Fold increase* per il pathway ERK-MAPK nello studio 1. La variazione dei livelli di attivazione all'interno della stessa lesione (A) mostra valori molto più bassi rispetto alla variazione dei livelli di attivazione tra i diversi pazienti

La situazione non cambia molto per quanto riguarda il pathway di AKT-mTOR (FIG.32). Solo il campione 7 risulta avere una delle due regioni della stessa lesione

caratterizzata da un segnale di attivazione molto più alto rispetto all'altra. Questo, però, potrebbe essere solo la rappresentazione di un artefatto.

Anche in questo caso, la variazione tra i pazienti è più alta rispetto a quella riscontrata all'interno di un singolo paziente.

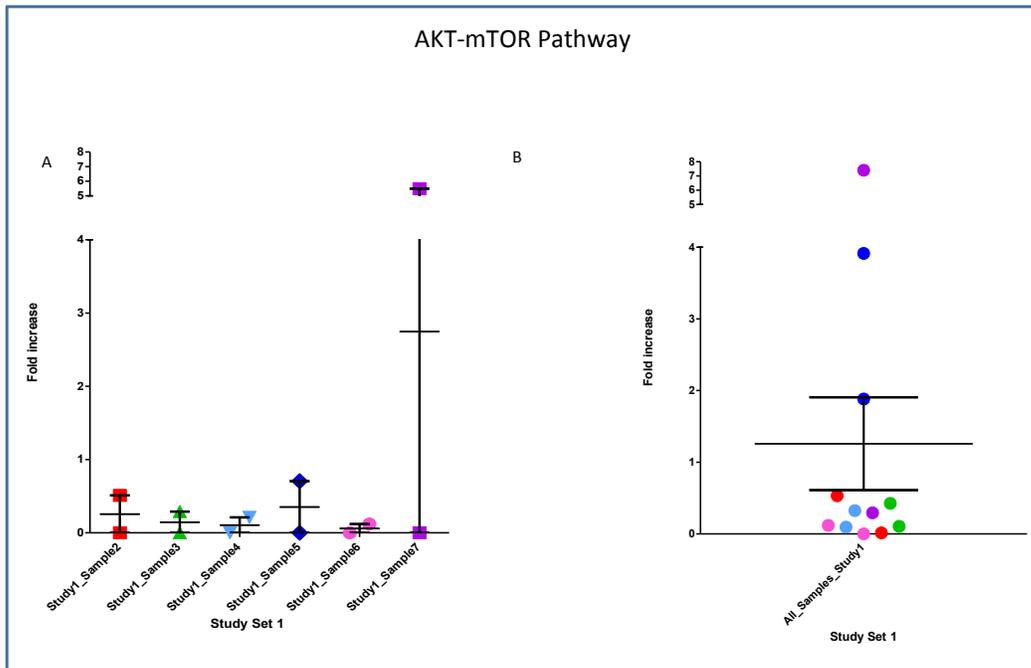


Fig.32 *Fold increase* per il pathway AKT-mTOR nello studio 1. La variazione dei livelli di attivazione all'interno della stessa lesione (A) mostra valori molto più bassi rispetto alla variazione dei livelli di attivazione tra i diversi pazienti (B)

Nello studio 2 (FIG.33 e 34), per entrambi i pathway, la variazione all'interno dei pazienti sembra essere leggermente più accentuata rispetto allo studio 1.

Nonostante ciò, però la variazione tra i pazienti (33B e 34B) in entrambi i pathways è sempre maggiore se comparata a quella intra-tumorale.

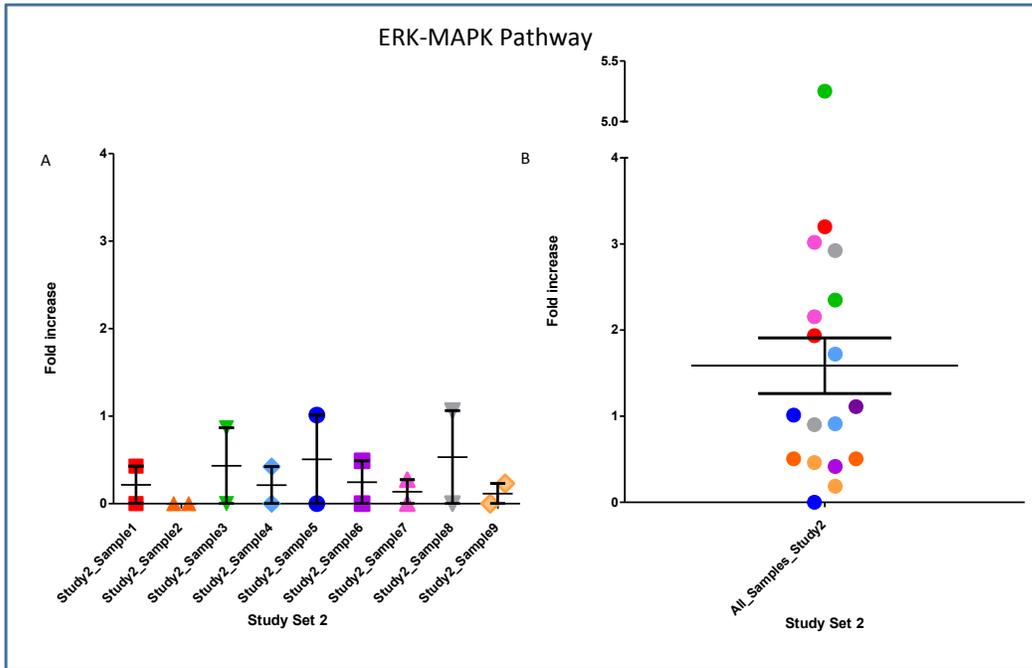


Fig.33

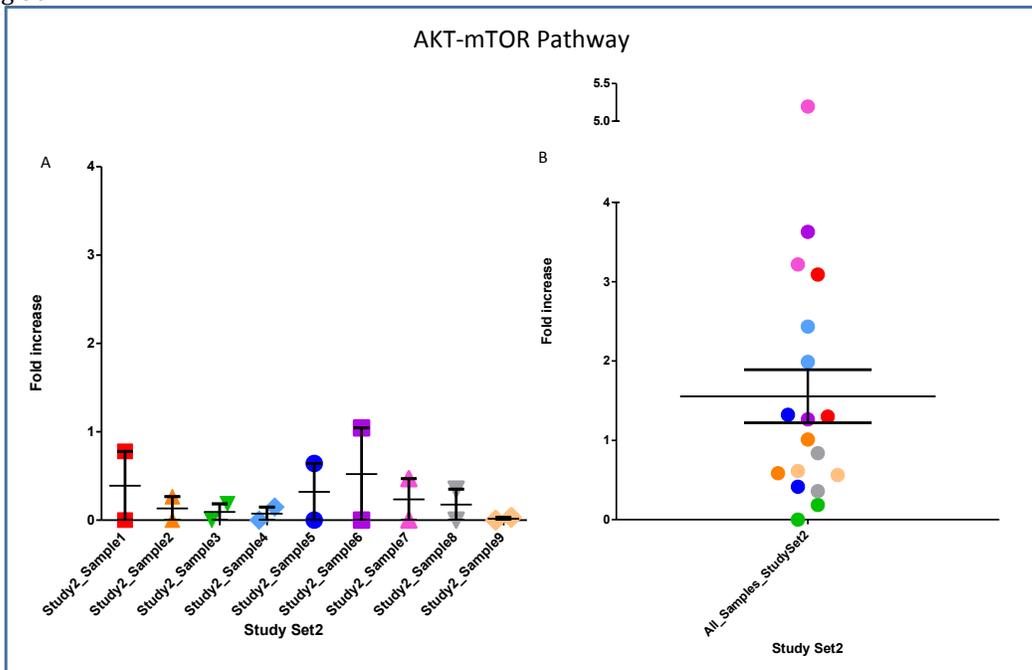


Fig.34 *Fold increase* per il pathway ERK-MAPK (33) e AKT-mTOR (34) nello studio 2. La variazione dei livelli di attivazione all'interno della stessa lesione (33A, 34A) mostra valori molto più bassi rispetto alla variazione dei livelli di attivazione tra i diversi pazienti (33B, 34B).

Nello studio 3, la situazione ancora una volta cambia rispetto agli studi precedenti. Le figure 35 e 36, rispettivamente per i pathways ERK-MAPK e AKT-mTOR, mostrano un *fold increase* consistente quando si valuta l'eterogeneità tra i diversi pazienti, ma allo stesso tempo si può notare che l'eterogeneità all'interno della stessa lesione (35A, 36A) è più alta rispetto a quella riscontrata negli studi 1 e 2.

