Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE BIOMEDICHE E NEUROMOTORIE

XXXIV Ciclo

**Settore Concorsuale:** 05/H1 - ANATOMIA UMANA

**Settore Scientifico Disciplinare:** BIO/16 - ANATOMIA UMANA

# Identificazione di un nuovo meccanismo microRNA-dipendente di resistenza all'inibizione della via di segnale PI3K/AKT nel carcinoma della prostata

**Presentata da:**

Luca Braglia

**Coordinatore Dottorato:**

Prof.ssa Matilde Yung Follo

**Supervisore:**

Chiarissima Prof.ssa Lucia Manzoli

**Co-Supervisore:**

Chiarissima Prof.ssa Sandra Marmiroli

**Co-Supervisore:**

Dr.ssa Manuela Zavatti

**Esame finale anno 2022**

# INDICE DEI CONTENUTI

**LISTA DELLE ABBREVIAZIONI** ..... 4
**ABSTRACT** ..... 7
**CAPITOLO 1: INTRODUZIONE** ..... 9
1.1 La prostata ..... 9
1.1.1 Prostata: anatomia e funzioni ..... 9
1.1.2 Il tumore prostatico da un punto di vista epidemiologico, clinico e molecolare ..... 11
1.1.3 La progressione tumorale prostatica: correlazione fra modifiche morfologiche ed espressione genica ..... 14
1.2 La via di segnale PI3K/AKT/mTOR. ..... 19
1.2.1 I principali attori della via e il meccanismo di trasduzione del segnale ..... 19
1.2.2 La regolazione negativa dell'asse ..... 26
1.3 Il crosstalk fra il meccanismo di segnalazione mediato da PI3K/AKT/mTOR e Ras/MAPK ..... 28
1.3.1 La via di segnale Ras/MAPK ..... 28
1.3.2 Una overview dei principali meccanismi di interazione fra le vie di Ras ed AKT ..... 29
1.3.3 Co-targeting delle vie Ras/MAPK e PI3K/AKT/mTOR e loro implicazione nella resistenza adattativa, nel cancro prostatico ..... 31
1.4 Il ruolo della via di segnale PI3K/AKT/mTOR nel cancro prostatico ..... 33
1.4.1 Il crosstalk fra la via PI3K/AKT/mTOR e la segnalazione genomica del AR ..... 33
1.4.2 Il crosstalk fra la via PI3K/AKT/mTOR e la segnalazione non-genomica del AR ..... 34
1.4.3 Il guadagno di funzione di PI3K ..... 35
1.4.4 Il guadagno di funzione di AKT ..... 36
1.4.5 Il guadagno di funzione di mTOR ..... 37
1.5 La terapia e la resistenza adattativa al farmaco nel cancro prostatico ..... 38
1.5.1 Una overview delle principali strategie terapeutiche del cancro prostatico nell'attuale pratica clinica ..... 38
1.5.2 La via di segnale PTEN-PI3K/AKT/mTOR e i primi inibitori di protein-chinasi nel cancro prostatico. ..... 41
1.5.3 La terapia con inibitori di protein-chinasi diretta contro la via di PI3K/AKT e l'induzione di meccanismi di feedback ..... 43
1.6 I microRNA ..... 47
1.6.1 microRNA: biogenesi, regolazione e ruolo biologico ..... 47
1.6.2 miR e AKT: un esempio di regolazione bidirezionale ..... 50
1.6.3 Il ruolo dei miR nel cancro ..... 52

1.6.4 I miR come oncosoppressori ....53
1.6.5 I miR nel cancro prostatico ....55
1.6.6 Il ruolo dei miR nel EMT ....57
1.6.7 Il ruolo dei miR nella farmacoresistenza del cancro ....59
1.6.8 miR-145-5p: ruolo nelle patologie neoplasiche, nella via di AKT e nella farmacoresistenza ....61
**CAPITOLO 2: OBIETTIVI** ....65
**CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI** ....67
3.1 Colture Cellulari ....67
3.2 Produzione di Lentivirus "pLKO" in cellule HEK-293 e successiva infezione delle cellule target (Human) con il sistema di espressione inducibile TetOn3G ....69
3.3 Trasfezione delle linee cellulari ....72
3.3.1 Trasfezione cellule HEK-293 ed overespressione di AKT wt e AKT K179M ....72
3.3.2 Trasfezione cellule PC3 e silenziamento isoforma-specifico di AKT ....74
3.4 Lisi cellulare, estrazione e quantificazione proteica ....75
3.5 SDS page e Western blotting ....76
3.6 Reverse-Phase Protein Arrays (RPPA) ....77
3.7 Ibridizzazione del RNA sul microarray Affymetrix e preparazione dei raw data ....78
3.8 Analisi statistica dei dati ....79
3.8.1 Test t-Student ....79
3.8.2 Indice di correlazione di Pearson ....80
3.8.3 Wilcoxon t-test ....80
3.8.4 Linear models for microarray data (LIMMA) ....81
3.8.5 Transcriptome Analysis Console (TAC) ....81
3.8.6 miRNet: miRNA-centric network visual analytics platform ....81
3.8.7 Rappresentazione grafica mediante heatmap e clusterizzazione dei campioni ....82
3.8.8 Analisi della varianza (ANOVA) ....82
3.9 Inibitori farmacologici delle protein-chinasi ....83
3.10 Immunofluorescenza ....84
3.11 Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) ....85
**CAPITOLO 4: RISULTATI** ....87
4.1 Il silenziamento di AKT modula l'espressione della fosfatasi PHLPP1/2. ....87
4.2 Il silenziamento di AKT1 e di AKT2 modula l'espressione dei miR in modo differenziale. ....89
4.3 Numerosi geni correlati alla via di segnale PI3K/AKT entrano nella costellazione del miR-145-5p ....91
4.4 L'espressione del proto-oncogene N/K-Ras è drammaticamente upregolata dalla riduzione di miR-145-5p. ....93
4.5 L'inibizione farmacologica di AKT induce un aumento dell'espressione di Ras nel modello di carcinoma prostatico PC3. ....97

4.6 Analogamente all'inibizione e al silenziamento di AKT, anche il silenziamento transiente del miR-145-5p induce un aumento di espressione di Ras ..... 98
4.7 L'incremento di Ras causato da inibizione cronica di AKT riattiva la segnalazione AKT-dipendente .. 102
**CAPITOLO 5: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI** ..... 104
**BIBLIOGRAFIA** ..... 110

# LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

4E-BP1: eIF4E-binding protein

ABC: ATP-binding cassette transporters

ADT: androgen deprivation therapy

AGO1/2: Protein argonaute-1/2

AKT: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog

AKTi VIII: AKT inhibitor VIII

AKTi XII: AKT inhibitor XII

ANOVA: analysis of variance

AR: androgen receptor

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosine triphosphate

BAT: bipolar androgen therapy

BCL-2: B-cell lymphoma-2

BRAF: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

BSA: Bovine serum albumin

C/EBP-β: CCAAT/enhancer-binding protein-β

CDK6: cyclin-dependent kinase 6

CK2: casein kinase II

c-Myc: cellular myelocytomatosis

CREB: cyclic-AMP response element binding protein

CRPC: castration resistant prostate cancer

CSC: Cancer stem cells

DMEM/Ham's F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's Nutrient Mixture F-12

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimethyl sulfoxide

EGF: epidermal growth factor

eIF4E: eukaryotic translation initiation factor 4E

EMT: Epithelial mesenchymal transition

ER-a: recettore degli estrogeni

ERK: extracellular signal-regulated kinases; Mitogen-activated protein kinase kinase kinase

FasL: FS-7-associated surface antigen-ligand

FoxO: Forkhead box O

GAB1: Grb2-associated binder 1

GAP: GTPase activating proteins

GF: growth factor

GFP: Green fluorescent protein

GPCR: G-protein-coupled receptor

Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2

GSK3: glycogen synthase kinase

GSTP1: glutathione S-transferase P1

HEAT: Huntingtin, elongation factor 3 (EF3), protein phosphatase 2A (PP2A), and the yeast kinase TOR1 domain

HEK-293: human embryonic kidney 293 cells

HeLa: Henrietta Lacks' cervical cancer cells.

IGF-1: insulin like growth factor-1

IGF-1R: insulin like growth factor-1 receptor

INPP4B: Inositol Polyphosphate-4-Phosphatase Type II B

IPB: iperplasia prostatica benigna

IR: insulin receptor

Irs-1: insulin receptor substrate 1

KLF6: Kruppel Like Factor 6

Let-7: lethal-7

LIMMA: linear model for microarray data

LNCaP: Lymph Node Carcinoma of the Prostate

MAPK: mitogen activated protein kinase

MDM2: Mouse double minute 2 homolog

MDR: multiple drug resistence

MEK: extracellular signal-regulated kinases; Mitogen-activated protein kinase kinase

miR: microRNA

miRNet: miRNA-centric network visual analytics platform.

mTOR: mammalian target of rapamycin

mTORC1/2: mechanistic target of rapamycin complex 1/2

OD: Optical Density

p70S6K1: 70-kDa ribosomal S6 kinase 1

PARP: Poly(ADP-ribose) polymerases

PBS: Phosphate-buffered saline

PC: prostate cancer

PDK1: phosphoinositide-dependent kinase 1

P-gp: permeability glycoprotein

PH domain: pleckstrin homology domain

PHLPP: PH domain Leucine-rich repeat Protein Phosphatase

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

PI3KCA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

PIN: prostatic intraepithelial neoplasia

PIP2: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIP3: phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PKC: protein kinasi C

PP2A: protein phosphatase 2

PRAS40: Proline-rich AKT substrate of 40 kDa

PSA: prostate specific antigen

PTEN: phosphatase and tensin homolog chromosome 10

RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

Ras: rat sarcoma

Rb: retinoblastoma susceptibility protein

Rheb: Ras homolog enriched in brain

RISC: RNA-induced silencing complex

RNA pol II: RNA polymerse II

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RPPA: reverse phase protein array

rpS6: S6 ribosomal protein

RREB1: ras-responsive element binding protein-1

RTK: receptor tyrosine kinase

RT-qPCR: real time quantitative polymerase chain reaction

S6RP: S6 ribosomal protein

SAL: supraphysiological androgen level

SDS: Sodium dodecyl sulfate

Sh: short hairpin

SH2: Src Homology 2

siRNA: small interfering RNA

SOS: Son of Sevenless

Src: Sarcoma (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase)

TAC: transcriptome analysis console

TGF: transforming growth factor

TKIs: Tyrosine Kinase Inhibitors

TP53: tumoral protein 53

TRBP: TAR RNA binding protein

TSC1/2: tuberous sclerosis 1/2

UTR: untranslated region.

wt: wild type

# ABSTRACT

**Base di partenza scientifica-** Sebbene la maggior parte dei pazienti con carcinoma prostatico localizzato mostri una buona prognosi e una buona risposta alla terapia di deprivazione da androgeni dopo intervento chirurgico, circa un terzo di essi invariabilmente recidiva e progredisce verso il carcinoma prostatico resistente alla castrazione. Nel complesso, le terapie per il cancro alla prostata rimangono dunque scarsamente efficaci, e sono quindi necessari trattamenti alternativi che aumentino l'utilità della castrazione e della somministrazione di ormoni.

La disregolazione della via della fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) ha attratto crescente attenzione anche in questa patologia, a causa dell'associazione molto frequente di modificazioni epigenetiche e post-traduzionali, nonché dell'elevata frequenza di alterazioni genetiche di PIK3CA, AKT1 e dei principali regolatori negativi della via, le fosfatasi PTEN e PHLPP1/2, riscontrabili nei pazienti sia all'insorgenza sia durante la progressione della malattia, o di fronte a resistenza alla terapia di deprivazione androgenica. Il principale effettore della PI3K, AKT, è una protein chinasi promiscua, che fosforila una pletora di substrati e così facendo esercita un forte controllo sulla maggior parte dei processi fisiologici e patologici, incluso, ma non limitatamente a, il carcinoma della prostata. Tra i suoi numerosi substrati si trovano proteine che regolano il ciclo cellulare, la sopravvivenza, il ricablaggio dei cicli metabolici e il riarrangiamento del citoscheletro, ponendo AKT al crocevia tra morte e sopravvivenza cellulare, e attribuendogli un ruolo chiave nei meccanismi che regolano trasformazione, migrazione e invasione delle cellule tumorali. Poiché, attraverso questi substrati, AKT può avere un impatto decisivo sulla tumorigenesi, non sorprende che rappresenti un importante bersaglio terapeutico, contro il quale sono stati sviluppati molti inibitori, con l'obiettivo di provocare la morte selettiva delle cellule tumorali.

Tuttavia, benché più di 20 composti contro AKT o i diversi nodi della via di PI3K siano attualmente in trial clinico, i risultati sono deludenti a causa della rapidissima insorgenza di resistenza, provocata dall'interruzione dei circuiti fisiologici di feedback negativo, che vengono dirottati dalle cellule tumorali per eludere la tossicità del farmaco. Il successo dei prossimi studi clinici con la cosiddetta "kinase inhibitor therapy" della via PI3K/AKT, pertanto, dipende dalla precisa conoscenza dei meccanismi di resistenza, oltre che dall'identificazione dei sottogruppi di pazienti che possono trarre il massimo beneficio dal targeting di tale via.

**Razionale e Obiettivi-** Nostri risultati preliminari, ottenuti in un modello di cellule epiteliali di prostata, hanno

dimostrato che il silenziamento di AKT può provocare un aumento di espressione di regolatori e/o effettori della via di segnale PI3K/AKT, ed è ragionevole ipotizzare che tale effetto sia mediato da specifici miR. Su questa base, l'obiettivo generale che ci siamo posti è stato di chiarire se anche l'inibizione farmacologica di AKT perturba il profilo trascrizionale dei componenti della stessa via, agendo attraverso specifici miR, e se un tale meccanismo rappresenti un circuito di resistenza adattativa non ancora descritto.

**Risultati-** Allo scopo di esplorare meccanismi di resistenza alternativi a quelli già riportati in letteratura, abbiamo condotto un profilo di espressione di miR mediante la tecnologia di microarray, dopo inattivazione selettiva di AKT. Tramite la piattaforma miRNet, abbiamo poi costruito le reti di interazione tra i miR differenzialmente espressi e i loro geni target. All'interno della costellazione dei geni target del miR-145-5p, un noto oncosoppressore la cui espressione nel nostro sistema sperimentale è stata fortemente downregolata sia dal silenziamento che dall'inibizione farmacologica di AKT, abbiamo ritrovato numerosi geni regolatori o effettori della via di PI3K. L'espressione di tali geni è stata perciò quantificata tramite RT-qPCR, abbiamo poi focalizzato la nostra attenzione in particolare sui geni upregolati. Tra questi, è emerso un drammatico aumento di espressione dell'oncogene N/K-Ras, un importante regolatore a monte di PI3K/AKT. La conferma che l'aumento di Ras, osservato sia in termini di mRNA, che di proteina, è dipendente dalla caduta di questo miR, è stata poi ottenuta tramite l'allestimento di un modello di cellule PC3 trasdotte con vettore pLKO recante uno short hairpin contro il miR-145-5p, sotto il controllo di un promotre inducibile. Tramite un array di fosfoproteine siamo poi stati in grado di verificare l'effetto rebound, miR-145-5p-dipendente, scatenato dal picco di espressione di Ras. Dal punto di vista meccanicistico, quindi, i risultati indicano che l'inattivazione di AKT provoca una downregolazione del miR-145-5p che, a cascata, aumenta l'espressione di Ras e riattiva la segnalazione di PI3K.

**Conclusione-** Gli studi oggetto di questa tesi hanno permesso di identificare un circuito miR-145-5p/Ras a valle di AKT, non descritto in precedenza, che costituisce un nuovo meccanismo di resistenza adattativa. Ulteriori ricerche sono necessarie per definire se i farmaci inibitori di ultima generazione, da soli o in combinazione con terapia a base di inibitori della sintesi degli androgeni, siano in grado di bypassare questo circuito.

# CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

## 1.1 La prostata

### 1.1.1 Prostata: anatomia e funzioni

Nell'uomo, la ghiandola prostatica è un tessuto delle dimensioni di una noce che circonda l'uretra alla base della vescica e produce importanti componenti del liquido seminale. La prostata è costituita da una componente fibro-muscolare e da una componente ghiandolare. Il parenchima ghiandolare è costituito da un grappolo di circa 30-50 ghiandole di tipo tubulo-alveolari. A queste formazioni è affidata la funzione esocrina della prostata, ovvero l'elaborazione del liquido prostatico. Le ghiandole si aprono mediante 15-30 dotti escretori nell'uretra prostatica, dove riversano il loro liquido durante l'eiaculazione. Le ghiandole sono inoltre circondate da uno strato piuttosto spesso di fibre muscolari lisce e da tessuto connettivo (Selman & Steven, 2011). Durante l'eiaculazione, le contrazioni peristaltiche delle fibre muscolari comprimono le ghiandole, che in questo modo riversano le loro secrezioni nell'uretra prostatica. Analizzandone la composizione, si scopre come il liquido prostatico sia fluido, lattescente, debolmente alcalino e ricco di elementi nutritivi, tra cui enzimi, prostaglandine, fruttosio, acido citrico, zinco ed altri sali minerali. Il suo scopo è di aumentare la sopravvivenza e la motilità degli spermatozoi (Selman & Steven, 2011). Tra i vari componenti del liquido prostatico va evidenziato il Prostate-Specific Antigen PSA. Il PSA ha l'importante funzione di fluidificare il coagulo spermatico, per facilitare il movimento degli spermatozoi (Ilic et al., 2018). Il PSA rappresenta anche un importante parametro in clinica e in campo diagnostico, infatti lo screening iniziale per la diagnosi di cancro della prostata prevede proprio il dosaggio ematico di questo fattore, che verrà discusso in seguito.

E' necessario evidenziare che la prostata è molto sensibile all'azione degli ormoni. La sua crescita e le sue funzioni sono regolate dagli ormoni sessuali maschili, noti come androgeni. Fra questi, il protagonista è il testosterone, prodotto dai testicoli a partire da un suo metabolita, il diidrotestosterone (DHA). Alti livelli di diidrotestosterone si associano, generalmente, ad un aumento dei caratteri sessuali secondari, ma, per quanto concerne il nostro argomento di studio, all'ipertrofia prostatica (Montie et al., 1994).

Nell'adulto il parenchima prostatico può essere diviso in quattro zone o regioni anatomicamente distinte: periferica (PZ), consistente nel 70% del volume prostatico; centrale (CZ), 25% del volume; di transizione (TZ), 5%; tessuto ghiandolare periuretrale, che è meno dell'1%; vi è poi la regione anteriore costituita da stroma fibro-muscolare (figura 1.1).

Con l'avanzare dell'età il tessuto ghiandolare periuretrale e la zona di transizione possono andare incontro ad ipertrofia benigna, comprimendo gradualmente la zona centrale e la zona periferica. La zona centrale è generalmente risparmiata dall'iperplasia, mentre la zona periferica è quella più frequentemente coinvolta dalle prostatiti, dall'iperplasia atipica e dal carcinoma (Selman & Steven, 2011).

Sebbene la prostata adulta manchi di una struttura lobulare riconoscibile, un importante lavoro di McNeal (1969, 1981, 1988) ha definito l'architettura della prostata umana come zonale, corrispondente alle aree di transizione centrale, periuretrale e periferiche, insieme a uno stroma fibromuscolare anteriore (Timms 2008).

A livello istologico, il tessuto prostatico contiene tre diversi tipi di cellule epiteliali: luminale, basale e neuroendocrina (Peehl et al., 2005, Shen et al., 2010).

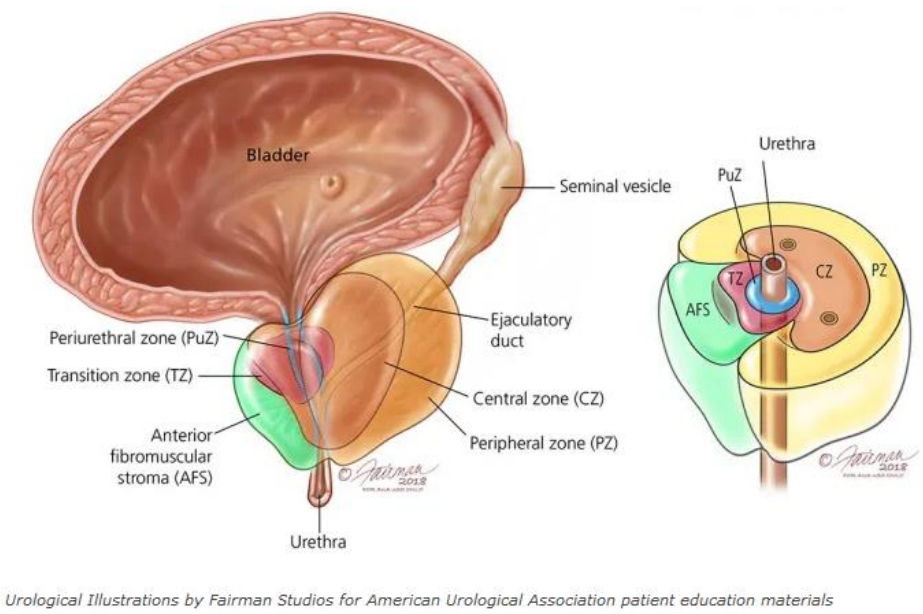



**Figura 1.1:** Anatomia prostatica. Adattato dalla pagina web https://medika.life/the-prostate-gland/

Le prime sono cellule colonnari che generano uno strato continuo, sono caratterizzate dall'espressione delle citocheratine 8 e 18 e da alti livelli di recettore degli androgeni (AR). Le cellule basali, situate sotto l'epitelio luminale, esprimono il marker p63, le citocheratine 5 e 14 ad alto peso e bassi livelli di AR. Infine, le cellule

neuroendocrine sono molto più rare delle precedenti, sono AR-negative ed esprimono marcatori tipici delle cellule endocrine come la cromogranina A e la sinaptofisina (Peehl et al., 2005, Shen et al., 2010).

### 1.1.2 Il tumore prostatico da un punto di vista epidemiologico, clinico e molecolare

Il cancro alla prostata (PC) è il tumore più frequentemente diagnosticato e la terza causa di mortalità per malattia nei maschi (Siegel et al., 2018). In tutto il mondo, circa 300.000 uomini muoiono ogni anno di cancro alla prostata (Center et al., 2012). Da fonti del National Institute of Health, nel 2019 negli Stati Uniti sono stati registrati 174.650 nuovi casi e 31.620 decessi per cancro alla prostata (PDQ, 2019).

Alcuni tipi crescono lentamente, altri sono aggressivi e molto invasivi. Secondo recenti statistiche, tra il 2005 e il 2011 i pazienti con carcinoma prostatico non metastatico hanno avuto un tasso di sopravvivenza a cinque anni del 98.9%, mentre quelli con carcinoma metastatico solo del 28.2%, suggerendo che la metastatizzazione è la principale causa di morte della maggior parte dei pazienti (Siegel et al., 2018; Wade e Kyprianou, 2018). L'adenocarcinoma prostatico metastatizza frequentemente a livello linfonodale locale (linfonodi otturatori), per poi diffondersi ai linfonodi iliaci e peri-aortici. La diffusione linfatica nella maggior parte dei casi precede quella ematogena. Frequentemente la neoplasia metastatizza allo scheletro, causando forte dolore, spesso invalidante, e portando dall'indebolimento fino alla frattura dell'osso stesso. L'interessamento scheletrico può coinvolgere la colonna vertebrale, le coste, il femore e le ossa pelviche. Più rare sono le metastasi polmonari, epatiche, cerebrali, surrenali e renali (PDQ 2019).

L'area periferica più esterna occupa il volume maggiore e rappresenta il sito in cui insorge la maggior parte dei carcinomi prostatici. Al contrario, l'iperplasia prostatica benigna (IPB), una condizione che si riscontra comunemente negli anziani, deriva dalla zona di transizione.

Più del 95% dei tumori primari della prostata sono adenocarcinomi, neoplasie multifocali ed eterogenee dal punto di vista dello stadio di differenziazione cellulare. Un tumore non invasivo chiamato neoplasia intraepiteliale prostatica (PIN), se presente nella sua forma di lesioni di alto grado, rappresenta un importante precursore per l'adenocarcinoma prostatico (PDQ 2019).

In diagnostica, il metodo principale per distinguere un PIN da un adenocarcinoma è l'indagine immunoistochimica. Infatti, l'assenza di colorazione in seguito all'utilizzo di anticorpi contro p63 e

citocheratine 5/14, insieme ad un elevato segnale di presenza di -metilacil-CoA racemasi, conferma l'espansione delle cellule basali luminali nell'organo, ovvero cellule che subiscono la trasformazione neoplastica tipica dell'adenocarcinoma (Grisanzio e Signoretti, 2008; Humphrey, 2007).

Rimanendo sempre in tema di diagnostica, un'importante rivoluzione riguarda l'utilizzo del già citato PSA come esame elettivo per la rilevazione di questo tipo di tumore. Questo marcatore è una serina proteasi secreta dalla prostata in condizioni fisiologiche, che viene rilasciata nel sangue come conseguenza della distruzione dell'architettura della prostata (Lija et al., 2008). Livelli elevati di PSA nel sangue rappresentano quindi il primo campanello d'allarme che porterà il paziente ad eseguire una biopsia prostatica per valutare la presenza di eventuali neoplasie. Dopo questi primi esami, il tumore in esame verrà classificato attraverso una valutazione istopatologica, nota come "Gleason Scoring", che assegna un punteggio da 1 a 5 in base al livello di differenziazione delle cellule che caratterizzano la patologia. Infine viene assegnato un punteggio combinato che tiene conto del livello di invasività del tumore, della presenza o meno di metastasi ai linfonodi e della distanza dalla prostata agli organi da essa colpiti (Mellinger et al. 1967; Epstein 2010; Ohori et al., 1994).