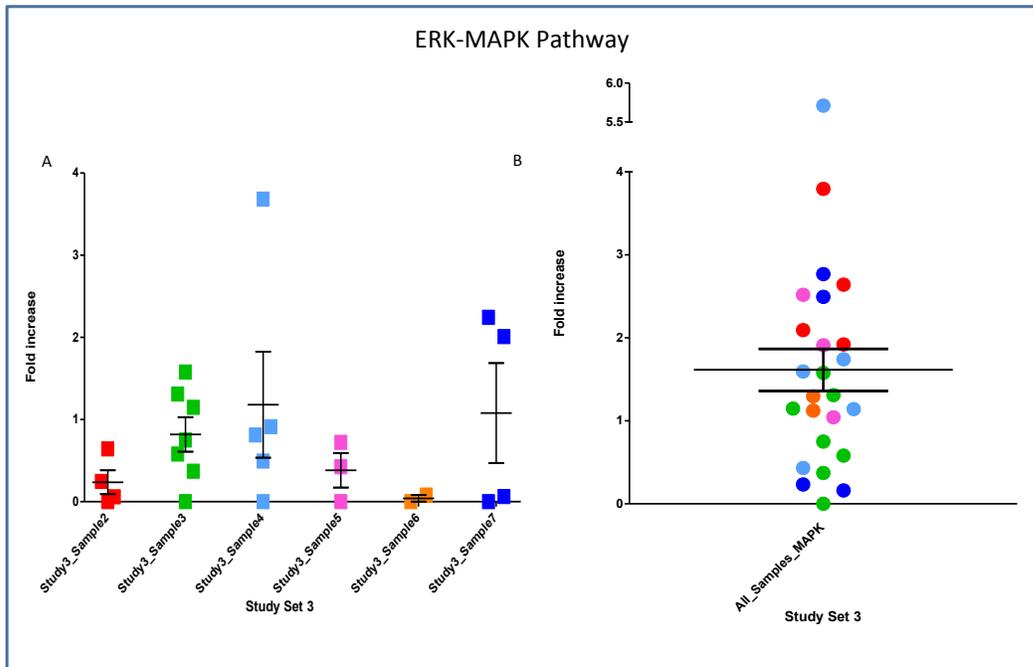


Fig.35

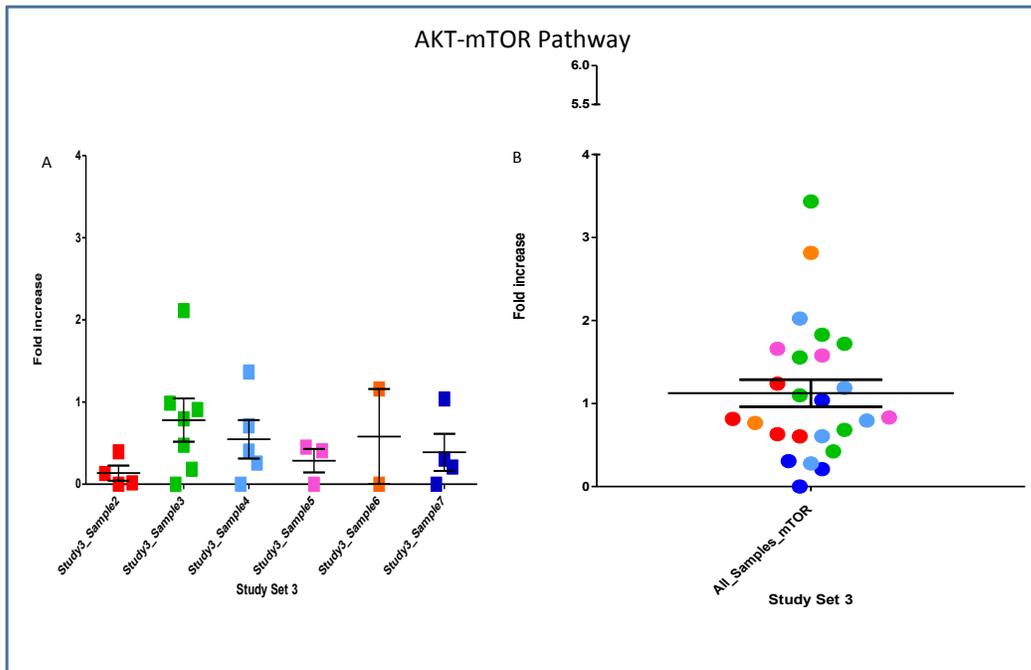


Fig.36 *Fold increase* per il pathway ERK-MAPK (35) e AKT-mTOR (36) nello studio 3.

### 10.3 Valutazione della correlazione tra il tempo di raccolta del campione e il livello del segnale: l'importanza del congelamento immediato ai fini dell'analisi proteomica

I risultati ottenuti dallo studio 3 si sono mostrati discordanti rispetto a quelli riportati dagli studi 1 e 2.

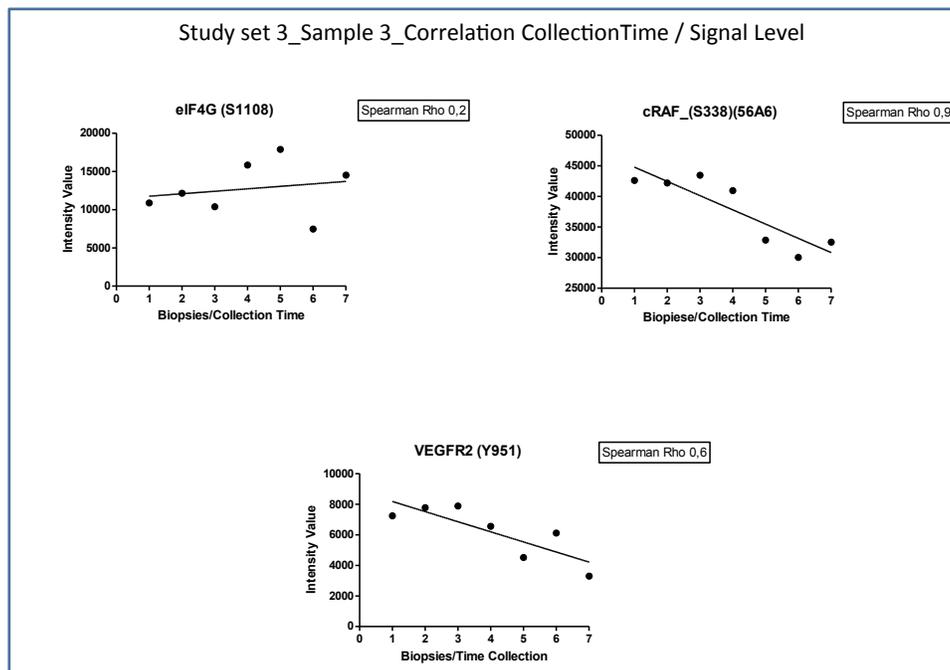
Esso, infatti, ha mostrato un'eterogeneità intra-tumorale con un *fold increase* maggiore di 1 nel 50% e nel 66.6% dei pazienti rispettivamente per il pathway di ERK-MAPK e AKT-mTOR.

Considerando che il punto debole di questo studio è stato il tempo di raccolta dei campioni, è stata analizzata la correlazione tra livello del segnale ottenuto dall'analisi di RPPA per ogni endpoint e l'ordine di tempo in cui le biopsie sono state raccolte per ogni paziente (1, 2, 3, 4, etc).

È stato quindi valutato il valore di *Pearson rho*, per verificare un'eventuale relazione di linearità tra queste due variabili.

Dai grafici nella figura 37, si può notare che nei due pazienti presi come esempio, la correlazione può raggiungere livelli molto alti (*Pearson rho* 0.9 per c-Raf nel *sample3*), ma anche rasentare lo 0 (*Pearson rho* 0.2 per PDGFR *sample4*).

Questo risultato accentua ciò che era già stato riconosciuto dalla letteratura (48), cioè che il tempo trascorso tra la collezione del campione e il suo congelamento è di massima importanza per l'analisi fosfo-proteomica., in quanto la temperatura agisce sul fosfo-segnale in modo non costante tra i diversi endpoints.



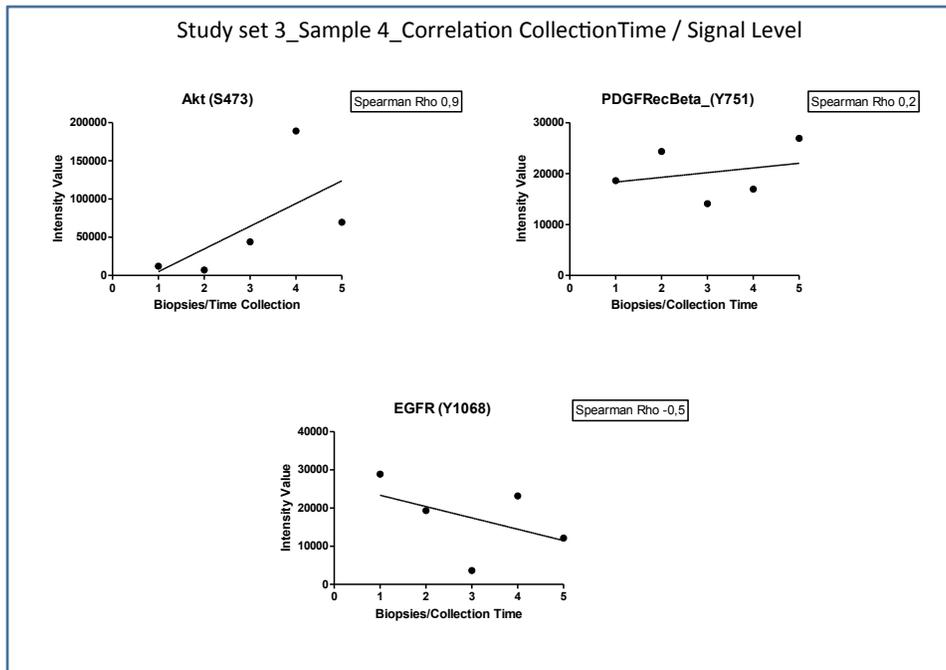


Fig. 37 Grafici di correlazione tra tempi di raccolta delle biopsie dalla stessa lesione e livello del segnale per alcuni endpoints dei campioni 3 e 4. Sull'asse delle ascisse è presente l'ordine in cui le biopsie in considerazione sono raccolte; sull'asse delle ordinate il rispettivo valore di intensità del segnale.

#### 10.4 Valutazione dell'attivazione del segnale tra tessuto intero e LCM: il tessuto intero mostra una più elevata eterogeneità intra-tumorale

La valutazione della differenza di attivazione del segnale nel tessuto intero (whole tissue) delle biopsie e nel corrispettivo LCM sono stati usati i valori di coefficiente di variazione (CV). Per la visualizzazione dei risultati sono stati usati istogrammi con rispettiva valutazione della deviazione standard della media (*standard error of the mean-SEM*).

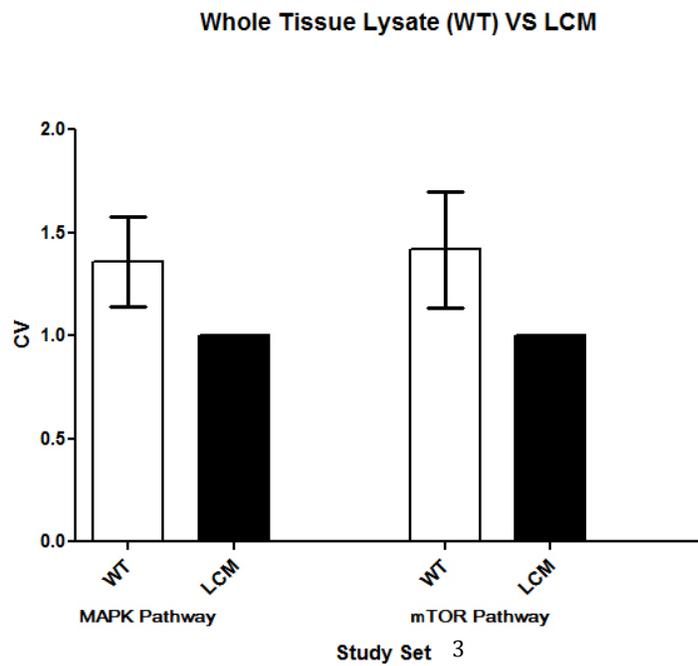


Fig.38 Valutazione dell'attivazione del segnale nel tessuto intero e tessuto LCM nello studio 3

Si può notare che il *fold increase* del CV per il tessuto intero risulta più alto se comparato a quello del materiale LCM per entrambi i pathways (FIG. 38)

# **11. DISCUSSIONE**

L'eterogeneità intra-tumorale è un problema molto attuale nella decisione della terapia da somministrare ai pazienti.

Diversi studi hanno dimostrato la presenza di diversi cloni cellulari a livello genetico.

Le nuove terapie biologiche, però, sono state formulate per agire direttamente sulle proteine e le aberrazioni che esse accumulano durante la tumorigenesi.

In questa seconda parte dello studio, sono stati considerati 3 studi indipendenti per analizzare la possibile eterogeneità intra-tumorale a livello proteico.

Ognuno di questi studi presentava dei punti di debolezza e altri di forza.

Per gli studi 1 e 2, i risultati hanno mostrato che tra due diverse regioni della stessa lesione metastatica, il profilo proteomico è mantenuto globalmente simile.

Va però considerato, in questo risultato, che per lo studio 1 le due regioni considerate risultano molto vicine tra loro. Questo potrebbe portare due problemi:

- 1) un arricchimento di cellule epiteliali della singola regione non accurato, con problemi di inquinamento tra una regione e l'altra all'interno della stessa sezione.
- 2) La possibilità che la ridotta distanza non abbia permesso la selezione di un particolare clone rispetto ad un altro.