L'eterogeneità di questa patologia deriva però anche dal fatto che sono spesso presenti foci indipendenti di cellule cancerose, con distinte caratteristiche morfologiche, che coesistono all'interno della stessa ghiandola prostatica (Shen & Abate-Shen, 2010). In particolare, le lesioni geniche possono essere differenti fra le popolazioni che generano i vari foci; fra queste, le più comuni sono la formazione del gene di fusione TMPRSS2-ERG, amplificazioni di Myc e mutazioni di TP53 (Mehra et al., 2007; Jenkins, Qian, Lieber, & Bostwick, 1997; Mirchandani et al., 1995). Inoltre, il whole-exome sequencing di un set di oltre 100 tumori prostatici, ha rivelato che il gene ubiquitin ligase complex subunit (SPOP) è quello che risulta essere mutato più di frequente nei tumori primari (Barbieri et al., 2012). Lo studio ha anche identificato mutazioni ricorrenti nei geni fork-head transcription factor (FOXA1) e nel mediator complex MED12.

Poiché questo tumore è spesso composto da cellule cancerose con genotipi e fenotipi differenti, le sue caratteristiche di proliferazione, aggressività e sensibilità ai farmaci sono diverse, tutto questo impatta sulla diagnosi e la prognosi del paziente. Nel PC, alcuni uomini hanno una rapida progressione verso la malattia metastatica, mentre altri presentano una patologia più stabile e per lo più asintomatica per molti anni. Infatti, una buona popolazione di pazienti a cui viene diagnosticato un cancro alla prostata, ovvero circa il 40%, è destinata a morire "con" e non "per" il PC (Stangelberger, Waldert, & Djavan, 2008).

Come descritto in precedenza, la forma più comune di PC è l'adenocarcinoma, ma nonostante questa sia il più diagnosticato dalla maggior parte degli urologi e patologi, ci sono altre forme di questa neoplasia:

- Adenocarcinoma duttale, che inizia nelle cellule che rivestono i dotti della ghiandola prostatica.
- Carcinoma a cellule transizionali (o uroteliale), origina dalle cellule che rivestono l'uretra, che passa attraverso la prostata per trasportare l'urina dalla vescica all'esterno del corpo. Nella maggior parte dei casi, questo tipo di cancro origina nella vescica, per poi diffondersi nella prostata.
- Carcinoma a cellule squamose che origina dalle cellule piatte che ricoprono la ghiandola prostatica, chiamate cellule squamose.
- Tumori carcinoidi, neoplasie che originano da aggregati di cellule neuroendocrine presenti a livello prostatico
- Tumore a piccole cellule, un tipo di cancro neuroendocrino costituito, da un punto di vista istologico, da piccole cellule rotondeggianti.
- I Sarcomi, che originano dalle cellule muscolari, e i tumori sarcomatoidi, composti da popolazioni miste fra sarcomi e cellule di adenocarcinoma.

In caso di diagnosi di PC, le terapie per questa patologia dipendono dalla sede anatomica e dell'aggressività della stessa, ma anche dall'aspettativa di vita del paziente e della presenza di comorbidità che possono costituire un rischio di morte maggiore di quello rappresentato dallo stesso PC (Damber & Aus, 2008). Le opzioni di trattamento si basano quindi su fattori quali l'aspettativa di vita del paziente e le caratteristiche del tumore, inclusi la stadiazione e il suo grado di invasività. Spaziano dalla vigile attesa, ovvero monitorare le condizioni di un paziente senza somministrare alcun trattamento nelle fasi in cui la malattia è asintomatica e i pazienti hanno meno probabilità di morire "per" il loro cancro alla prostata, ma in particolare questa strategia è utilizzata a causa dell'età avanzata o della presenza di comorbidità che presentano una maggiore letalità del PC (Albertsen, Hanley, Gleason, & Barry, 1998), al monitoraggio attivo, soluzione per pazienti molto anziani a basso rischio, in cui attraverso check up a cadenza regolare, si segue l'evoluzione della malattia. Per il trattamento verrà concordato se e quando sarà necessario. Seguono protocolli terapeutici di elezione, in particolare la prostectomia radicale, ovvero rimozione chirurgica della prostata e delle vescicole seminali. Questo trattamento è un'opzione per i pazienti in buona salute. I principali effetti collaterali sono impotenza e incontinenza (Chin, Dave, & Rajfer, 2007). Se il tumore non si è diffuso oltre la ghiandola prostatica si ricorre

alla radioterapia per cercare di curarlo, che sfutta radiazioni ionizzanti ad alto dosaggio in grado di distruggere le cellule, mediante l'induzione di lesioni nel loro DNA. In alternativa esiste la brachiterapia, ovvero l'impianto di "semi" radioattivi direttamente nell'organo, così da rendere più mirata la terapia e minimizzare l'esposizione di altri organi sani alle radiazioni. Nel caso in cui la neoplasia sia in uno stadio avanzato, ovvero se il cancro si estende oltre i limiti della prostata, il trattamento consigliato è la terapia con deprivazione androginica (ADT), che porta inizialmente alla riduzione della massa tumorale e dei livelli di PSA circolante (Brawer et al., 2001). Questa strategia riduce la quantità di ormoni maschili, soprattutto testosterone, così da rallentare la progressione della malattia.

L'effetto dell'ADT sul PC è però solo temporaneo e, in media, dopo circa due anni, i pazienti tendono a sviluppare una resistenza agli ormoni che rende il trattamento inefficace. Vi è anche la chemioterapia, usata per trattare pazienti ormone-resistenti. Quest'ultima rallenta la crescita del tumore e in alcuni casi allevia il dolore oncologico. Infine, nonostante le difficoltà del suo utilizzo come monoterapia, è importante citare anche la terapia con inibitori di protein-chinasi. A livello molecolare, infatti, una delle principali vie coinvolte nella trasformazione neoplastica delle cellule prostatiche e nella loro metastasi è quella regolata dalle chinasi PI3K/AKT. Queste ultime sono implicate non solo nella trasformazione delle cellule della prostata, ma anche in altri tumori umani aggressivi (Butler et al., 2017). Di conseguenza, ci sono stati investimenti significativi nello sviluppo di inibitori mirati di questa via in vari tumori ematologici e solidi, non solo con l'idea di utilizzarli come farmaco principale nel regime terapeutico, ma anche in combinazione con farmaci chemioterapici, allo scopo di ridurrne il dosaggio e migliorare la qualità della vita del paziente. Quindi, è nostro interesse discutere il ruolo di questo importante asse nella biologia cellulare e nel cancro, con un focus particolare sul suo ruolo nelle neoplasie della prostata e, in particolare, sulla sua partecipazione nell'induzione di meccanismi di resistenza adattativa alla terapia.

### 1.1.3 La progressione tumorale prostatica: correlazione fra modifiche morfologiche ed espressione genica

La progressione del PC, è caratterizzata da cambiamenti morfologici e corrispondenti alterazioni nell'espressione genica. Come già definita in precedenza, la neoplasia intraepiteliale prostatica precancerosa (PIN) è universalmente accettata come precursore del cancro alla prostata. È caratterizzato da proliferazione

intra-acinare con cellule che frequentemente mostrano anaplasia nucleare. La membrana basale resta intatta, le variazioni morfologiche sono confinate allo strato epiteliale all'interno degli acini prostatici. Le cellule basali sono di solito presenti, ma il loro ammontare può essere ridotto (Gao et al., 2002). Gli eventi genetici che portano inducono il passaggio dall'epitelio normale al PIN non sono ancora del tutto compresi. La maggior parte degli eventi genetici notevoli includono la perdita cromosomica nella regione 8p21 che si verifica nel 63% dei PIN e nel 90% dei PC (De Marzo et al., 2004). L'espressione dell'omeobox prostata-specifico, NKX3.1, viene persa nel 20% delle lesioni PIN (Bowen et al., 2000). La transizione dall'epitelio normale al PIN è anche caratterizzata dalla downregulation di proteine scavenger di specie reattive dell'ossigeno, come GSTP1 (Lee et al., 1994). Una modifica davvero degna di nota è però quella a carico della trascrizione della epsina, una proteasi sulla superficie cellulare (Dhanasekaran et al., 2001; Stephn et al., 2004). Studi funzionali in vivo hanno confermato il ruolo causale della perdita di NKX3.1 e la upregolazione dell'epsina nel PC (Bhatia-Gaur et al., 1999).

La transizione dal PIN al carcinoma è caratterizzato da perdita di cellule basali e marcata atipia citologica, caratterizzata dall'ingradimento del nucleo e dei nucleoli. Si arriva a rottura della membrana basale e le cellule tumorali mostrano invasione locale. Man mano che il tumore progredisce, si verifica la perdita dell'organizzazione generale della struttura dell'epitelio prostatico, caratteristica che coincide con la progressione del Gleasone score. Gleason score 1 (ben differenziato), la massa è circoscritta in spazi equidistanti e ravvicinati, le ghiandole uniformi, senza evidenza di infiltrazione stromale; Gleason score 2 (ben differenziato), è presente qualche infiltrazione nello stroma circostante e una certa variabilità nella dimensione e nella distanza delle ghiandole. Gleason score 3 (moderatamente differenziato), grado più comune, con maggiore variazione di dimensioni, forma e separazione delle ghiandole, e con confini meno definiti con lo stroma circostante. Gleason score 4 (poco differenziato), fusione delle ghiandole che formano una solida rete con bordo frastagliato e caratteristiche invasive; Gleason score 5 (indifferenziato), caratterizzato da una completa assenza di formazione di ghiandole, con cellule disposte in fogli o gruppi (Vasioukhin et al., 2004; Harnden et al., 2007) (figura 1.2).

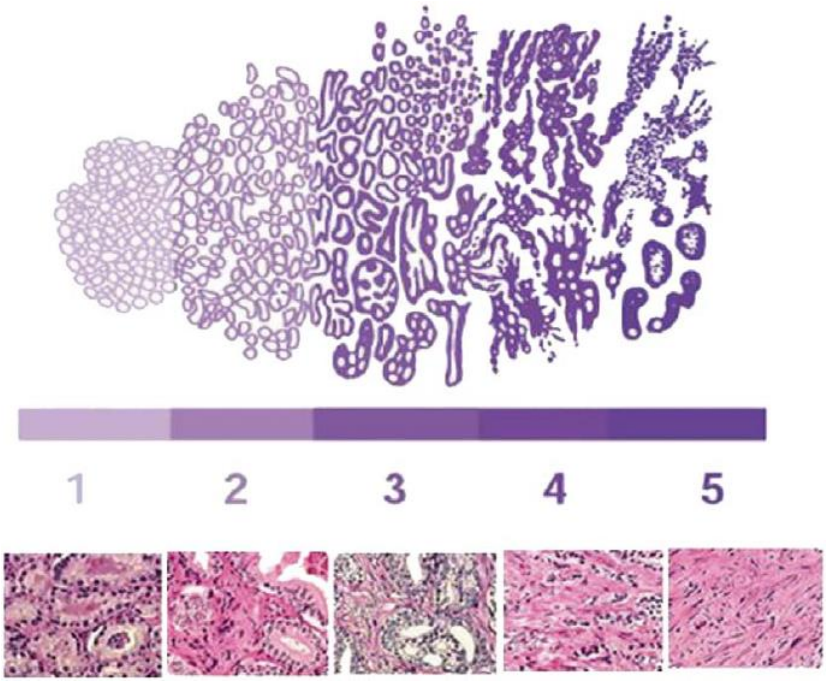



**Figura 1.2:** Diagramma del Gleason grading system. I numeri sono riferiti al determinato Gleason score. Sopra di essi, è presente un'illustrazione delle caratteristiche istologiche riferite a quel particolare score. Sotto, originali preparati istologici per ogni score. Adattata da un'immagine della University of Pittsburgh, Medical Center (UPMC), Cancer Centers, Pittsburgh, PA, USA (Harnden et al., 2007).

Tuttavia, sono ancora poche le prove sperimentali a supporto di questa classificazione. Infatti, in alcuni pazienti si osservano tumori che restano ben differenziati per tutta la progressione della patologia, come altri che invece sono già scarsamente differenziati fin dall'insorgenza della malattia.

Sono diverse le alterazioni genetiche legate alla trasformazione neoplastica del tessuto prostatico (figura 1.3). Gli eventi genetici sicuramente da sottolineare associati all'adenocarcinoma prostatico è l'inattivazione del fattore di trascrizione KLF6 (condizione presente nel 55% dei tumori primari) (Narla et al. 2001), perdita del già citato regolatore negativo di PI3K, ovvero la fosfatasi lipidica PTEN (nel 10-15% dei tumori primari) (Wang et al., 2017) e inattivazione del recettore tirosin-chinasi EPHB2 (nel 12% dei casi) (Huusko et al., 2004). Inoltre, una percentuale significativa di tumori primari della prostata manifesta amplificazione del locus c-Myc (8%) (Jenkins et al., 1997) e perdita del regolatore del ciclo cellulare Rb (19%) (Jarrard et al., 2002). L'inibitore delle chinasi ciclina-dipendente (Cdk), p27, è downregolato nelle cellule primarie di PC (Yang et al., 1998). Inoltre, i livelli di espressione di GSTP1 rimangono bassi, mentre quelli di epsina restano elevati (Nakayama et al., 2004). Tumori avanzati e scarsamente differenziati spesso mostrano perdita di espressione delle proteine di adesione cellulare come E-caderina, alfa-catenina, CD44, KAI1, 4-integrina, e di proteine della membrana basale, in particolare laminina 5 e collagene VII (Nagle et al., 1995). Queste ultime sono

necessarie per una corretta adesione cellula-cellula e cellula-substrato, e nell'organizzazione strutturale complessiva dei tessuti. La loro downregolazione svolge un ruolo importante nella scompaginazione dell'organizzazione dei tessuti e nel favorire processi di invasione. Infatti, durante la progressione del cancro alla prostata, le cellule epiteliali possono subire una transizione epitelio-mesenchimale (EMT), caratterizzata da cambiamenti morfologici nel loro fenotipo, da cuboidale a fusiforme. Ciò è associato ai cambiamenti biochimici prima citati, in cui, in particolare, i marcatori delle cellule epiteliali come E-caderina e occludine sono downregolati, il che porta alla perdita di adesione cellula-cellula, mentre i marcatori mesenchimali come vimentina e N-caderina sono upregolati, consentendo così alle cellule di migrare o metastatizzare in diversi organi. L'EMT può essere regolato direttamente e indirettamente da molteplici meccanismi molecolari, inclusi quelli mediate da growth factors e citochine, come il transforming growth factor-beta (TGF- ), l'epidermal growth factor (EGF) e l'insulin-like growth factor (IGF), e dalla conseguente attivazione delle cascate di traduzione del segnale a valle dei loro recettori. In questi meccanismi risultano essere fondamentali le vie che hanno come protagonisti PI3K, Ras e MAPK, responsabili dell'induzione dell'espressione di vari fattori di trascrizione come Snail, Twist, Zeb1/2, noti anche come regolatori principali dell'EMT. Vari marcatori associati a questo processo, sono stati associati a particolari fasi dell'evoluzione del PC e alla prognosi del paziente e, sono stati oggetto di discussione se potessero anche diventare potenziali candidati target terapeutici.

In generale, esiste una forte correlazione tra un Gleason score elevato e la tendenza del tumore a metastatizzare. Lavori scientifici che utilizzano modelli *in vivo* hanno permesso di dimostrare che vi è un ruolo causale dell'inattivazione di PTEN, p27 e Rb e la sovraespressione di Myc nella carcinogenesi prostatica (Ellwood-Yen et al., 2003; Trotman et al., 2003).

Il successivo step della progressione del PC è quello più critico, ovvero la diffusione delle cellule tumorali nel sistema linfatico e sanguigno, e utilizzare queste vie per raggiungere organi distanti. Questo sancisce una importante distinzione in termine di prognosi per il paziente, in quanto, mentre il tumore localizzato è curabile, quello metastatico avanzato è solitamente letale (Vasioukhin et al., 2004). Morfologicamente, questo passaggio è caratterizzato dalla comparsa di focolai metastatici di cancro alla prostata a carico soprattutto dei linfonodi e delle ossa. Anche fegato e polmone possono essere interessati, ma con una frequenza minore (Vasioukhin et al., 2004).

Sono stati identificati diversi cambiamenti genetici associati al processo di metastatizzazione. L'inattivazione di PTEN, rispetto a quanto detto in precedenza, aumenta al 30–43% (Cairns et al., 1997), e la frequenza dell'amplificazione del locus di Myc, fino al 21% (Jenkins et al., 1997). Anche il repressore trascrizionale EZH2 è frequentemente espresso in modo non fisiologico, ed è noto il suo ruolo causale nella progressione del PC (Varambally et al., 2002). Tuttavia, la maggior parte dei geni critici nell'induzione della metastatizzazione, rimangono ancora sconosciuti. Il PC invasivo mostra inoltre upregolazione di Smoothened (SMO) e un'attivazione costitutiva della via di segnalazione di Hedgehog, che sembra essere fondamentale per la sopravvivenza delle cellule metastatiche (Karhadkar et al., 2004).

Le cellule epiteliali prostatiche normali e la maggior parte degli adenocarcinomi, richiedono la presenza di androgeni per la loro sopravvivenza. Una loro ablazione rappresenta un importante approccio terapeutico per il PC. Va però sottolineato come nei casi avanzati di PC, il tumore diventi insensibile agli ormoni. Le cellule neoplastiche, in queste fasi, sono caratterizzate dall'iperattivazione del AR, in seguito ad una amplificazione o ad una mutazione che ne favorisce un guadagno di funzione, o dalla transattivazione delle vie di EGF, IGF-1 e KGF (Vasioukhin et al., 2004). Infine, il PC avanzato in questa fase, manifesta quasi sempre una sovraespressione del fattore antiapoptotico BCL-2 (McDonnel et al., 1992).

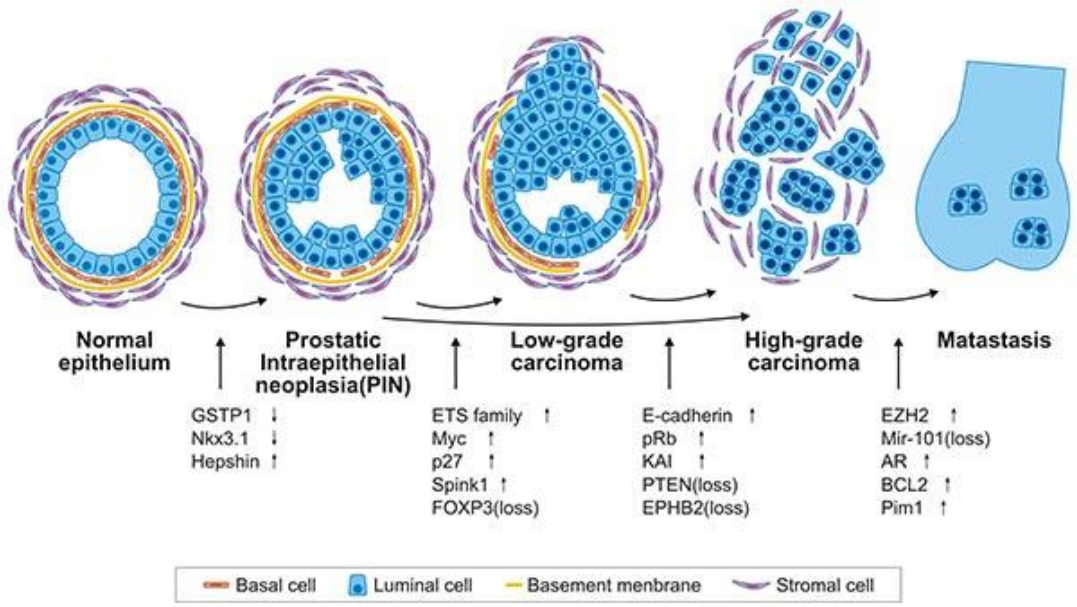



**Figura 1.3:** Modello di progressione del cancro prostatico. Le caratteristiche morfologiche delle diverse fasi di progressione, sono legate a specifici eventi genetici ed epigenetici. La overespressione di un gene è mostrata con una freccia rivolta verso l'alto, mentre la downregolazione, è indicata con una freccia rivolta verso il basso. Le modifiche nei livelli di espressione, vengono indicate solo sotto la fase in cui generalmente si manifestano, persistono però nelle fasi successive della progressione neoplastica. Immagine adattata da Vasioukhin et al., 2004.

## 1.2 La via di segnale PI3K/AKT/mTOR.

### 1.2.1 I principali attori della via e il meccanismo di trasduzione del segnale

La via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR è uno degli assi principali che controlla numerosi processi biologici intracellulari, che includono proliferazione, differenziamento, regolazione del ciclo cellulare, cicli metabolici e apoptosi, caratterizzato da un intenso dialogo incrociato con altri nodi di segnalazione (figura 1.4, figura 1.5).

La via canonica che porta all'attivazione di AKT è innescata dalla stimolazione di recettori tirosin-chinasici (RTK) o recettori accoppiati a proteine-G (GPCR) che portano al reclutamento sulla membrana plasmatica di una o più isoforme della famiglia di PI3K di classe I (Vanhaesebroeck et al., 2010). Un altro meccanismo in grado di attivare questa via di segnalazione è quello mediato da Ras, un regolatore diretto della PI3K (Rodriguez-Viciana et al., 1994).

Non è perciò sorprendente che una regolazione non fisiologica, che causi un'attivazione costitutiva della via di PI3K e/o di altri attori e regolatori, sia stata coinvolta in un'ampia gamma di patologie, incluso il cancro (Marigo e Zappavigna, 2013). Data la funzione pro-oncogenica e la possibilità di sfruttare i suoi membri chiave come bersagli molecolari per molecole con attività farmacologica, questo percorso è stato utilizzato per la scoperta di farmaci sin dagli anni '90 (Manning & Cantley, 2007), rendendo così questa via protagonista di numerosi studi preclinici (Wong et al., 2010).

Nelle cellule di mammifero i membri della famiglia delle PI3K sono suddivisi in quattro classi, tre delle quali fosforilano lipidi, mentre la classe IV (mTOR, ATM, ATR e DNA-PK) fosforila proteine. Le subunità catalitiche di queste chinasi possiedono una PI3K core structure costituita da un dominio C2, un helical domain e un dominio catalitico (Marigo e Zappavigna, 2013).

La classe I è quella maggiormente studiata per via del ruolo che gioca nei processi di segnalazione intracellulare. Le chinasi di questa classe catalizzano la reazione di trasferimento del gruppo fosforico in posizione γ dell'ATP sulla posizione D3 del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP2), producendo così fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato (PIP3). Sono chinasi eterodimeriche composte da una subunità catalitica (p110α, β e γ) e da una regolatoria. La classe I include diversi paraloghi, e può essere suddivisa in due sottoclassi:

Ia: chinasi eterodimeriche, formate dalla combinazione delle subunità p110α, β e γ con una subunità regolatoria (p85, p65 o p55). Consistono nell'alternanza di due domini SH2 e un dominio SH3. In assenza di segnale, le PI3K di classe Ia sono localizzate nel citoplasma. In seguito al legame di specifici ligandi con il rispettivo RTK, si ha l'attivazione e dimerizzazione di questi ultimi e autofosforillazione a livello dei residui di tirosina esposti sulla porzione citoplasmatica del dimero. Il dominio SH2 della subunità p85 legata a questi ultimi porta a una variazione conformazionale di PI3K, rendendola in grado di interagire con substrati lipidici (Vanhasebroeck et al., 2010; Manning & Toker 2017).

Ib: composta dalla combinazione delle subunità catalitica p110γ e da quella regolatoria p101. La loro attivazione è mediata da GPCR eterodimerici.

Le isoforme di p85 possiedono due domini Src homology 2 (SH2), sono codificate dai geni PIK3R1 (il quale, attraverso l'utilizzo di promotori alternativi, codifica per le subunità p85α, p55α e p50α), PI3KR2 (che codifica per p85β) e PI3KR3 (che codifica per p55γ). Il ruolo delle singole subunità p85 è sconosciuto. P101 e p87 mancano dei domini SH2 o di altri domini noti e non hanno omologia con altre proteine (Vanhasebroeck et al., 2010; Manning & Toker 2017).

Le PI3Ks di classe II, invece, sono in grado di utilizzare sia il fosfatidilinositolo (PI) che il PI4P come substrati per la sintesi di PI3,4P2. Mancano delle subunità regolatorie ma possiedono estensioni dei domini amino- e carbossi-terminale, utili nella mediazione di interazioni proteina-proteina. I mammiferi hanno tre isoforme di PI3K di classe II: PI3K-C2α, PI3K-C2β e PI3K-C2γ. Le prime due hanno un'ampia (ma non ubiquitaria) distribuzione tissutale, il pattern di espressione dell'ultima invece sembra essere molto più ristretto (Vanhasebroeck et al., 2010; Manning & Toker 2017).

Infine vi sono le PI3K di classe III, in possesso di una sola subunità catalitica: la vacuolar protein sorting 34 (Vps34; conosciuta anche col nome di PI3KC3 nei mammiferi). Quest'ultima utilizza PI come substrato e lega Vps15 (nota anche come PI3KC4 nei mammiferi). Quest'ultima è costituita da un dominio catalitico (attualmente considerato però come inattivo), HEAT domains (coinvolti nella mediazione di interazioni proteina-proteina) e WD repeats (con caratteristiche funzionali e strutturali simili alla subunità Gβ). Queste ripetizioni risultano essere essenziali per le interazioni con RAB5-GTP, con la yeast guanine nucleotide-binding protein 1° (Gpal1; omologa alla proteina-Gα appartenente alle proteine-G eteromeriche dei

mammiferi) e con la autophagy-related protein 14 (Atg14; una potenziale proteina-Gγ) (Carnero et al., 2010; Vanhasebroeck et al., 2010; Manning & Toker 2017).