Il risultato apportato da questo studio, però, viene confermato appieno dallo studio 2, dove le due regioni considerate per ogni paziente, derivano fisicamente da due biopsie distinte. Ovviamente in questo caso non si può parlare di inquinamento tra una regione e l'altra o di distanza troppo ridotta. Questo studio, infatti, mima perfettamente la possibilità che un'ago-biopsia possa essere prelevata da una regione della lesione tumorale piuttosto che da un'altra e di conseguenza il pericolo di analizzare solo un clone appartenente al tumore e non l'intera lesione.

Il risultato però ha mostrato, anche in questo caso, omogeneità a livello proteomico all'interno della stessa lesione.

Un risultato diverso è stato mostrato dallo studio 3.

Nei tumori primari di ccRCC, infatti, si è notata una diversità nei livelli del segnale proteico all'interno della stessa lesione primaria.

Purtroppo, però, i campioni appartenenti a questo studio non sono stati raccolti e crio-preservati nei tempi adeguati per l'analisi delle fosfoproteine.

Come già mostrato da Espina, le fluttuazioni del fosfo-segnale durante la raccolta dei campioni chirurgici sono notevoli (49).

Anche in questo studio è stato dimostrato quanto la stabilità delle fosfoproteine sia precaria e come le loro fluttuazioni siano imprevedibili nel momento in cui i tempi di raccolta superano quelli indicati dalle linee guida.

Inoltre, i pazienti usati per lo studio 3 sono stati precedentemente analizzati per un altro studio condotto dal gruppo di Gerlinger (47). In questo lavoro, i campioni di ccRCC sono stati esaminati tramite exome sequencing, analisi delle aberrazioni cromosomiche e profilo ploide. Il risultato finale ha riportato una variazione del 63 fino al 69% delle mutazioni somatiche tra le diverse regioni dello stesso tumore. Purtroppo però, Gerlinger ha mostrato una correlazione tra genotipo e fenotipo tramite immuno-istochimica solo per una mutazione di mTOR correlata alla fosforilazione di 4EBP e S6.

Non si può quindi essere certi se questa eterogeneità, riscontrata dagli autori in un singolo paziente, possa interferire con l'attivazione finale del pathway o se altri meccanismi molecolari intervengano al fine di ristabilire il corretto segnale a livello proteico.

Interessante, però è stata la valutazione della la variazione del CV tra tessuto totale e materiale microdissezionato.

In questo caso l'influenza del tempo di raccolta si annulla, perché tessuto LCM e tessuto totale sono derivati da uno stesso campione di tessuto congelato.

La figura 38 rivela un CV inferiore per il materiale LCM rispetto al corrispettivo tessuto totale, dimostrando una minore diversità tra le cellule epiteliali di diverse porzioni dello stesso tumore piuttosto che tra le cellule del tessuto totale.

Questo dato sottolinea l'importanza dell'arricchimento del tessuto che si vuole analizzare.

Infatti, mentre in questi studi eseguiti con materiale LCM non è stata riscontrata divergenza a livello proteomico all'interno della stessa lesione, la maggior parte degli studi genetici riporta una condizione opposta.

Nessuno di questi studi, però, ha previsto un arricchimento epiteliale delle cellule tumorali, ma sono stati valutati contemporaneamente cellule tumorali e stroma adiacente, quindi tessuto totale.

Di conseguenza ci si potrebbe chiedere se il risultato dimostrato da Gerliger sia guidato da un segnale derivante dallo stroma che circonda il tumore o, effettivamente, dal tumore stesso.

Sicuramente la conclusione prodotta dagli studi 1, 2 e, parzialmente, dallo studio 3, permette la chiarificazione di molti dubbi presenti sull'eterogeneità intra-tumorale a livello proteomico.

Molti studi genetici mostrano la presenza di diverse sotto-popolazioni clonali all'interno della stessa massa tumorale, ma bisogna ricordare che le proteine sono il prodotto finale del DNA-RNA e sono soggette a modificazioni post-traduzionali.

Queste modificazioni, che non possono essere lette a livello genomico, guidano i pathway cellulari.

In un recente studio pubblicato su PNAS (48) si dimostra come la variazione intra paziente sia inferiore o nulla rispetto alla variazione riscontrata tra i pazienti, quando si analizzano le chinasi.

In questo studio, Drake esamina i meccanismi di resistenza nascosti dietro l'inefficienza dei farmaci per il cancro della prostata. Usando l'arricchimento di peptidi delle fosfo-tirosine e spettrometria di massa quantitativa, viene rivelata una similitudine nei livelli di attivazione delle maggiori proteine implicate nella formazione del tumore e target dei principali farmaci biologici. Nonostante in questo studio non venga usata la tecnica della microdissezione, è importante notare la differenza nel risultato quando la valutazione dell'eterogeneità è effettuata a livello proteomico anziché genetico.

Esattamente in accordo con questo studio, i miei dati rilevano che, a livello proteomico, la massa tumorale di un paziente è omogenea a livello proteomico, mentre le lesioni sono molto diverse quando si confrontano pazienti diversi, rilevando quindi un'eterogeneità tra pazienti molto più importante di quella all'interno dello stesso paziente.

Grazie a questo studio si è mostrato che un trial clinico per il trattamento di pazienti con terapia biologica non è affetto dal problema dell'eterogeneità intratumorale: infatti la valutazione del profilo proteomico di una lesione tumorale può essere effettuata con una sola biopsia.

Inoltre si sottolinea l'importanza di terapie mirate per ogni singolo paziente, piuttosto che per singole porzioni tumorali.

**Parte 3**

**Conditionally**

**Reprogrammed Cells**

# **12. Introduzione**

## **12.1 Conditionally reprogrammed cells (CRCs): un nuovo modo di concepire le colture cellulari primarie**

Nel febbraio 2012 il gruppo di Schlegel ha dimostrato come una nuova tecnologia permetta la coltura e propagazione indefinita di cellule primarie da quasi ogni tipo di tessuto, senza l'uso di trasduzioni virali o espressione exogena di hTERT (50).

Questo metodo ha rivoluzionato il modo di vedere le colture primarie.

La senescenza cellulare e conseguenza perdita della capacità proliferativa delle cellule derivate dal tessuto dei pazienti, è stata la prima barriera per le colture a lungo termine.

In passato sono stati usati diversi approcci per ovviare questo problema.

Il metodo più usato per immortalizzare queste cellule è la trasformazione con oncogeni virali, soprattutto con l'antigene di SV40 (51).

Questo genere di manipolazioni genetiche, però comporta instabilità genomica con il risultato che dopo pochi passaggi, la cultura cellulare perde le caratteristiche che contraddistinguevano le cellule d'origine.

Un altro approccio è basato sull'uso dell'espressione della sub-unità catalitica della telomerasi (hTERT). Questa può prevenire l'accorciamento dei cromosomi e guidare l'immortalizzazione di alcune cellule. Anche in questo caso le cellule hanno mostrato anomalie dopo diversi passaggi. (52).

Il nuovo approccio presentato dal gruppo di Schlegel, invece, previene il problema della senescenza attraverso l'uso di un inibitore per Rho Kinase e l'uso fibroblasti di topo (J2-3T3) irradiati in co-cultura con le cellule epiteliali di interesse.

L'uso dei fibroblasti irradiati è definito "feeder layer", in quanto questi secernono fattori che aiutano il mantenimento delle cellule epiteliali, senza però invaderne lo spazio. L'irradiazione, infatti, risulta essere necessaria sia per bloccare il ciclo cellulare dei J2-3T3, in modo che questi mantengano la vitalità senza incorrere nella divisione cellulare, ma anche per la produzione di fattori indispensabili alle cellule epiteliali.

Un'altra componente chiave del nuovo metodo è, come detto in precedenza, l'inibitore di ROCK. Questo inibitore aveva già mostrato in precedenza la capacità di immortalizzare keratinociti se combinato con il feeder layer (53)

La combinazione di questi due elementi insieme risulta cruciale per prevenire la trasformazione o senescenza delle colture cellulari.

Gli autori del protocollo si riferiscono a queste cellule come a cellule riprogrammate sotto condizioni (*Conditionally Reprogramming Cells-CRCs*), in quanto è stato possibile coltivare a lungo termine cellule partendo sia da tessuto sano che da tessuto tumorale.

Per documentare ciò, infatti, il gruppo di Georgetown University ha dimostrato che cellule derivanti dal tessuto normale non portavano allo sviluppo del tumore quando iniettate nel topo.

# **13. Scopo del lavoro**

Considerando il risultato degli studi precedenti e la nuova tecnica presentata dal gruppo di Georgetown University, si è pensato che sia quindi possibile usare un'unica biopsia per creare una linea cellulare per ogni paziente e quindi testare i possibili farmaci e le possibili resistenze che le cellule acquisiscono durante la terapia.

Questo permetterebbe di trattare il paziente con il farmaco/i a lui più adatti, al fine di usare una vera e propria medicina personalizzata.

Ovviamente la tecnica usata dal gruppo di Schlegel è relativamente nuova e presenta delle limitazioni, nonostante abbia dei buoni potenziali.

Innanzitutto queste cellule non sono ancora state ben caratterizzate e una comparazione genomica proteomica tra coltura in vitro e il rispettivo tessuto da cui derivano è essenziale per incrementarne l'attendibilità.

Il metodo di digestione tissutale usato in questo protocollo, inoltre, è il medesimo per ogni tipo di tessuto.

Nonostante esso sia stato efficiente nella maggioranza dei tessuti, ha creato degli insuccessi nella messa in coltura di campioni derivanti dal colon.

La spiegazione a questo problema si è trovata nella peculiarità del tessuto colico.

Esso presenta infatti, cripte e cellule *stem-like* che favoriscono il continuo ricambio di cellule all'apice di esse.

Effettuare la digestione di questo tipo di tessuto ugualmente a ogni altro organo, potrebbe portare a un arricchimento di cellule troppo differenziate come i villi intestinali, che non sarebbero in grado di essere riprogrammate.

In precedenza è già stata dimostrata l'importanza dell'arricchimento di cripte per la messa in coltura di tessuto derivante dal colon (54).

Nonostante i progressi prodotti dal gruppo di Clevers, il suo metodo mostra colture di cellule in 3D, sicuramente affascinanti ma meno pratiche per l'uso clinico.

Di conseguenza il protocollo presentato dalla Georgetown University rimane per ora quello più adatto per un eventuale screening di farmaci e analisi di eventuali resistenze che il paziente potrebbe sviluppare.

In questa parte del progetto, si sono usati dei modelli di topi trattati chimicamente con AOM/DSS (55) per la formazione di cancro al colon-retto.

Mentre una metà del tumore derivato da questi topi è stato processato per LCM, l'altra metà è stata usata per la messa in coltura delle linee cellulari.

Trattandosi di cellule epiteliali derivanti dal colon, il protocollo iniziale di digestione è stato modificato, al fine di stabilire un protocollo adatto alle cellule derivanti dal colon retto.

È stato, infatti, usato un protocollo che prevede l'arricchimento delle cellule *stem-like* alla base delle cripte tramite sorbitolo-SDMEM (56).

Questo permette di evitare la contaminazione di villi intestinali, troppo differenziati per essere riprogrammate.

La fusione delle due tecniche ha permesso la messa in coltura di cellule murine e umane. Alcune linee cellulari sono poi state processate con RPPA al fine di confrontare il profilo proteomico tra tessuto LCM e linea cellulare derivata.