In particolare però, le PI3K di classe I rappresentano un nodo cruciale in grado di integrare diversi segnali ed effettori a valle, inclusi gli oncogeni, e sono, perciò, implicate in numerosi processi di cancerogenesi (Park et al., 2018). Il meccanismo di attivazione di PI3K sfrutta, per quanto riguarda le PI3K , i recettori tirosin chinasici (RTK), Ras e piccole GTPasi, mentre, la PI3K , i recettori accoppiati a proteine-G e RAC1/CDC42 piccole GTPasi (Manning & Cantley, 2007; Rodriguez-Vicina et al., 1994). La loro attivazione recluta la subunità regolatoria in prossimità della membrana plasmatica, che quindi non è più in grado di operare il blocco sulla subunità catalitica, che viene perciò rilasciata. A questo punto, il p110 inizia a convertire il PIP2 in PIP3 attraverso la fosforilazione del gruppo 3'-idrossile. A sua volta, PIP3 agisce come un potente amplificatore del segnale PI3K, fornendo un punto di docking per proteine con domini pleckstrin homology (PH) a specifiche posizioni subcellulari. Sia la chinasi fosfoinoside-dipendente 1 (PDK1), che AKT, principale effettore di PI3K, sono infatti reclutati alla membrana legando i loro domini PH a PIP3. Questo legame favorisce quindi un cambiamento conformazionale di AKT, che innesca la fosforilazione da parte di PDK1 a livello del residuo T308, e di mTORC2 a carico della S473 (Manning & Toker 2017; Marigo e Zappavigna, 2013). Queste modifiche sono necessarie per l'attivazione di AKT e permettere così a quest'ultimo di svolgere la sua attività di chinasi. Vale la pena ricordare che il controllo allosterico dell'attività di AKT da parte del dominio PH, è stato sfruttato per progettare piccole molecole, come l'inibitore VIII di AKT, in grado di indurre un ripiegamento del dominio PH sul dominio della chinasi, così da indurre una conformazione inattiva "PH-in" che non permette l'accesso delle proteine regolatorie al dominio C-terminale della proteina (Calleja et al., 2012).

È importante sottolineare che le forme mutanti di AKT con legame stabile alla membrana, come il mutante del dominio PH E17K, o AKT miristoilato, sono costitutivamente attive e oncogene. È ancora dibattuto se l'ancoraggio a PIP3 sia un fattore limitante anche per il mantenimento dell'attività di AKT (Ebner et al., 2017).

AKT è una ser/thr chinasi di 57 kDa scoperta trenta anni fa da Stephen Staal, che clonò l'oncogene v-AKT dal retrovirus AKT8 (Staal, 1987). AKT è stato inoltre il primo effettore di PI3K ad essere validato (Manning & Toker 2017).

Nel genoma dei mammiferi vi sono tre isoforme conservate di AKT: AKT1 (PKBα), AKT2 (PKB ) e AKT3 (PKB ), codificate da tre diversi geni. AKT1 è espresso in maniera ubiquitaria, AKT2 è per lo più espresso nei tessuti insulino-dipendenti come il tessuto epatico, adiposo o nel muscolo scheletrico, mentre AKT3 risulta essere l'isoforma meno diffusa, è molto utilizzata a livello celebrale e in una particolare tipologia di adipocita chiamato 3T3-L1. La famiglia delle chinasi AKT sono conservate negli eucarioti superiori, infatti le sue tre isoforme possiedono il 95% di identità di sequenza amminoacidica se si paragonano quelle espresse in topo, ratto e umano (Yang et al., 2004).

Le tre isoforme di AKT possiedono tre domini conservati, il dominio pleckstrin homology (PH) a livello N-terminale, il dominio catalitico posizionato nella parte centrale della proteina e quello C-terminale. AKT2 e AKT3 condividono con AKT1 un'omologia di sequenza pari all'81% e all'83%, rispettivamente.

Oltre alle fosforilazioni PI3K-dipendenti citate in precedenza, necessarie per la sua attivazione, AKT può subirne altre in sedi differenti, per esempio, la T450 nel turn-motif è costitutivamente fosforilata da mTORC2 durante la traduzione di AKT. Questa modifica è necessaria per garantire un corretto folding al polipeptide durante il suo allungamento. I residui S129 e T312 sono anche loro correlati alla regolazione della funzionalità di AKT. E' stato dimostrato infatti che la CK2 fosforila il primo, favorendo un aumento dell'attività catalitica di AKT. Il secondo, subisce la stessa modifica post-traduzionale ad opera della GSK-3a, ottenendo però come risultato l'attenuazione dell'attività chinasica (Clark & Toker, 2004).

Finora abbiamo parlato di fosforilazione, sono state però identificate numerose altre modifiche post-traduzionali a carico di diversi residui che compongono le tre isoforme di AKT, come acetilazione, metilazione e glicosilazione (Sunderasan et al., 2011; Wani et al., 2010). Queste ultime risultano essere essenziali per una fine regolazione del livello di attivazione, della localizzazione cellulare o della substrato-specificità. Per esempio, l'acetilazione dell'amminoacido K14 contenuto nel PH domain sembra essere necessaria per il legame di AKT al PIP3 e di conseguenza per la sua traslocazione in membrana. SIRT1 è invece responsabile della deacetilazione di questo residuo (Sundaresan et al., 2011; Manning & Toker, 2017). K14 risulta essere fondamentale nella regolazione di AKT, in quanto è bersaglio di altre modifiche post-traduzionali come l'ubiquitinazione o la metilazione in base allo stato in cui si trova la cellula. L'ubiquitinazione dei residui di lisina di AKT non è solo utilizzata per mediarne la degradazione proteasoma-dipendente. Diversi growth factors infatti favoriscono l'attivazione di diverse E3 ubiquitina ligasi, come TRAF6, Skp2, NEDD4-1, in grado

di mediare questa modifica post-traduzionale sui residui di lisina contenuti nel PH domain che, in questo caso, amplifica la localizzazione in membrana della chinasi. La terminazione del segnale avviene mediante deubiquitinazione operata dall'enzima CYLD (Lim et al., 2012; Manning & Toker, 2017).

Tornando al meccanismo di trasduzione del segnale canonico, AKT, nella sua forma attiva, fosforila i residui di serina o treonina nel motivo R-x-x-R-x-S/T- (dove X è un qualsiasi amminoacido mentre indica residui idrofobici) (Alessi et al., 1996). Nel corso degli anni, è stata identificata un'ampia pletora di substrati contenenti questo motivo (Cenni et al., 2004; Cenni et al., 2008), e molti di essi sono stati confermati mediante esperimenti *in vivo* (Cesaro & Pinna, 2020). Dirigendo la sua attività verso questo ampio ventaglio di substrati, AKT può svolgere funzioni molto diverse nelle cellule. Sebbene la fosforilazione possa attivarne o inattivarne i substrati, il secondo caso è quello più comune.

È importante sottolineare che la fosforilazione di AKT da parte di mTORC2, a carico della T450, nel turn-motif, è necessaria per un suo corretto ripiegamento (Facchinetti et al., 2008). Per quanto riguarda il dominio regolatorio, AKT può essere fosforilata sui residui S477 e T479 dal complesso ciclina A-CDK2 mediante una modalità ciclo cellulare-dipendente, dalla mTOR-related kinase DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) in un contesto di danno al DNA (Bozulc et al., 2008), e da mTORC2, in seguito alla stimolazione mediata da growth factors (Liu et al., 2014). Un altro sito degno di nota è la S129, fosforilato dalla CK2 per aumentarne l'attività catalitica (Ruzzene et al., 2017), e T312, un sito inibitorio fosforilato da GSK3 (Gulen et al., 2012). Esistono tanti altri siti mappati dalla fosfoproteomica, ma attualmente il loro significato e i meccanismi di regolazione, rimangono sconosciuti.

La complessità delle interconnessioni tra i membri della via di segnalazione PI3K è esemplificata dal cross-talk di AKT con mTOR (figura 1.4).

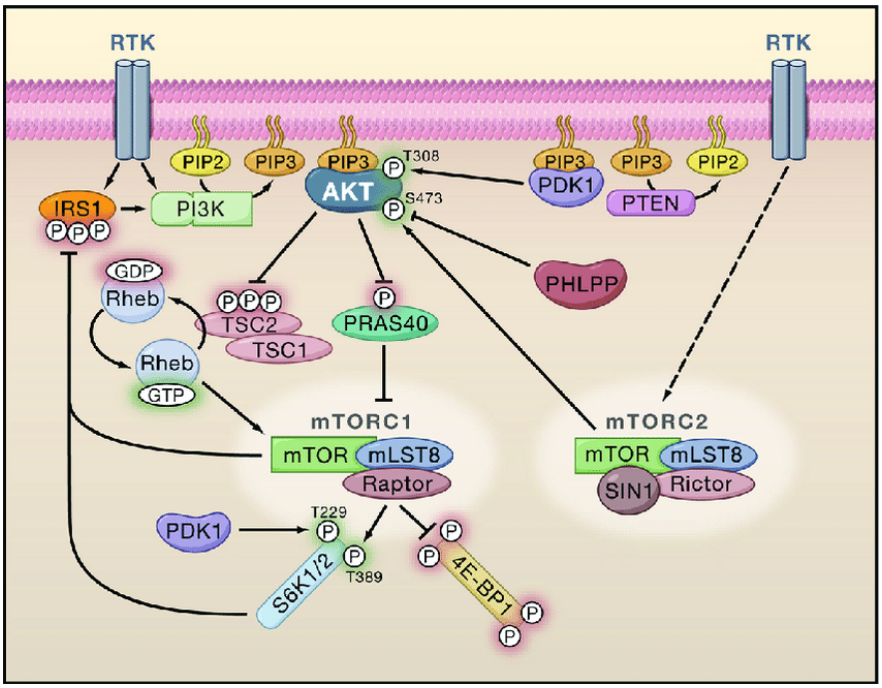



**Figura 1.4:** Una overview dei principali mediatori, regolatori negativi e bersagli della via di segnale PI3K/AKT/mTOR. Si veda il testo per i dettagli (Bhutani et al., 2013).

mTOR è membro della famiglia delle chinasi relate alla PI3K (PIKK family), il cui dominio catalitico possiede una significante omologia con quello della PI3K. A differenza di questa fosfatasi lipidica, i membri di questa famiglia agiscono da Ser/Thr chinasi.

mTOR, come gli altri membri della famiglia PIKK, possiede numerose ripetizioni HEAT all'interno del suo dominio N-terminale, i domini FRAP, ATM, TRRAP (FAT) e un FAT C-terminal (FATC) domain. HEAT e FAT sono due motivi con distinte funzioni attraverso i quali mediare interazioni con proteine. A differenza degli altri membri della famiglia PIKK, mTOR possiede un dominio FRB (FKBP12-rapamycin binding), la regione necessaria per associarsi al complesso FKBP12/rapamicina (uno suo specifico inibitore), posizionata tra la porzione N-terminale e il dominio chinasico (Dunlop e Tee, 2009).

Recentemente è stato identificato un "nuclear shutting signal" in cui sembrano essere essenziali i residui Leu545 e Leu547, il meccanismo con cui mTOR viene trasportato attraverso la membrana nucleare deve però ancora essere elucidato (Bachmann et al., 2006).

mTOR è la subunità catalitica di due complessi strutturalmente distinti: mTORC1 e mTORC2, localizzati in diversi compartimenti subcellulari, come i mitocondri, lisosomi, membrana del reticolo endoplasmatico, nucleo, che ne influenzano attivazione funzionalità (Betz e Hall, 2013).

Nell'asse canonico, AKT trasmette il segnale a valle a mTORC1. Quindi, quest'ultimo può attivare altri membri chiave a valle della via, come 4EBP1 e p70S6K. L'attività di mTORC1 è controllata dal tuberous sclerosis complex (TSC), formato dall'eterodimero TSC1 e TSC2, e dal proline-rich AKT substrate of 40 kDa (PRAS40). TSC2 contiene un dominio della GTPase-activating protein (GAP), in grado di attivare Rheb. Una volta convertito nella sua forma legata al GDP, Rheb diventa inattivo. La fosforilazione di TSC2, mediata da AKT, attiva la sua funzione GAP, responsabile dell'inattivazione di Rheb. In altre parole, AKT altera il controllo di Rheb sull'attività di mTORC1, in quanto la fosforilazione di TSC2 AKT-mediata, inattiva Rheb, un importante proattivatore di mTORC1 (Yang et al., 2017). Inoltre, l'attività regolatoria indiretta che AKT esercita su mTORC1, favorisce la fosforilazione di PRAS40 sul residuo T246 che, a sua volta, libera mTORC1 dalla sua attività inibitoria (Yang et al., 2017). Tuttavia, mentre mutazioni o delezioni a carico di TSC2/Rheb svincolano l'attivazione di mTORC1 da AKT, la perdita di PRAS40 produce solo un'attivazione parziale di mTORC1 (Manning & Toker 2017).