# **14. Materiali e Metodi**

## **14.1 Modello murino**

Per il confronto tra tessuto LCM e linee cellulari CRCs, è stato usato un modello murino per il cancro del colon-retto.

3 topi sono stati soggetti a protocollo approvato dalla commissione etica di Georgetown University.

Il protocollo (55) prevede la somministrazione, tramite iniezione, di 10 mg/kg di azoxymethane (AOM), un agente genotossico che causa carcinogenesi del colon. Dopo una settimana, gli animali hanno ricevuto solfato sodio destrano (DSS) diluito al 2% in acqua per 18 giorni.

Il sanguinamento rettale è stato considerato sintomo della presenza di tumore. Gli animali sono stati quindi sacrificati in camera di CO<sub>2</sub>.

## **14.2 Raccolta dei campioni**

Per ogni topo, gli intestini sono stati prelevati, aperti longitudinalmente e lavati con soluzione salina (PBS).

Essi, poi, sono stati controllati al microscopio per accertare la presenza di tumore. Esso è stato poi prelevato, una metà è stata immediatamente inclusa in OCT, per essere sottoposta a successiva microdissezione laser, mentre l'altra metà del tessuto tumorale è stata immersa in un terreno specifico per poi essere processata con metodo CRCs.

Mouse	OCT embedded	CELLS (CRCs)
#1	Tumor1	Tumor 1A
		Tumor 1B
	Normal Tissue	x
#2	Tumor1A	x
	Tumor1B	Tumor 1B
#3	Tumor1A	Tumor 1A
	Tumor1B	x
	Normal Tissue	x

Tab.9 Cellule e relativo tessuto dedicato a LCM

Per il topo #3 è stato collezionato anche il tessuto normale adiacente al tumore. Mentre per il topo #1, cellule epiteliali considerate non tumorigeniche sono state raccolte durante la microdissezione e trattate come un campione separato rispetto a quelle tumorali. Di conseguenza non è però stato possibile creare linee cellulari normali dal tessuto normale del topo #1.

#### 14.2.1 Terreno per il trasporto del tessuto

- 500 ml DMEM
- 20 ml pen/strep (10000 U)
- 2 ml gentamycin (10 mg/ml)
- 1 ml fungizone (250 µg/ml)
- 1 ml nystatin (50mg/ml)

Il terreno viene sterilizzato tramite filtrazione con filtro 0.22 µm.

## **14.3 Processamento CRCs con arricchimento di cripte**

Al fine di procedere alla messa in coltura di cripte derivanti dal tessuto di colon, un protocollo già presente in letteratura (56) è stato adattato e modificato per l'ottenimento finale di CRCs.

### **14.3.1 Reagenti e terreni**

#### **F+Y Media**

- 373 ml DMEM Complete
- 125 ml F12 Nutrient Media
- 0.5 ml Fungizone (250 µg/ml concentrazione finale)
- 0.5 ml Insulin (5 µg/ml concentrazione finale)
- 0.5 ml EGF/Hydrocortisone (10ng/ml-0.4 µg/ml concentrazione finale)
- 4.3 µl Cholera Toxin (8.4 ng/ml concentrazione finale)
- 0.5 Gentamicin (10 µg/ml concentrazione finale)
- 1 ml Y 27632 compound (10 µM concentrazione finale)

Il terreno viene sterilizzato per filtrazione.

#### **Digestion Mix**

- 9 parti F+Y media
- 1 parte Collagenase/Hyaluronidase mix (10X)
- 1.5 ml di Dispase ogni 10 ml di F+Y/Coll/Hyl

#### **Sorbitolo DMEM (S-DMEM)**

DMEM media 500 ml + 10 g Sorbitol (0.11 M final conc.)

Il terreno viene sterilizzato per filtrazione.

## **Condition media**

Partire da una flask T175 di fibroblasti J2 cresciuti in DMEM complete media.

- Tripsinizzarli e centrifugarli a 1500 rpm, per 5 min a 4°C
- Eliminare il surnatante e risospendere il pellet in 3 ml di DMEM complete fresco
- Irradiare i fibroblasti a 3000 rad
- Piastrare i fibroblasti irradiati (feeder cells) con F+Y media a una confluenza dell' 80%. Lasciare le piastre in incubatore per 3 giorni
- Collezionare il media e centrifugarlo a 1500 rpm per 5 min a 4°C
- Collezionare il surnatante e aggiungere Y-27632 compound 1:1000
- Diluire il nuovo media 3:1 con F+Y media fresco (3 parti Condition Media:1 parte F+Y)

## **14.4 Digestione del tessuto e arricchimento delle cripte**

Il tessuto è stato trasferito dal terreno di trasporto a una piastra petri sotto cappa biologica. Qui il terreno è stato aspirato, il tessuto lavato con etanolo e PBS due volte e successivamente tagliato in pezzi piccoli al fine di aiutare la digestione enzimatica che avviene a 37°C per almeno due ore.

Dopo l'incubazione, il contenuto della digestione (materiale non digerito e surnatante) viene diviso tra due tube sterili da 50 ml e nominati "set1". Qui viene aggiunto S-DMEM in rapporto 1:1. Il contenuto è stato fatto sedimentare per un minuto, durante il quale tutto il materiale non digerito si troverà poi sul fondo del tubo. Questo processo è stato ripetuto per 3 volte. Infine, il surnatante contenente

cripte e altri residui viene centrifugato a 200g per 4 min (le cripte saranno nel pellet, mentre nel surnatante si troveranno batteri e cellule singole). I lavaggi sono stati ripetuti almeno 4-5 volte, fino a che il pellet non risulta pulito. Esso, quindi può essere risospeso in condition media per 2 giorni (FIG.39).

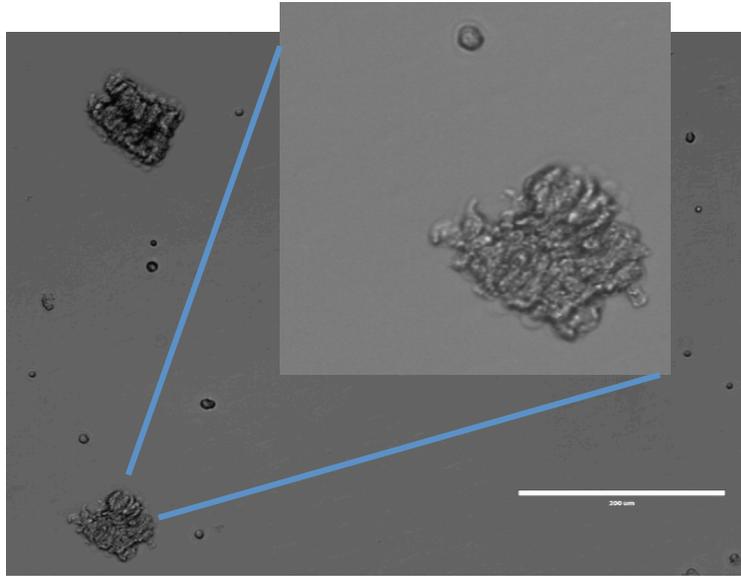


Fig. 39 Cripte in piastra dopo l'arricchimento tramite il protocollo con S-DMEM

Questo permetterà alle crypte di essere adese alla piastra prima dell'aggiunta del layer di feeder cells.

I fibroblasti J2, irradiati, vengono aggiunti al terzo giorno.

## 14.5 Mantenimento delle colture “cripte-CRCs”

Una volta aggiunto il layer di feeder cells, per il mantenimento di queste cellule è stato usato lo stesso protocollo impiegato per le colture di CRCs.

- Durante la settimana lo strato di feeder cells è stato sostituito due volte con un nuovo strato di J2 irradiati nello stesso giorno.
- Per separare la popolazione di cellule epiteliali e fibroblasti irradiati, sono state usate due diverse tripsinizzazioni.

Per il cambio dei feeders è stata usata una tripsinizzazione definita “veloce”: 30 secondi a un massimo di 1 minuto a temperatura ambiente sono sufficienti per staccare le cellule irradiate dalla piastra. L’azione della tripsina è stata costantemente monitorata al microscopio e bloccata con DMEM completo. Questo è stato poi aspirato dalla flask, dove F+Y fresco e nuovi feeder cells vengono aggiunti.

Se, invece, le cellule epiteliali devono essere piastrate nuovamente in una flask di dimensioni maggiori, dopo la tripsinizzazione “veloce” , si effettua un’ulteriore tripsinizzazione standard (5 minuti a 37°C).

## **14.6 Lisi delle cellule per RPPA**

Queste linee cellulari sono state valutate con RPPA per confrontarne il profilo proteomico con il rispettivo materiale LCM.

Prima della lisi cellulare, I fibroblasti irradiati sono stati eliminati e le cellule sono state cresciute in condition media per circa 2 giorni, al fine di eliminare ogni contaminazione da cellule non epiteliali.

Successivamente le cellule sono state staccate dalla piastra con uno scraper e pellettate. Il pellet è stato conservato a -80°C.

Il seguente buffer è stato usato per la lisi:

## **Lysis buffer**

- 915 ul TPER
- 60ul 5M NaCl
- 10 ul 100 mM Sodium Orthovanadate
- 10 ul Pefabloc
- 1 ul 5 mg/ml Aproptin
- 5 ul Pepstatin A (5ug/ml final conc)
- 1 ul Leupeptin (5ug/ml final conc)

Per determinare la concentrazione di proteine nel lisato è stato effettuato il saggio di Bradford e infine i lisati sono stati diluiti a una concentrazione finale di 1 mg/ml con 2X Tris-Glycine SDS Buffer +5% 2-mercaptoethanol

I lisati cellulari sono stati, quindi, bolliti prima della deposizione su supporto di nitrocellulosa (printing).

I campioni inclusi in OCT sono stati microdissezionati come descritto in precedenza.

Nessun cambiamento è stato effettuato durante la procedura per RPPA.

# **15.Risultati**

## 15.1 La valutazione dei tessuti di topo con RPPA ha mostrato omogeneità intra-tumorale a livello proteomico

Per i topi #2 e #3 è stato possibile dividere il tumore in 2 frammenti diversi che sono stati microdissezionati.

Purtroppo il tumore del topo#1 era di dimensioni troppo ridotte per consentire la suddivisione del campione in due diverse inclusioni in OCT.