Il primo substrato di AKT ad essere identificato è stata la glicogeno sintasi chinasi 3 (GSK3) (Cross et al., 1995), una Ser/Thr chinasi costituita da due paraloghi, GSK3 (51 kDa) e GSK3 (47 kDa), ad alta omologia (il dominio chinasico è infatti sovrapponibile per il 98% della sequenza), con funzioni largamente ridondanti, ad eccezione di quelle svolte nel tessuto neurale e, limitatamente a GSK3 , del suo ruolo svolto in alcuni tipi di cellule staminali cancerose. GSK3 è una chinasi gerarchica fosfato-diretta (Cesaro et al., 2020). In assenza del segnale guidato dalla fosforilazione mediata da AKT, GSK3 è solitamente attivo. Tuttavia, la fosforilazione in S21/S9 sul residuo N-terminale di GSK3 / , genera un substrato intramolecolare che occlude la phosphate-binding pocket, rendendo così impossbile l'accesso dei substrati al sito catalitico (Frame et al., 2001).

Mentre per qualche tempo GSK3 è stato considerato un enzima chiave solo nel metabolismo e nei disordini metabolici, il suo ruolo è stato ora ampiamente ampliato e il suo impiego come target per la terapia del cancro è in fase di studio (Evangelisti et al., 2020).

La fosforilazione mediata da GSK3 è riconosciuta da specifiche E3 ubiquitina ligasi, che consentono la degradazione mediata dal proteasoma dei substrati di GSK3. Questi ultimi includono membri della famiglia di BCL-2, MCL-1 e c-Myc. Pertanto, queste proteine pro-survival sono stabilizzate in seguito all'attivazione di AKT e alla conseguente fosforilazione di GSK3.

La regolazione della proliferazione cellulare da parte di GSK3 può essere ottenuta attraverso un substrato chiave, vale a dire -catenina, effettore centrale della via canonica di Wnt. Nelle cellule quiescenti, la -catenina subisce la fosforilazione da parte di CK1 a carico della S45, agendo come sito di innesco, e sulle S41, S37 e S33, appunto da GSK3, seguita da ubiquitinazione e degradazione proteasomica (McCubrey et al., 2014). Al contrario, l'inibizione di GSK3 provoca la stabilizzazione della –catenina, e il suo trasferimento al nucleo grazie al "nuclear localization signal" che possiede. Nel nucleo, la -catenina interagisce con la famiglia di fattori di trascrizione Tcf/Lef che, a loro volta, transattivano i geni coinvolti nella proliferazione, nell'apoptosi e nell'invasione, di conseguenza, anche questo meccanismo di segnalazione svolge un ruolo chiave nella progressione tumorale se non regolato in modo fisiologico (Klaus et al., 2008). È importante sottolineare, tuttavia, che mentre la fosforilazione di Ser21/Ser9 da parte di AKT inibisce GSK3, tale inattivazione non influenza sempre i livelli di -catenina nella cellula né inibisce completamente GSK3. Di conseguenza la modulazione di GSK3 nell'asse WNT/ -catenina sembra seguire un meccanismo parallelo ma distinto da quello agito dal segnale AKT dipendente dal fattore di crescita.

I fattori di trascrizione Forkhead Box O (FoxO1, 3, 4 e 6) rappresentano substrati cruciali di AKT. La fosforilazione di tre residui conservati crea un motivo di riconoscimento per le proteine 14-3-3, che a loro volta sequestrano le proteine FoxO nel citosol. Se ai FoxOs viene impedito di entrare nel nucleo, non gli è possibile transattivare geni bersaglio coinvolti nell'apoptosi, come Bim e Puma, nell'arresto del ciclo cellulare, come p21 e p27, nel catabolismo e nell'inibizione della crescita come Sestrin3, MAP1LC3B e BNIP3, e nel metabolismo, come PEPCK e G6PC (Van der Vos e al., 2011).

### 1.2.2 La regolazione negativa dell'asse

La terminazione della segnalazione PI3K-dipendente avviene principalmente attraverso due meccanismi: il primo, catalizzato dalle fosfatasi lipidiche, consiste nella rimozione dei lipidi che agiscono da secondi messaggeri, il secondo è invece la diretta defosforilazione della forma attiva di AKT (Maehama e Dixon, 1998) (figura 4).

Le principali fosfatasi lipidiche implicate in questo processo sono PTEN, inositol polyposphate 4-phosphatase type II (INPP4B) e SHIP. La loro attività viene esplicata rispettivamente a livello della terza, quarta e quinta

posizione dell'anello PI (Bunney et al., 2010). In particolare, PTEN riduce il contenuto cellulare di PIP3, defosforilandolo e convertendolo in PIP2 (Gewinner et al., 2009), mentre ci sono tre substrati noti di INPP4B: PI3,4P2, PI4,5P2 (PIP2) e PI1,3,4P3 (Ferron et al., 2011; Lopez et al., 2013). L'espressione di SHIP è ristretta alle cellule del tessuto emopoietico, idrolizza specificatamente il fosfato in posizione 5 del PI3,4,5P3 (PIP3) trasformando quest'ultimo in PI3,4P2 (http://www.uniprot.org/uniprot/Q92835). I prodotti lipidici di PI3K sono downregolati con tempistiche dipendenti dallo specifico tipo cellulare e dagli stimoli che riceve (Auger et al., 1989).

Come già anticipato ad inizio paragrafo, la defosforilazione diretta di AKT, mediata dalle fosfatasi protein phosphatase 2A (PP2A; Andjelkovic et al. 1996) e PH domain leuchine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP; Gao et al., 2005), è il secondo meccanismo coinvolto nella regolazione negativa della pathway. PP2A defosforila la T308 di AKT, inattivandolo. In particolare, uno studio ha mostrato come B55α, la subunità regolatoria di PP2A, sia in grado di legare direttamente AKT in cellule linfoidi (Kuo et al., 2008).

PHLPP invece agisce defosforilando il motivo idrofobico di AKT (contenente il residuo S473 nell'isoforma AKT1), inducendo così inibizione dell'attività chinasica e promozione della morte per via apoptotica (Gao et al., 2005; Brognard et al. 2007).

La regolazione negativa della pathway PI3K/AKT/mTOR risulta essere fondamentale per un corretto mantenimento dell'omeostasi cellulare, infatti l'assenza di questi meccanismi inibitori porta inevitabilmente ad un aumento della proliferazione e della crescita cellulare e ad un'inibizione dell'apoptosi. Ne consegue che mutazioni somatiche della maggior parte delle proteine impiegate in questi processi siano frequentemente associate a cancro. In particolare, la delezione o la perdita di funzione di PTEN, PHLPP1 e PHLPP2 porta ad un'attivazione costitutiva dell'asse PI3K/AKT/mTOR, favorendo così il processo di trasformazione neoplastica (Li et al., 1997; Samuels et al., 2004; Chen et al., 2011).

Oltre al suo ruolo di regolatore negativo della segnalazione di PI3K, tuttavia, va ricordato che PTEN mantiene anche alcune funzioni non correlate alla fosfatasi lipidica (Milella et al., 2015): attraverso la defosforilazione diretta delle chinasi FAK, SHC e Fyn infatti PTEN può influenzare la migrazione cellulare (Dey et al., 2008).

L'attività di PTEN ha una fine regolazione, che comprende infatti meccanismi sia a livello trascrizionale, che post-traduzionale. Sono stati segnalati diversi regolatori positivi della trascrizione di PTEN, come p53, EGR1 (post stimolazione da parte di IGF-2) e PPAR  (Patel et al., 2001), mentre SNAIL, c-Jun e NF-kB sono

regolatori negativi della sua trascrizione (Ciuffrida et al., 2012). Inoltre, a livello post-trascrizionale, la sua espressione può essere modulata dal miR-25, a valle delle vie PI3K/AKT e MEK/ERK (Escriva et al., 2008), nonché da Myc, che downregola PTEN mediante l'upregolazione di miR-19 e del miR-21 (Benhamou et al., 2018). Inoltre, è stato dimostrato che miR-153 favorisce la proliferazione delle cellule di PC umano attraverso la downmodulazione dell'espressione di PTEN (Wu et al., 2013).

È anche importante sottolineare che lo pseudogene PTEN 1 (PTENP1), mostra funzioni di esca verso i miR che bersagliano PTEN, stabilizzandone quindi l'mRNA e aumentandone i livelli proteici (Song et al., 2012).

Per quanto riguarda la regolazione post-traduzionale, PTEN può subire diverse modificazioni, in particolare la fosforilazione, l'acetilazione, l'ossidazione e l'ubiquitinazione. Sicuramente quella degna di nota è la fosforilazione, che avviene a livello di un cluster di residui nella coda C-terminale. Questa modifica da un lato stabilizza PTEN, ma ne ostacola anche l'attività di fosfatasi lipidica.

È interessante notare che la fosfatasi PHLPP1, che defosforila la S473 di AKT, è stata segnalata per agire come soppressore del tumore alla prostata, infatti, in letteratura è segnalato che in modelli murini con delezione parziale di PTEN, la perdita di PHLPP1 induce carcinoma prostatico (Chen et al., 2011). In linea con questo rapporto, il nostro gruppo ha recentemente evidenziato l'esistenza di un circuito di cross-regolazione PTEN-PHLPP guidato da AKT nelle cellule epiteliali della prostata (Bertacchini et al., 2019).

## 1.3 Il crosstalk fra il meccanismo di segnalazione mediato da PI3K/AKT/mTOR e Ras/MAPK

### 1.3.1 La via di segnale Ras/MAPK

La via di segnale Ras/MAPK è anch'essa un meccanismo molecolare di regolazione dell'espressione di geni legati alla proliferazione, migrazione, differenziamento, senescenza e sopravvivenza cellulare (Cenni et al., 2008). La pathway è innescata dal legame Growth factor – RTK sulla superficie extracellulare e conseguente dimerizzazione e autofosforilazione del recettore sui residui di tirosina all'interno della sua coda intracitoplasmatica. Si generano così siti di attracco per proteine adattatrici, la cui funzione sarà quella di stimolare a cascata gli effettori a valle, fra queste, le principali sono la growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2), in grado a sua volta di reclutare Son of Sevenless (SOS) e la GTPasi Ras, innescando così l'attivazione

della cascata delle MAPK (ovvero RAF-MEK-ERK) e guidare la trascrizione dei geni bersaglio della pathway (Pearson et al., 2020).

La cascata Ras/MAPK è frequentemente attiva in modo costitutivo in numerosi tumori umani, incluso quello prostatico (Santarpia et al., 2012). Alterazioni genetiche che inducono un guadagno di funzione, in particolare mutazioni e amplificazioni, in Ras (H-Ras, N-Ras, o K-Ras) e BRAF, sono stati riportati nel carcinoma prostatico primario e metastatico (con un'incidenza dell'1-8%), e un'amplificazione del segnale delle MAPK è correlabile con meccanismi di resistenza alla castrazione e all'instaurarsi di un fenotipo invasivo (Abida et al., 2019).

### 1.3.2 Una overview dei principali meccanismi di interazione fra le vie di Ras ed AKT

Le cascate PI3K/AKT/mTOR e Ras/MAPK sono fortemente interconnesse a livelli differenti (figura 5), prevalentemente per

i) meccanismi di regolazione a monte, come RTK/GPCR e loro proteine adattatrici, condivisi.
ii) Meccanismi citosolici di segnalazione in grado di interagire e regolarsi in modo incrociato.
iii) Regolazione di un ventaglio di target comune nel nucleo (come BAD e RPS6) (Mendoza et al., 2011).

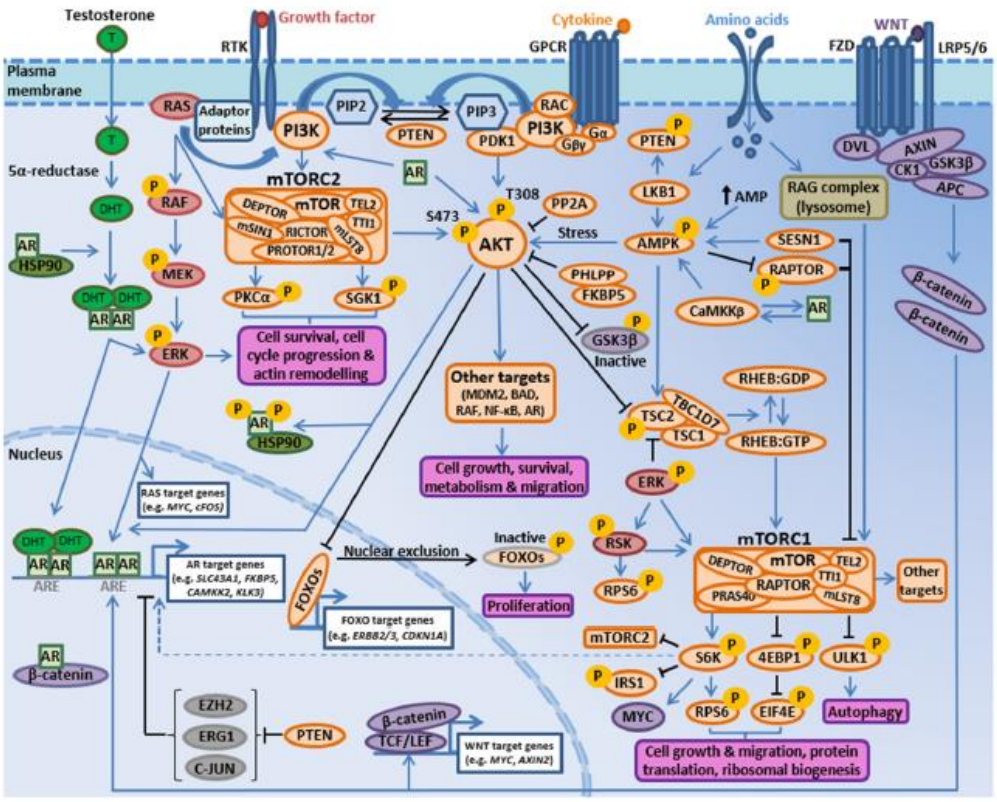



**Figura 1.5:** Illustrazione della complessità della pathway PI3K-AKT-mTOR e di quelle a lei interconnesse, come AR, Ras/MAPK, e WNT. Immagine adattata da Pearson et al., 2020.

Alcuni esempi di questi meccanismi sono rappresentati dal complesso GRB2-SOS, reclutato dai RTK attivati, in grado di legarsi alla proteina scaffold GAB1, che, a suo volta, interagendo con Ras-GAP, SHP2, PI3K e PIP3, induce una upregolazione delle vie Ras/MAPK e PI3K/AKT/mTOR (Mendoza et al., 2011). Inoltre, la segnalazione mediata da mTORC1 può regolare negativamente la segnalazione di RTK a monte, generando così un meccanismo di feedback negativo e ridurre entrambe le attività delle due pathway appena citate.

Un altro esempio di crosstalk fra le due vie è dato dall'attività di un importante substrato del IGF-1R e di una proteina adattatrice che promuovono l'attivazione sia di PI3K, che di Ras, legandosi rispettivamente a p85 e Grb2 (Copps et al., 2012). Inoltre, fra i meccanismi di feedback negativo, va sottolineata l'attività soppressoria del complesso mTORC1-S6K su Irs-1, proteina substrato del recettore dell'insulina, regolata anche da Ras (Pruett et al., 2021). D'altro canto, S6K può anche fosforilare RICTOR, così da ridurre la segnalazione di mTORC2 (Dibble et al., 2009).

Alla membrana, Ras-GTP può anche legarsi al dominio di legame Ras (RBD) di p110 , p110 e p110 per attivare direttamente diverse isoforme della subunità catalitica PI3K di Classe I (Steelman et al., 2011). Anche a livello intracellulare i componenti di entrambe le cascate interagiscono formando circuiti di feedforward e

feedback che consentono a PI3K/AKT/mTOR la regolazione incrociata della via Ras/MAPK (Rozengurt et al., 2014). Ad esempio, è stato dimostrato che l'attivazione di Ras/MAPK stimola la segnalazione di mTORC1 attraverso ERK che, a sua volta, può fosforilare direttamente TSC2, RAPTOR e la S6K, così da inattivare/dissociare il complesso TSC1/TSC2 e regolare il reclutamento di substrati mTORC1 (Butler et al., 2017). ERK è anche in grado di fosforilare il serum response factor (SRF), CREB e RPS6, promuovendo così la traduzione cap-dipendente mediata da mTORC1-S6K (Lara et al., 2013). Per quanto riguarda AKT, è nota la sua capacità di fosforilare direttamente e regolare negativamente RAF, sopprimendo così la cascata MAPK (Guan et al., 2000). Recentemente, inoltre, è stato dimostrato che Ras attivato interagisce con mSIN1, così da stimolare la segnalazione di mTORC2 nelle cellule tumorali (incluse nelle linee di PC) (Pearson et al., 2020).

### 1.3.3 Co-targeting delle vie Ras/MAPK e PI3K/AKT/mTOR e loro implicazione nella resistenza adattativa, nel cancro prostatico

Nonostante i risultati promettenti nei primi studi preclinici (Majumder et al., 2004; Wu et al., 2005), molti inibitori allosterici di mTORC1 (come la rapamicina o i suoi analoghi Everolimus e Temsirolimus) sono stati inefficaci nei pazienti oncologici, a causa della loro incapacità di sopprimere completamente l'attività di AKT e per via di una serie di effetti collaterali (Wu et al., 2005). Un grave problema è anche quello dell'induzione di meccanismi di resistenza adattativa che coinvolgono sia attori della pathway di PI3K stessa, che quelli della via Ras/MAPK (Kinkade et al., 2008). Esperimenti eseguiti su cellule epiteliali della prostata normali e trasformate hanno mostrato un aumento della segnalazione Ras/MAPK in risposta all'inibizione di mTORC1 (Carracedo et al., 2008), e la somministrazione di Everolimus in un modello murino di PC con delezione di PTEN, ha mostrato di indurre un aumento dell'attività della segnalazione MAPK (Carracedo et al., 2008). Sebbene i meccanismi alla base della resistenza agli inibitori di mTORC1 non siano stati completamente definiti, sono note diverse risposte al farmaco che coinvolgono le vie di segnale prima citate. Infatti, la co-attivazione delle vie di segnalazione Ras/MAPK e PI3K/AKT/mTOR si verifica frequentemente nelle neoplasie umane, incluso il PC, quindi una considerevole ricerca è stata dedicata a stabilire come interagiscono queste due cascate legate a meccanismi di tumorigenesi (Butler et al., 2017). Dalla letteratura è noto che un'elevatissima percentuale di pazienti con PC metastatico, mostrano una deregolamentazione di entrambe le cascate (Taylor et al., 2010).

Esperimenti in modelli murini PTEN -/-, in possesso della mutazione attivante $kRas^{G12D}$, hanno chiarito che una regolazione non fisiologica di queste due vie, favorisce una crescita del tumore più rapida e una tendenza alla metastatizzazione molto maggiore rispetto a modelli singoli mutanti (Wang et al., 2012).

Presi nel loro insieme, questi risultati indicano che le vie di PI3K/AKT/mTOR e Ras/MAPK sinergizzano nella promozione della crescita del PC e nella progressione in senso metastatico, e data la frequenza di co-attivazione di queste cascate in clinica, questo fornisce una chiara giustificazione per esplorare l'effetto della combinazione di molecole inibitrici delle due vie prese in esame in pazienti con carcinoma prostatico avanzato.

I dati preclinici presenti in letteratura stimolano l'interesse verso questo approccio, in quanto è noto che l'inibizione di MEK è associata ad un importante aumento dell'attività della via di AKT in numerose cellule tumorali di mammifero, comprese in quelle di PC (Turke et al., 2012). E' stato anche dimostrato che la co-inibizione di MEK e mTORC1, può ridurre significativamente la massa tumorale rispetto alla monoterapia, in un modello murino di PC, portatore della delezione eterozigote simultanea di Nkx3.1 e PTEN (Kinkade et al., 2008) e che, allo stesso tempo, inibisce la proliferazione cellulare e manifesta un effetto citotossico nella linea di carcinoma prostatico umano CWR22Rv1, resistente alla castrazione (Gioeli et al., 2011). Tuttavia, Mulholland e colleghi, hanno confermato che la sola inibizione di MEK è sufficiente per sopprimere la diffusione metastatica di cellule staminali/progenitori attivati di PC, ortotopicamente trapiantati *in vivo*, portatrici di delezione di PTEN e iperattivazione di K-Ras (Mulholland et al., 2012) Questi aspetti evidenziano la necessità di migliorare la nostra comprensione molecolare di come queste cascate interagiscano durante la progressione della malattia, e di quali siano i loro principali driver genetici, così da aiutare la stratificazione dei pazienti che trarranno beneficio dall'inibizione di PI3K/AKT/mTOR, dall'inibizione di MEK o dal blocco combinato delle due pathway.

Diversi studi clinici sul PC sono stati progettati per studiare l'efficacia terapeutica dell'inibire specificatamente MEK (ad esempio come nel caso dei trials "ClinicalTrials.gov identifiers: NCT02881242 and NCT01990196", che sfruttano l'inibitore di MEK1/2, trametinib) o la cascata PI3K/AKT/mTOR (come nel caso dei trials NCT01485861/NCT03673787 e NCT02525068/NCT02121639, che utilizzano i pan-AKT inhibitors ipatasertib e capivasertib, rispettivamente) (De Bono et al., 2019). Per questi ultimi, è interessante sottolineare come studi pubblicati mostrino che i meccanismi alla base della resistenza adattativa se utilizzati come

monoterapia, siano collegati ad un aumento della segnalazione Ras/MAPK e all'attività di mTORC2 (Porta et al., 2014).

Anche la metformina (un farmaco orale contro il diabete di tipo 2) è attualmente in fase di studio nel PC nell'ambito del trial STAMPEDE (Gillesen et al., 2016). Il meccanismo di azione di questo farmaco è quello di bloccare il complesso I della catena respiratoria mitocondriale, causando così una ridotta produzione di ATP mitocondriale, inducendo una crisi energetica cellulare con successiva attivazione di AMPK e inibizione di mTORC1 (Viollet et al., 2011). Inoltre, è stato dimostrato che inibisce MEK/ERK in risposta a fattori di crescita, contrastando i trattamenti con l'inibitore di mTORC1, rapamicina, che per contro aumenta la segnalazione di MAPK (Soares et al., 2013).

## 1.4 Il ruolo della via di segnale PI3K/AKT/mTOR nel cancro prostatico

### 1.4.1 Il crosstalk fra la via PI3K/AKT/mTOR e la segnalazione genomica del AR

L'inibizione della segnalazione AR (Androgen Receptor) è uno dei principali obiettivi terapeutici nel trattamento del PC. Il crosstalk fra la pathway PI3K/AKT/mTOR e la segnalazione dell'AR è ben documentato in letteratura (figura 1.5 e figura 1.6), è importante sottolineare come la prima possa fungere da giunzione tra segnalazione AR genomica e non genomica.

AR è un fattore di trascrizione che appartiene alla famiglia dei recettori nucleari per ormoni. In generale, gli AR inattivi risiedono nel citoplasma della cellula e interagiscono con chaperones e co-chaperones come le heat shock protein, fra le quali, una particolarmente importante per la stablizzazione di questo recettore è PAS (Saranyutanon et al., 2019). Questa interazione impedisce la traslocazione nucleare di AR. La via canonica del AR viene innescata dal legame androgeno-recettore a livello del ligand binding domain su quest'ultimo, che induce un cambio conformazionale e conseguente attivazione del AR. Il recettore a questo punto si dissocia dal legame con le proteine chaperones, ed è libero di dimerizzare con un'altra molecola di AR attivata e di traslocare nel nucleo, dove il complesso potrà legare le sequenze con senso "androgen response element" (ARE) e regolare la trascrizione dei geni bersaglio. Questo meccanismo è noto come "segnalazione AR genomica", è ligando-dipendente e avviene nell'arco di alcune ore dalla stimolazione (Liao et al., 2013). Inoltre,

AR attivato, può legarsi a siti di cromatina non canonici, mediante un legame che risulta essere potenziato soprattutto nei casi di resistenza alla terapia (Wilson et al., 2016).

In assenza della stimolazione androgenica, la segnalazione AR genomica può essere regolata da cascate citoplasmatiche, inclusa la via PI3K/AKT, a loro volta attivate da fattori di crescita e citochine (Traish et al., 2009). In tal caso, AR subisce modifiche post-traduzionali, in particolare fosforilazione, acetilazione, metilazione, ubiquitinazione e SUMOilazione (Wen et al., 2020). L'AR attivato da fattori di trasduzione del segnale può comunque traslocare nel nucleo e regolare la trascrizione del gene bersaglio.

### 1.4.2 Il crosstalk fra la via PI3K/AKT/mTOR e la segnalazione non-genomica del AR

La segnalazione del AR può anche avvenire in modo non genomico. In questo caso, la traslocazione del AR al nucleo non è necessaria, perciò, a differente di quella appena discussa, questo tipo di trasduzione del segnale avviene nell'arco di pochi minuti (Leung et al., 2017), in quanto è sufficiente che l'AR citoplasmatico attivato, interagisca con altre molecole effettrici nel citoplasma o localizzate nei lipid rafts di membrana (Migliaccio et al., 2000). Questo step attiva un ventaglio di cascate di segnalazione, che regolano la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, con effetto anti-apoptotico, o coinvolte nella migrazione.