Di conseguenza i campioni derivanti dai topi #2 e #3 sono stati valutati per un'ulteriore conferma sull'omogeneità intra-tumorale a livello proteomico (FIG.40)

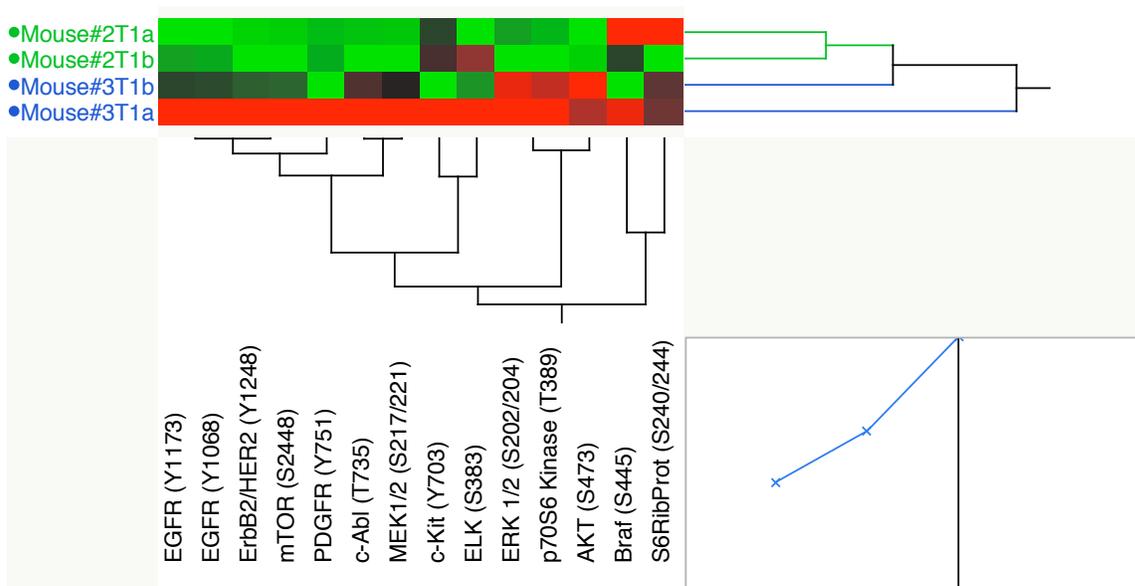


Fig 40 Clusterizzazione gerarchica dei campioni derivanti dai topi #2 e #3. a e b sono per i diversi frammenti dello stesso tumore

Inoltre dal mouse#1 è stata microdissezionata la regione di tessuto normale adiacente, mentre per il mouse#3 un frammento di colon che non presentava tumore è stato collezionato e microdissezionato.

Di conseguenza si è dimostrato, con un cluster gerarchico, come il tessuto tumorale differisca da quello normale, sebbene questo presenti conformazioni adenomatose (FIG 41).

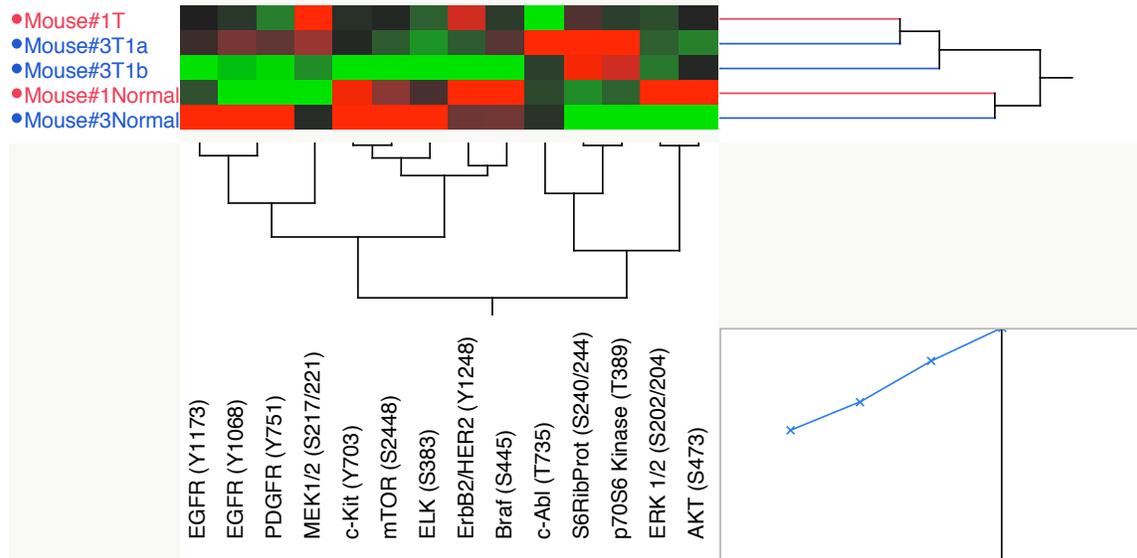


Fig. 41 Clusterizzazione gerarchica di tessuti normali (N) e tumorali (T) per i topi #1 e #2

## 15.2 Il protocollo per l'arricchimento di cripte del colon di topi può essere abbinato al procedimento di CRCs per la produzione di linee cellulari stabili nel tempo

In questa parte dello studio si è esaminata la possibilità di creare linee cellulari da cripte di colon e stabilizzarle con l'innovativo metodo presentato dal gruppo di Schlegel.

Le linee cellulari stabilite dopo l'arricchimento di cripte hanno mostrato stabilità nel tempo (FIG 42).

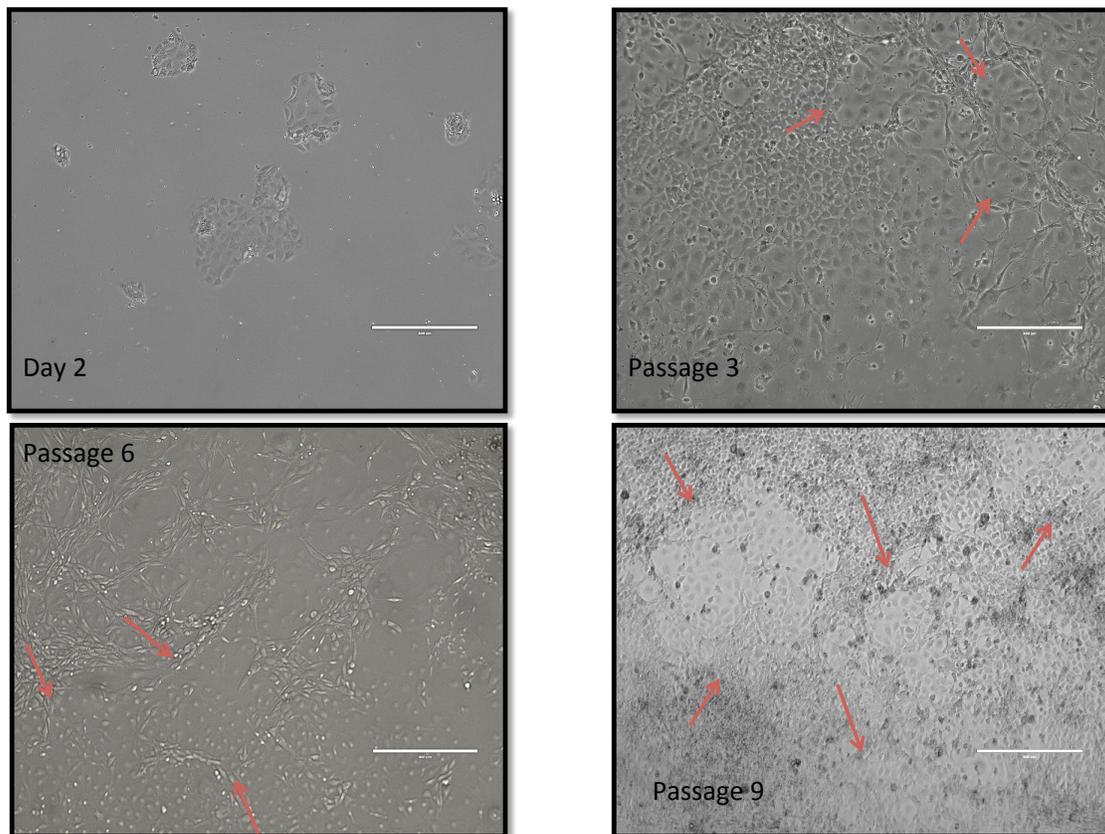


Fig. 42 Primi passaggi di una delle linee cellulari di topo derivanti da cripte del colon

Nelle immagini raccolte dei primi 10 passaggi, si può notare l'effetto definito *push-up* da parte delle cellule epiteliali, le quali spingono lo strato di feeder cells al fine di recuperare spazio e far crescere le colonie.

### **15.3 Il confronto tra il segnale proteico delle linee cellulari e il rispettivo materiale LCM mostra una similarità nella maggioranza dei casi**

Per valutare se le nuove linee cellulari stabilizzate hanno mantenuto caratteristiche simili al tessuto di origine, sono stati valutati alcuni endpoints con i cluster gerarchici.

Per ogni frammento incluso in OCT, è stato lisato anche il tessuto totale, in modo da stabilire se le linee cellulari avessero un segnale simile a quello delle cellule epiteliali o più simile a quello derivante da cellule epiteliali e stromali

Nel topo#1 si sono ottenute due linee cellulari da un unico frammento e un solo frammento è stato incluso in OCT per la successiva microdissezione.

Come si può notare una delle linee cellulari clusterizza direttamente con il frammento (FIG.43).

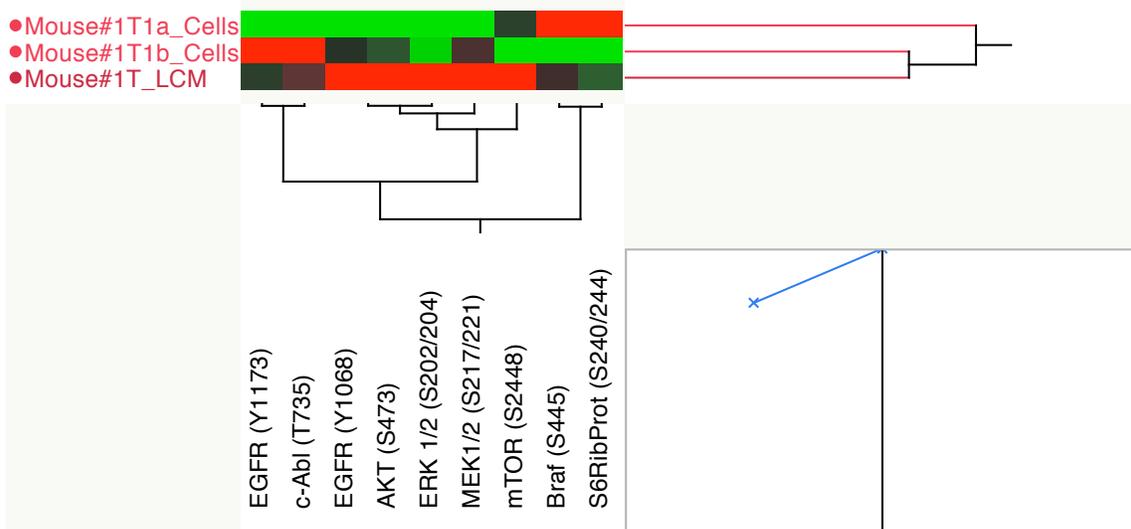


Fig.43 Clusterizzazione delle linee cellulari tumorali con tessuto LCM per il mouse#1

Quando nel cluster viene aggiunto il tessuto totale, si nota che le cellule continuano ad essere più simili al materiale microdissezionato, mentre il tessuto totale crea un cluster separato (FIG.44)

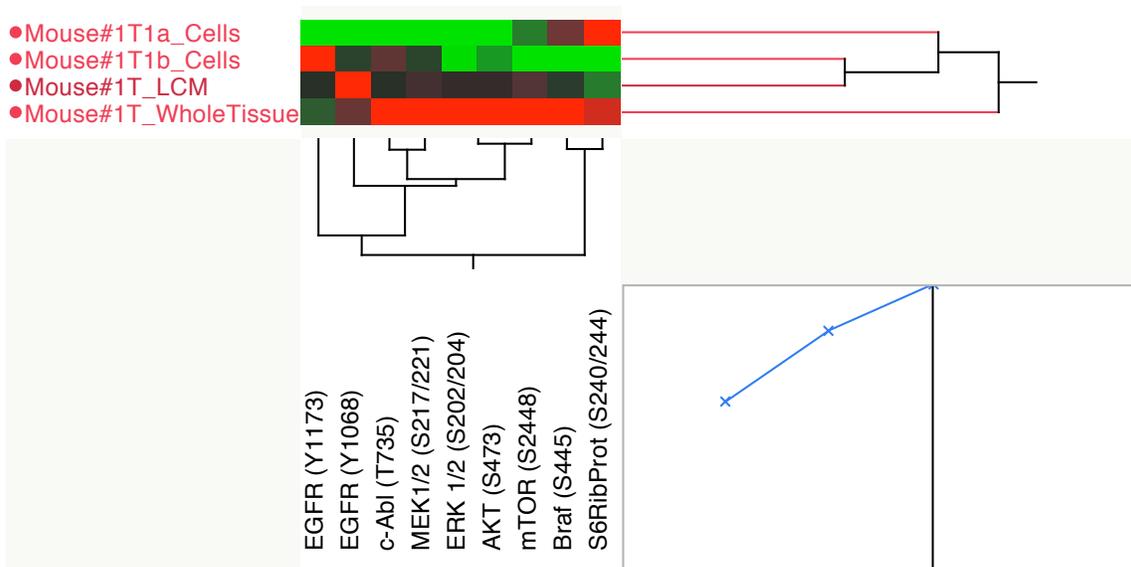


Fig.44 Clusterizzazione delle linee cellulari tumorali con tessuto LCM e tessuto totale per il mouse#1

Una situazione simile avviene per il mouse#2.

In questo caso però non è stato possibile analizzare la linea cellulare derivante da uno dei frammenti tumorali (FIG.45).

Nel cluster, però, si può vedere che l'altra linea cellulare clusterizza perfettamente con il frammento di derivazione.

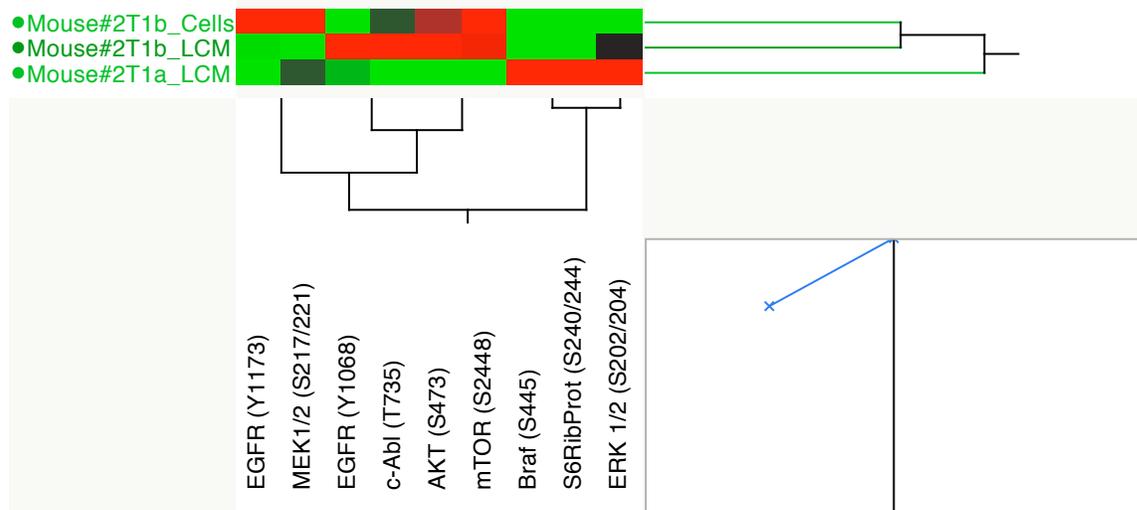


Fig.45 Clusterizzazione delle linee cellulari tumorali con tessuto LCM per il mouse#2

Nel momento in cui si aggiungono i lisati totali dei tessuti, la clusterizzazione non cambia per quanto concerne la linea cellulare. Il suo segnale rimane simile a quello del tessuto LCM.

I tessuti totali creano un raggruppamento separato (FIG.46).

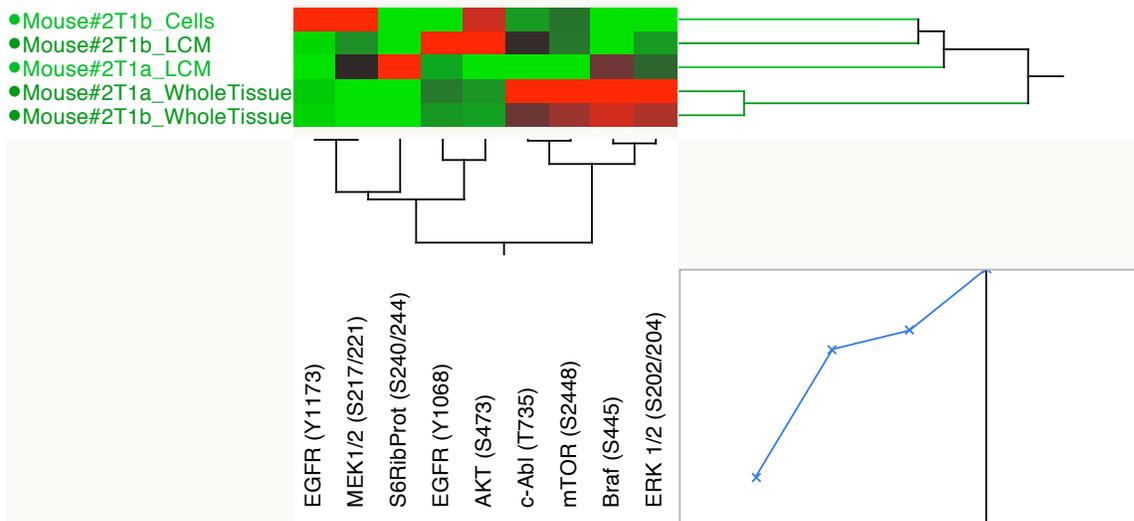


Fig.46 Clusterizzazione delle linee cellulari tumorali con tessuto LCM e tessuto totale per il mouse#2

Anche nel mouse #3 la valutazione è ridotta a due campioni microdissezionati e una linea cellulare, ma la situazione cambia (FIG.47).

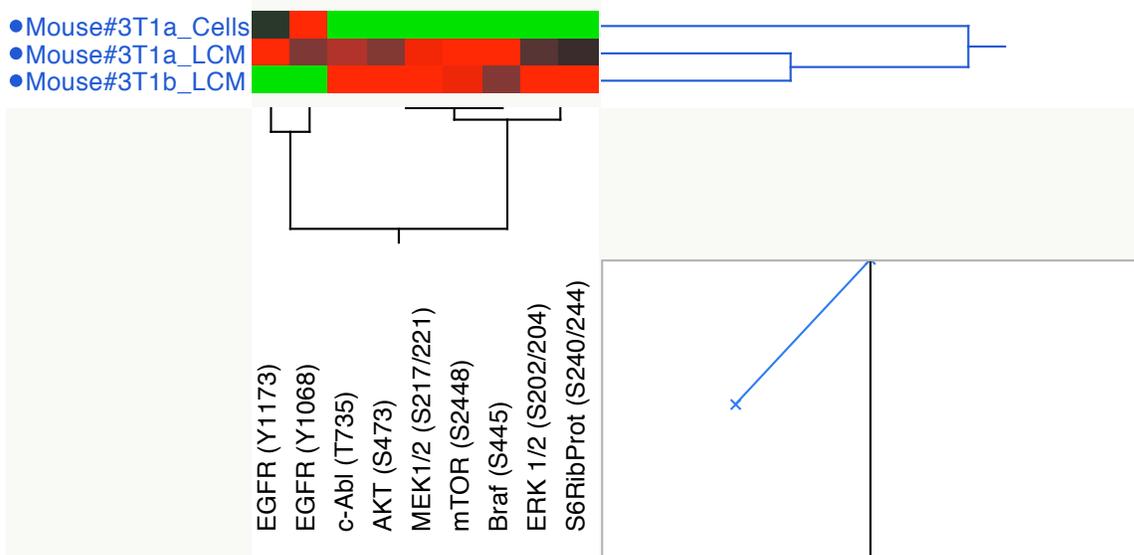


Fig. 47 Clusterizzazione delle linee cellulari tumorali con tessuto LCM per il mouse#3

Il cluster gerarchico mostra, infatti, che la linea cellulare crea un raggruppamento separato rispetto al materiale LCM.

La situazione non cambia nel momento in cui si aggiunge il tessuto intero alla clusterizzazione (FIG.48).

Questo infatti si separa in un altro cluster.

Di conseguenza le cellule sembrano avere un profilo che non è simile né alle cellule epiteliali né al tessuto totale.

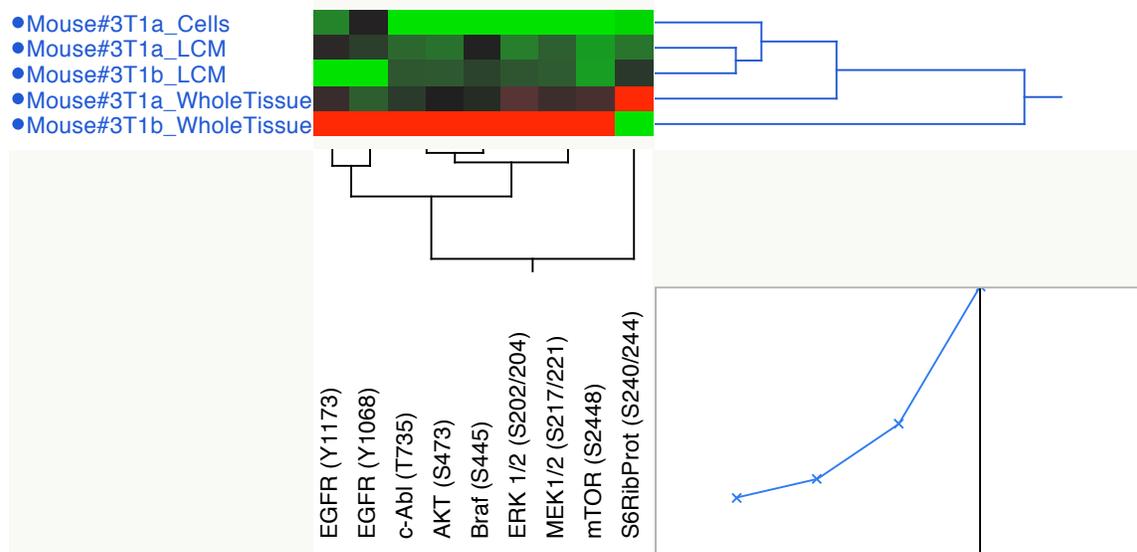


Fig.48 Clusterizzazione delle linee cellulari tumorali con tessuto LCM e tessuto totale per il mouse#3

# **16.DISCUSSIONE**

I risultati della prima parte del mio studio hanno dimostrato una tendenza proteomica omogenea all'interno dello stesso paziente.

Questo sottolinea che una singola biopsia è rappresentativa dell'intero tumore e che quindi potrebbe essere usate per creare delle linee cellulari primarie per ogni singolo paziente.

La messa in coltura di linee cellulari primarie è sempre stata una soluzione a cui la ricerca clinica ha guardato con molto fascino.

Questa avrebbe, infatti, infinite applicazioni in campo clinico.

A oggi però nessuna tecnica aveva permesso la propagazione di linee cellulari derivate dal tessuto del paziente, senza che esse fossero trasformate a livello genomico.

Con l'introduzione della nuova tecnica da parte del gruppo di Georgetown University, si aprono molte nuove opportunità.

La prima e già in atto, è la possibilità di poter creare una bio-banca collezionando il tessuto normale e corrispondente tessuto tumorale per ogni paziente.

Inoltre, l'analisi delle linee cellulari primarie può portare a capire in tempo eventuali meccanismi di resistenza ai farmaci, e prevenirli testando le cellule con un *high-throughput* test.

Di massima importanza è anche la capacità di questo metodo di stabilire linee cellulari da una piccola biopsia (si parla anche di una frazione di agobiopsia, *fine needle biopsy*). Questo consentirebbe un'analisi simultanea di tessuto congelato e linea cellulare, al fine di predire la miglior terapia per ogni singolo paziente.

La valutazione di questa tecnica ha portato a capirne gli aspetti positivi e quelli negativi.

Purtroppo questo protocollo è ancora troppo nuovo perché sia considerato un ottimo strumento per la clinica.

Infatti, necessita ancora di numerosi altri studi che confermino la stabilità delle cellule e la loro similarità con il tessuto d'origine.

Il primo punto debole riscontrato è stato l'uso di un unico protocollo di digestione per tutti i tipi di tessuto.

Considerando che ogni tessuto nell'organismo ha caratteristiche peculiari e che in questa tecnica si cerca di portare a uno stadio di de-differenziazione le cellule al fine di renderle immortali, si è pensato di validare un protocollo specifico per il tessuto di colon e l'arricchimento di cripte.

I dati preliminari raccolti sono stati basati sulla messa a punto di un nuovo protocollo, originato da uno già presente in letteratura, e modificato sulla base della tecnica CRCs.

L'uso di sorbitolo-DMEM per l'arricchimento di cellule delle cripte ed eliminazione dei villi, cellule molto differenziate, permette la messa in coltura di cellule adatte al de-differenziamento e stabili nel tempo.

La prima analisi di questi dati, inoltre ha permesso un confronto tra il profilo proteomico delle linee cellulari sia con le cellule del tessuto LCM, che con quelle del tessuto totale da cui derivano.

Questo tipo di studio a livello proteomico, con cellule CRCs non era ancora stato effettuato in precedenza.

I risultati hanno mostrato una compatibilità tra profilo proteomico della linea cellulare e quello del tessuto di 3 linee cellulari su 4.

Inoltre è stato anche mostrato che queste linee cellulari mantengono maggiormente il profilo proteomico del materiale microdissezionato e quindi direttamente delle cellule epiteliali neoplastiche, piuttosto che del tessuto totale, dove l'infiltrazione di stroma crea un impedimento alla valutazione del segnale tumorale.

Sicuramente bisogna sottolineare che l'esiguo numero di campioni considerati durante la valutazione dei cluster gerarchici potrebbe aver influenzato l'analisi statistica, quindi questi dati possono esclusivamente essere considerati preliminari. Nonostante ciò, i nostri dati sono molto incoraggianti e permettono di continuare a valutare le CRCs nelle loro infinite future applicazioni.

# **17. Conclusioni Generali**

In questo studio è stata posta l'attenzione su una particolare piattaforma, LCM/RPPA.

Questa permette la valutazione di campioni con una tecnica *high throughput* lavorando con una ridotta quantità di cellule.

L'uso di questa piattaforma è abbastanza innovativo per l'analisi di un trial.

Abbiamo quindi pensato all'importanza di testare queste tecniche con un trial già in atto, al fine di provarne l'utilità in ambito clinico.

Sono stati quindi analizzati i primi 3 campioni di uno studio clinico iniziato nel giugno 2013 presso la Georgetown University.

I pazienti erano affetti da cancro al colon retto con metastasi in diversi organi, quali polmone, fegato ed omento.

Solo i primi due sono stati analizzati nella loro situazione pre e post trattamento.

Grazie all'analisi effettuata con RPPA di ago-biopsie microdissezionate tramite LCM, si sono potuti rivelare i meccanismi di resistenza acquisiti dal paziente in cui la terapia Cetuximab/Nilotinib non ha funzionato.

In questo campione, *Patient#2*, infatti, c-Abl e il pathway di mTOR risultano iper-attivati dopo il trattamento.

La correlazione tra resistenza a Nilotinib e mTOR non è nuova in letteratura. Diversi recenti studi hanno mostrato che inibire il pathway di mTOR può ristabilire la risposta al farmaco in cellule di leucemia mieloide acuta (33), e che cellule resistenti a questo inibitore delle TK mostrano un'attivazione costitutiva di PI3K/AKT/mTOR/p70S6kinase (34). Queste informazioni si riscontrano perfettamente nei nostri dati.

I grafici mostrano, infatti, un'elevata attivazione di AKT e p70S6Kinase nella biopsia post trattamento, con un livello di segnale rispettivamente 0.71 e 1.27 volte

superiore alla biopsia pre trattamento. Molto interessante risulta essere l'attivazione di S6RibosomalProtein, che ha un livello del segnale 3.6 volte superiore a alla biopsia prelevata prima del trattamento. Questa proteina è un substrato di mTOR e probabilmente il meccanismo di resistenza a Nilotinib è legato alla sua fosforilazione.

Colpire il pathway di mTOR con Rapamycin ha già dimostrato un'efficacia anticancro (35). Effetti dell'inibitore di mTOR su pazienti affetti da CML resistenti a Imatinib sono già stati mostrati (36).

Questi risultati, anche se preliminari, guidano l'idea che sarebbe interessante testare i pazienti durante il trattamento, valutare le eventuali resistenze e modificare la terapia basandosi sui pathway iper-attivati.

Questi dati hanno ulteriormente dimostrato l'importanza di questa piattaforma nell'analisi clinica e hanno quindi spostato la nostra attenzione sulla terapia delle metastasi epatiche da colon retto. Queste affliggono il 40-50% dei pazienti e tra questi solo il 10% risulta avere una lesione resecabile, considerando che la resecabilità risulta, ad oggi, l'unica vera cura.

Sono state, quindi, analizzate 28 metastasi epatiche, con lo scopo di individuare una chiave molecolare nella resecabilità delle lesioni.

Infatti, oggi, l'unico trattamento efficace per la cura delle metastasi epatiche risulta essere quello chirurgico.

Il nostro studio ha mostrato una netta differenza tra il profilo proteomico delle lesioni epatiche resecabili e quello di quelle non resecabili.

In quest'ultime si è notata un'interessante iper-attivazione di alcuni endpoints, quali EGFR e Aurora Kinase.

I nostri dati hanno mostrato un'iper-attivazione nel gruppo delle lesioni resecabili non solo di EGFR, ma anche di molte proteine downstream, dimostrando che bloccare questa proteina porterebbe a una riduzione dei segnali di proliferazione, e differenziazione delle cellule tumorali.

Considerando, inoltre, che Aurora Kinase gioca un ruolo indispensabile nel ciclo replicativo cellulare, sono stati valutati fattori quali Ki67 e Cyclin B, per verificare se l'iper-attivazione di Aurora fosse un singolo hit o se guidasse effettivamente a una maggiore replicazione cellulare.

Per entrambi gli endpoints analizzati, i nostri dati hanno mostrato un aumento dell'attivazione delle proteine nelle lesioni non resecabili.

Recenti studi (39, 40) hanno mostrato il coinvolgimento di Aurora Kinase nelle metastasi al fegato e la sua correlazione con una cattiva prognosi.

Di conseguenza, a nostro parere sarebbe importante effettuare un trial che combini farmaci contro il recettore EGF e contro Aurora kinase, per una terapia neoadiuvante, considerando che il sinergismo dei due inibitori, quali Cetuximab e PHA-683632, è già stato provato in vitro (41).

Sicuramente questo trial non potrà essere effettuato in un unico step, in quanto, mentre, l'inibizione di EGFR è già nella pratica comune per il trattamento neoadiuvante, Aurora Kinase è una proteina entrata da pochi anni nell'attenzione degli studiosi. Sarebbe quindi necessario eseguire un primo trial che mostri l'attività di un inibitore per Aurora kinase nel trattamento delle metastasi epatiche, al fine di testarlo, successivamente in combinazione con Cetuximab.

Oggi, però, è sorta una nuova problematica per l'inizio di un nuovo trial.

Molti studi, infatti, hanno documentato l'eterogeneità intratumorale a livello genetico. Ci siamo quindi chiesti se effettivamente una singola ago-biopsia possa essere rappresentativa dell'intero tumore. Considerando che i nuovi farmaci per la

terapia mirata sono diretti contro proteine e le loro modificazioni post-traduzionali, il nostro studio ha previsto un'analisi dell'eterogeneità intra-tumorale a livello proteomico.

Sono stati analizzati 3 studi indipendenti.

Questi hanno mostrato una generale omogeneità all'interno dello stesso tumore, e contemporaneamente una maggiore eterogeneità tra i diversi pazienti, sottolineando l'importanza di una terapia mirata per ogni singola persona.

Questo ha permesso quindi di dedurre che una singola biopsia può essere usata per la valutazione del tumore, se ci si focalizza sul livello proteomico della lesione.

Di conseguenza la terapia biologica effettuata con anticorpi monoclonali o inibitori delle tirosin-kinasici non dovrebbe essere affetta dall'eterogeneità intra-tumorale riscontrata a livello genico; risulta, però, sempre più importante un avanzamento nella medicina personalizzata, al fine di superare le differenze che caratterizzano i diversi pazienti.

Considerando ciò e considerando che la disponibilità dei campioni clinici non è mai sufficiente per un'analisi completa del paziente, che comprenda analisi genomica, proteomica, mRNA etc, ci si è chiesti se fosse possibile, da una singola biopsia o parte di essa, creare una linea cellulare che possa essere stabile nel tempo, ma anche riprodurre il profilo delle cellule del tessuto in modo fedele.

Usando il nuovo metodo CRCs, inventato presso i laboratori di Georgetown University, è stato possibile creare un nuovo protocollo per l'arricchimento di cripte da cancro del colon-retto e la stabilizzazione delle linee cellulari.

Parte del tessuto è stata conservata in OCT e sottoposta a LCM, mentre l'altra metà è stata usata per la stabilizzazione delle linee cellulari primarie.

Il profilo proteomico di queste è stato poi confrontato con il rispettivo tessuto di provenienza.

Per due topi sui 3 considerati, i profili proteomici di linee cellulari e tessuto hanno mostrato una grande somiglianza.

Nonostante questi dati debbano essere validati con linee cellulari e tessuti umani, creano un grande entusiasmo in campo scientifico, portando a credere che ora si sia in grado di poter creare e stabilire una linea cellulare primaria senza l'uso di vettori virali e quindi senza trasformazioni a livello genomico.

Questo studio, diviso in 3 parti, ha posto l'attenzione nell'uso di LCM/RPPA nell'era della terapia personalizzata.

Si è mostrato che:

1) Grazie a queste tecniche è possibile effettuare una stratificazione dei pazienti in base al loro profilo proteomico.

2) Questa stratificazione è perfetta per la scelta della giusta terapia da utilizzare per ogni singolo paziente, ma anche nella valutazione di nuovi farmaci per la creazione di nuovi studi clinici.

4) L'eterogeneità intra tumorale, a livello proteomico, è inferiore rispetto all'eterogeneità tra pazienti. Di conseguenza è più importante la stratificazione tra i pazienti per una medicina personalizzata, che un'analisi di diverse biopsie dello stesso tumore.

5) Con una singola biopsia è possibile valutare l'esatto profilo dell'intero tumore, ma anche stabilire linee cellulari primarie che riprodurranno un profilo proteomico delle cellule epiteliali del tumore d'origine.

Ovviamente questi dati devono essere validati, in quanto ognuno di questi studi può vantare dei punti di forza, come anche mostrare punti di debolezza. Tra questi il più importante è il ridotto numero di campioni analizzati.

Nonostante ciò l'uso della piattaforma LCM/RPPA si è dimostrato ottimale nella stratificazione dei pazienti nell'era della terapia personalizzata.

# Bibliografia

1. Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67.
2. Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996 Oct 18;87(2):159-70.
3. World Health Organization, febbraio 2006
4. Cannon-Albright LA, Common inheritance of susceptibility to colonic adenomatous polyps and associated colorectal cancers. *N Engl J Med*. 1988 Sep 1;319(9):533-537.
5. NCCN guidelines
6. Field K, Lipton L. Metastatic colorectal cancer-past, progress and future. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3806-15.
7. Ries LAG. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005, National Cancer Institute. Bethesda, MD
8. Sanoff, HK. Sargent, Survival update and prognostic factor analysis of oxaliplatin (Ox) and irinotecan (Iri) combinations for metastatic colorectal cancer (MCRC). *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2007; 25 (18 suppl): 4067.
9. Adam R, Tumor progression while on chemotherapy: a contraindication to liver resection for multiple colorectal metastases? *Ann Surg* 2004; 240: 1052-1061
10. Smith MD,. Systematic review of tumour number and outcome after radical treatment of colorectal liver metastases. *Br J Surg* 2009; 96: 1101-1113 [PMID: 19787755 DOI:10.1002/bjs.6735
11. Bilchik AJ,. Prognostic variables for resection of colorectal cancer hepatic metastases: an evolving paradigm. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 5320-1.

12. Barone C., Final analysis of colorectal cancer patients treated with irinotecan and 5-fluorouracil plus folinic acid neoadjuvant chemotherapy for unresectable liver metastases. *Br J Cancer* 2007; **97**: 1035-9.
13. Pozzo C, Neoadjuvant treatment of unresectable liver disease with irinotecan and 5-fluorouracil plus folinic acid in colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2004; **15**: 933-9.
14. Silvestri A., Individualized therapy for metastatic colorectal cancer. *J Intern Med.* 2013 Jul;274(1):1-24. doi: 10.1111/joim.12070
15. Grothey A., Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil–leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol* 2004;22(7):1209–14.)
16. Peppercorn PD, Demonstration of hepatic steatosis by computerized tomography in patients receiving 5-fluorouracil-based therapy for advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 77:2008–2011.
17. Kooby DA, Impact of steatosis on perioperative outcome following hepatic resection. *J Gastrointest Surg* 7:1034–1044
18. Aloia T, Liver histology and surgical outcomes after preoperative chemotherapy with fluorouracil plus oxaliplatin in colorectal cancer liver metastases. *J Clin Oncol* 24:4983–4990 41
19. Vauthey JN, Chemotherapy regimen predicts steatohepatitis and an increase in 90-day mortality after surgery for hepatic colorectal metastases. *J Clin Oncol* 24:2065–2072 42
20. Karoui M, Influence of preoperative chemotherapy on the risk of major hepatectomy for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 243:1–7 43.
21. Nakano H, Sinusoidal injury increases morbidity after major hepatectomy in patients with colorectal liver metastases receiving preoperative chemotherapy. *Ann Surg* 247:118–124)
22. Fearon ER, Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247: 49–56, 1990
23. Kim GP, Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J Clin Oncol* 25:767–772, 2007
24. Pullarkat ST, Thymidylate synthase gene polymorphism determines response

- and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 1:65–70, 20017
25. Villafranca E, Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol* 19:1779–1786, 2001)
  26. Manning G., The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002 Dec 6;298(5600):1912-34.
  27. Spector M, Phosphorylation of the beta subunit of Na+K+ATPase in Ehrlich ascites tumor by a membrane-bound protein kinase. *J Biol Chem*. 1980 Sep 25;255(18):8370-3.
  28. Gallagher RI., Laser capture microdissection: Arcturus(XT) infrared capture and UV cutting methods. *Methods Mol Biol*. 2012;823:157-78. doi: 10.1007/978-1-60327-216-2\_11.
  29. Emanuel F. Petricoin III, Mapping Molecular Networks Using Proteomics: A Vision for Patient-Tailored Combination Therapy *J Clin Oncol*. 2005 May 20;23(15):3614-21.
  30. Silvestri A, Protein pathway activation mapping of colorectal metastatic progression reveals metastasis-specific network alterations. *Clin Exp Metastasis*. 2013 Mar;30(3):309-16. doi: 10.1007/s10585-012-9538-5. Epub 2012 Sep 29
  31. Belluco C, Kinase substrate protein microarray analysis of human colon cancer and hepatic metastasis. *Clin Chim Acta*. 2005 Jul 24;357(2):180-3
  32. Ding J., Inhibition of PI3K/mTOR Overcomes Nilotinib Resistance in BCR-ABL1 Positive Leukemia Cells through Translational Down-Regulation of MDM2. *PLoS One*. 2013 Dec 11;8(12):e83510. doi: 10.1371/journal.pone.0083510. eCollection 2013
  33. Airiau K., PI3K/mTOR pathway inhibitors sensitize chronic myeloid leukemia stem cells to nilotinib and restore the response of progenitors to nilotinib in the presence of stem cell factor. *Cell Death Dis*. 2013 Oct 3;4:e827. doi: 10.1038/cddis.2013.309.
  34. Quentmeier H, BCR-ABL1-independent PI3Kinase activation causing imatinib-resistance. *J Hematol Oncol*. 2011 Feb 7;4:6. doi: 10.1186/1756-8722-4-6
  35. Guertin DA, Sabatini DM: An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med* 2005, 11:353-361
  36. Sillaber C, Evaluation of antileukaemic effects of rapamycin in patients with

- imatinib resistant chronic myeloid leukaemia. *Eur J Clin Inv* 2008, 38:43-52.
37. Giet R. Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *Journal of Cell Science* 112 (1999) 3591–3601).
  38. Hartsink-Segers SA, Aurora kinases in childhood acute leukemia: the promise of aurora B as therapeutic target. *Leukemia*. 2013 Mar;27(3):560-8. doi: 10.1038/leu.2012.256. Epub 2012 Sep 3.
  39. Fraedrich K, Targeting aurora kinases with danusertib (PHA-739358) inhibits growth of liver metastases from gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in an orthotopic xenograft model. *Clin Cancer Res*. 2012 Sep 1;18(17):4621-32. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2968. Epub 2012 Jul 2
  40. Goos JA, Aurora kinase A (AURKA) expression in colorectal cancer liver metastasis is associated with poor prognosis. *Br J Cancer*. 2013 Oct 29;109(9):2445-52. doi: 10.1038/bjc.2013.608. Epub 2013 Oct 8.
  41. Astsaturov I. Synthetic lethal screen of an EGFR-centered network to improve targeted therapies. *Sci Signal*. 2010 Sep 21;3(140):ra67. doi: 10.1126/scisignal.2001083
  42. Maser RS. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science* 297:565-69
  43. Artandi SE, DePinho RA. 2010. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 31:9–18
  44. Meyerson M, Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 685-96
  45. Goranova TE Dynamics of cancer cell subpopulations in primary and metastatic colorectal tumors. *Clin Exp Metastasis*. 2011 Jun;28(5):427-35. doi: 10.1007/s10585-011-9381-0. Epub 2011 Mar 5.
  46. Yachida S., Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*, 2010, 467: 1114-7
  47. Gerlinger M, Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*, 2012, 366: 883-92
  48. Drake JM Metastatic castration-resistant prostate cancer reveals inpatient similarity and interpatient heterogeneity of therapeutic kinase targets. , *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 3;110(49):E4762-9. doi: 10.1073/pnas.1319948110. Epub 2013 Nov 18.
  49. Espina VA portrait of tissue phosphoprotein stability in the clinical tissue procurement process. *Mol Cell Proteomics*. 2008 Oct;7(10):1998-2018. doi: 10.1074/mcp.M700596-MCP200. Epub 2008 Jul 30.

50. Liu X. ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *Am J Pathol.* 2012 Feb;180(2):599-607. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.10.036. Epub 2011 Dec 18
51. Bartek J. Efficient immortalization of luminal epithelial cells from human mammary gland by introduction of simian virus 40 large tumor antigen with a recombinant retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:3520-3524
52. Toouli CD, Comparison of human mammary epithelial cells immortalized by simian virus 40 T-Antigen or by the telomerase catalytic subunit. *Oncogene.* 2002;21:128-139
53. Chapman S, Human keratinocytes are efficiently immortalized by a Rho kinase inhibitor. *J Clin Invest* 2010, 120:2619-2626
54. Barker, N., The intestinal stem cell. *Genes Dev.* 22, 1856-1864 (2008).
55. Tanaka TA novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* 2003 Nov;94(11):965-73.
56. Booth C., Isolation and culture of intestinal epithelial cells, in *Culture of Epithelial Cells*, Wiley-Liss, Inc., New York: 303-335.

# Ringraziamenti

Ringrazio il CRO di Aviano e il reparto di Oncologia Sperimentale 2, dove ho intrapreso questa ricerca.

Grazie alla Dr.ssa Alessandra Silvestri per tutto ciò che mi ha insegnato e per avermi accompagnato nel mio viaggio negli USA, nei laboratori della George Mason University.

Grazie alla Dr.ssa e amica Pellicani per il suo sostegno.

Un grazie alla Dr.ssa Pierobon per aver supervisionato costantemente il mio lavoro.

Un grazie speciale al Dr. Petricoin per avermi accolto nel suo laboratorio, e per essere stato un capo eccezionale, nonostante le tutte le difficoltà.

Un grazie a tutto il gruppo italiano a Manassas, con cui ho cominciato questa lunga esperienza, in particolare ad Elisa e Antonella.

Ovviamente un grazie importante va ai mie relatori, Prof. Colombatti e Prof. Spisni che hanno corretto con molta pazienza questa tesi. Grazie.

L'ultimo e non meno importante grazie va a tutta la mia famiglia, per il sostegno che continua a darmi... anche con una distanza grande un oceano.

Grazie A Tutti.

*Nel nostro Paese quando si deve tagliare, si  
tagliano la cultura e la ricerca, ritenute  
evidentemente un inutile lusso.*

Margherita Hack, Libera scienza in libero Stato, 2010