Diverse molecole di segnalazione sono note per interagire con AR, fra queste, le principali sono PI3K, AKT, Src, Ras/RAF, PKC, MAPK/ERK (Kokal et al., 2020). E' interessante notare come alcune di queste molecole, una su tutte AKT, possano fungere da giunzione tra i meccanismi di segnalazione AR genomica e non genomica. La cross-fosforilazione che avviene fra AKT e AR ne è un esempio: da un lato, il legame androgeno-AR porta ad un aumento dell'attività chinasica di AKT (Roediger et al., 2014), dall'altro, quest'ultimo fosforila AR sui residui Ser210, Ser213, Ser215, Ser791 and Ser792, regolandone così l'attività trascrizionale (Wen et al., 2020). Quindi, i downstream targets di queste cascate attivate innescate dalla segnalazione AR non-genomica possono anch'esse interagire con AR libero dal legame con ormoni, e eventualmente portare ad una sovrapposizione con i meccanismi di segnalazione androgeno-dipendente. Questo suggerisce che la via mediata da AR può essere compensata ed eventualmente sostituita quando la cellula contrasta alcune pressioni selettive.

### 1.4.3 Il guadagno di funzione di PI3K

Oltre alla delezione di PTEN, altri meccanismi in grado di indurre una iperattivazione della via di PI3K nel PC, sono sicuramente i guadagni di funzione dei suoi tre principali attori, PI3K, AKT e mTOR, sia in seguito a mutazioni proattivatorie, che in seguito ad amplificazione.

Mutazioni in PIK3CA, che codifica per la subunità catalitica p110 , essenziale effettore a monte della via, è un frequente bersaglio di mutazioni in questa patolgia: dalla letteratura è noto che circa il 30% dei pazienti CRPC presenta mutazioni p110 (Sarker et al., 2009). Coerentemente, da uno studio di Pearson e colleghi del 2018, eseguito su 9 dataset di dati genomici di PC, emerge che circa il 28% dei casi mostra un elevato livello di amplificazione di questo gene (Pearson et al., 2018). Ora, nonostante sia nota un'attività antiproliferativa e antitumorale in seguito all'utilizzo di inibitori di PI3K p110 -specifici (Pungsrinont et al., 2021), rimane la domanda se p110 sia realmente uno dei target principali su cui puntare nella sperimentazione di nuove terapie contro il PC. Questo perché, in seguito a studi eseguiti su PC portatore di delezione di PTEN, è emerso che sola la delezione di PIK3CB, e non di PIK3CA, induce una netta riduzione della fosforilazione di AKT, con un importante impatto sulla proliferazione e sopravvivenza delle cellule tumorali (Manning & Toker, 2017). Quindi, questo suggerisce che p110 , e non p110 , potrebbe essere l'isoforma con il ruolo più importante nell'induzione del PC.

A differenze delle subunità e , è molto più raro trovare mutazioni o amplificazioni della subunità p110 (Manning & Toker, 2017). Tuttavia, in letteratura è possibile trovare casi in cui l'inattivazione di p110 ha inibito la segnalazione PI3K/AKT e, di conseguenza, la proliferazione cellulare in p110 -highly expressed CRPC cells (Pungsrinont et al., 2021), suggerendo che questo marcatore potrebbe essere un valido bersaglio per questa determinata sottopopolazione di PC. Oltre alle alterazioni della subunità catalitica PI3K, anche alterazioni genetiche o delezione di subunità regolatorie come p85 possono in parte promuovere la segnalazione PI3K/AKT/mTOR. Da un lato, p85 sopprime l'attività di p110 in assenza di stimoli e, dall'altro, è richiesta l'eterodimerizzazione p85-p110 dopo l'attivazione di RTK per stimolare la segnalazione di PI3K/AKT/mTOR (Thorpe et al., 2015). È importante sottolineare che sia la subunità catalitica p110 , che la subunità regolatoria p85 , sono essenziali per la transattivazione AR e per la progressione del PC (Zhu et al., 2008).

### 1.4.4 Il guadagno di funzione di AKT

Scendendo lungo la via di PI3K, si trova il suo effettore chiave, ovvero AKT. Visto il suo ruolo fondamentale nella regolazione di processi di sopravvivenza e di proliferazione, e quindi di essere un potente oncogene, se la sua attività non viene finemente regolata in modo fisiologico, è sicuramente un importante candidato per lo sviluppo di molecole utilizzabili nella terapia con inibitori di protein-chinasi nel cancro. E' noto che l'iperattivazione di AKT porta ad inibizione della morte cellulare nella linea cellulare umana di adenocarcinoma prostatico invasivo LNCaP, e promuove la crescita del tumore e la resistenza alla castrazione in modelli murini transgenici (Li et al., 2007). È interessante notare che in termini di guadagno di funzione, sia più di frequentemente rilevata l'amplificazione, rispetto a fenomeni di mutazione (Manning & Toker, 2017). In linea con questo, alterazioni genetiche a carico di PDK1, PHLPP1/2 e PP2A, importanti regolatori di AKT, possono essere meccanismi paralleli che consentono un aumento della funzionalità della chinasi (Manning & Toker, 2017).

Un readout dell'attivazione di AKT può essere rilevata dai livelli di fosforilazione della Ser473 e Thr308. Sorprendentemente, entrambi gli agonisti AR usati nella SAL (supraphysiological androgen level) nell'ambito della BAT, o l'antagonista del AR, Enzalutamide, utilizzati in clinica, non solo inibiscono la proliferazione cellulare, ma aumentano anche la fosforilazione di AKT nelle linee di PC (Pungsrinot et al., 2020), rendendo le cellule LNCaP resistenti all'apoptosi. Questo modello in vitro può rappresentare uno sviluppo iniziale di CRPC AR-indipendente. Un altro meccanismo da sottolineare se si parla di fosforilazione indotta dall'utilizzo di antagonisti di AR, è senza dubbio la regolazione della trascrizione di FKBP5, un target transattivato da AR, coinvolto perciò nella regolazione della responsività dei recettori degli ormoni steroidei. Essendo un co-chaperones associato a HSP90, è stato dimostrato che regola negativamente la segnalazione di AKT, stabilizzando le proteine fosfatasi PHLPP1/2 (Pei et al., 2009). Ciò significa che la soppressione della transattivazione AR-mediata di FKBP5, favorisce la fosforilazione di AKT. Alcuni lavori pubblicati, suggeriscono che l'ADT stimoli la segnalazione di AKT e, di conseguenza, la sopravvivenza delle cellule neoplastiche, in parte attraverso la downregolazione di FKBP5 (Qin et al., 2014). Quindi, indurre una riduzione dell'espressione di FKBP5 durante l'ADT, o effetturare una terapia mirata sul AR, potrebbe indurre

questi circuiti di feedback responsabili dell'attivazione di AKT e dell'induzione di una resistenza adattativa al farmaco.

In linea con questo, un aumento del livello di fosforilazione di AKT è correlato con un elevato Gleason score e una prognosi spesso infausta in pazienti affetti da CRPC (Bedolla et al., 2007). Inoltre, parametri biochimici quali l'aumento del livello di fosforilazione di AKT e la delezione di PTEN, possono essere associati ad un elevato Gleason score, per predire la possibilità di recidiva in pazienti trattati con prostatectomia radicale (Bedolla et al., 2007).

### 1.4.5 Il guadagno di funzione di mTOR

Il guadagno di funzione di mTOR è soprattutto legata ad alterazioni genetiche di TSC1/2, ovvero i regolatori a monte di mTORC1/2. Da un lato, la delezione di Tsc1 nell'epitelio prostatico di modelli murini causa PC, associato di conseguenza ad un'elevata segnalazione di mTORC1 (Kladney et al., 2010). D'altra parte, la delezione combinata in eterozigosi TSC2+/- e PTEN+/-, è sufficiente per promuovere l'attivazione di mTOR e la tumorigenesi a livello prostatico *in vivo* (Ma et al., 2005). Se da un lato i meccanismi legati ai regolatori a monte siano fondamentali e i più frequenti nella cancerogenesi di questo tessuto, anche le alterazioni genetiche dei componenti di mTORC1/2 meritano di essere menzionate. È interessante notare che, nonostante la frequenza delle alterazioni genetiche a carico di questi ultimi sia bassa, l'amplificazione del gene DEPTOR, in clinica, sembra essere rilevata fino al 21.4% dei casi, e correlata con una peggiore progression-free survival (Hu et al., 2018). Questo dato ha però un che di sorprendente, perchè DEPTOR è in realtà un soppressore endogeno dell'attività della chinasi mTOR. Una possibile spiegazione di questo impatto sull'outcome dei pazienti, è che la sovraregolazione DEPTOR sopprime il feedback inibitorio mediato dal segnale mTORC1-p70S6K verso mTORC2 e PI3K, con conseguente aumento dell'attivazione di AKT e dell'attività di mTORC1 (Peterson et al., 2009). Infine, anche RICTOR, componente principale di mTORC2 che lo rende insensibile alla rapamicina, ha un ruolo nel guadagno di funzione di mTOR. In letteratura è riportato che Rictor è un necessario per il processo di cancerogenesi prostatica PTEN loss-indotta nel topo (Guertin et al., 2009).

Studi in vivo a supporto di questa teoria mostrano che la delezione di Rictor sopprime la crescita del PC PTEN -/-. Pertanto, suggeriscono che l'alterazione oncogenica di RICTOR che causa il aumento di funzionalità di mTORC2, potrebbe facilitare la progressione del PC (Carr et al, 2015).

## 1.5 La terapia e la resistenza adattativa al farmaco nel cancro prostatico

### 1.5.1 Una overview delle principali strategie terapeutiche del cancro prostatico nell'attuale pratica clinica

Il PC è una malattia eterogenea dal punto di vista clinico. E' il principale tipo di cancro diagnosticato nell'uomo e ne è la terza causa di morte cancro-relata, sviluppandosi principalmente nei maschi al di sopra dei 70 anni ed evidenziando attualmente una sopravvivenza del 90% a 5 anni dalla diagnosi (WHO, 2020).

Strategie terapeutiche come la androgen deprivation migliorano la qualità della vita dei pazienti, ma non sono sufficienti per eradicare la patologia. Infatti, sono numerosi i casi di pazienti che, nonostante siano affetti da una forma di PC localizzato, e godano di buona prognosi in seguito alla castrazione, vanno incontro a ricadute e allo sviluppo di PC castrazione-resistente e metastatico (Aggarwal et al., 2017; Feng et al., 2019).

La ricaduta o una nuova progressione della malattia spesso avvengono a causa di una risposta adattativa al farmaco, che sfrutta vie alternative a quella della segnalazione del AR. Fra queste, una delle principali è senza dubbio la via di segnale PI3K/AKT/mTOR, nota per il suo ruolo nella regolazione di un ampio ventaglio di processi biologici, dalla sintesi proteica, alla proliferazione cellulare, passando per la glicolisi e la migrazione, solo per citarne alcuni dei più significativi per questa patologia (Jillson et al., 2021). Proprio per questa sua grande versatilità, la via di AKT rappresenta uno dei più importanti effettori dei meccanismi di resistenza adattativa alle terapie classiche contro il PC. E' importante sottolineare come siano tanti i meccanismi alla base della sua attivazione costitutiva. Infatti, oltre alle classiche mutazioni che consentono un guadagno di funzione ai suoi principali effettori (in particolare PI3KCA, AKT, e PTEN), anche le modifiche post traslazionali ed epigenetiche rappresentano altri meccanismi fondamentali nell'instaurazione di questi meccanismi molecolari di progressione tumorale e di farmaco resistenza.

Le terapie di elezione contro il PC sono:

i) la rimozione chirurgica della ghiandola prostatica (prostatectomia radicale), che rappresenta la miglior strategia per la rimozione di un PC localizzato (Brawley et al., 2018).

ii) La radioterapia associata alla terapia ormonale, strategia selezionata in base all'età e allo stato generale di salute del paziente (Huggins et al., 1941).

iii) La terapia di deprivazione androgenica (ADT), opzione terapeutica molto sfruttata ultimamente, basata sul tentativo di ridurre i livelli sierici di testosterone al minimo possibile, così da minimizzare il suo effetto stimolatorio sulle cellule neoplastiche (Sharifi et al., 2005). Questa strategia è anche nota come "castrazione chimica", in quanto utilizza farmaci antiandrogeni (in particolare agonisti dell'ormone di rilascio delle gonadotropine), con lo scopo di inibire l'asse ipotalamo – ipofisi – gonadi maschili. In parallelo, esistono farmaci in grado di bersagliare il complesso enzimatico del citocromo P450, con lo scopo di ridurre drasticamente la sintesi di androgeni a partire dai loro precursori steroidei (Sharifi et al., 2005).

Per quanto riguarda queste ultime strategie farmacologiche, in diverse occasioni, dopo un'iniziale riposta delle cellule cancerose, si instaura lo stadio di castration resistant prostate cancer (CRPC) (Harris et al., 2009). Quest'ultimo è causa di metastatizzazione del tumore, e, di conseguenza, di un peggioramento della prognosi e di mortalità.

Sono stati proposti tanti meccanismi alla base di questo fenomeno, fra cui un aumento della sintesi di androgeni da parte delle cellule neoplastiche, mutazioni, amplificazione o overespressione del AR e, soprattutto, il crosstalk fra il AR e pathway di proliferazione cellulare, come quella mediata da AKT (Mills et al., 2014) (figura 1.6).

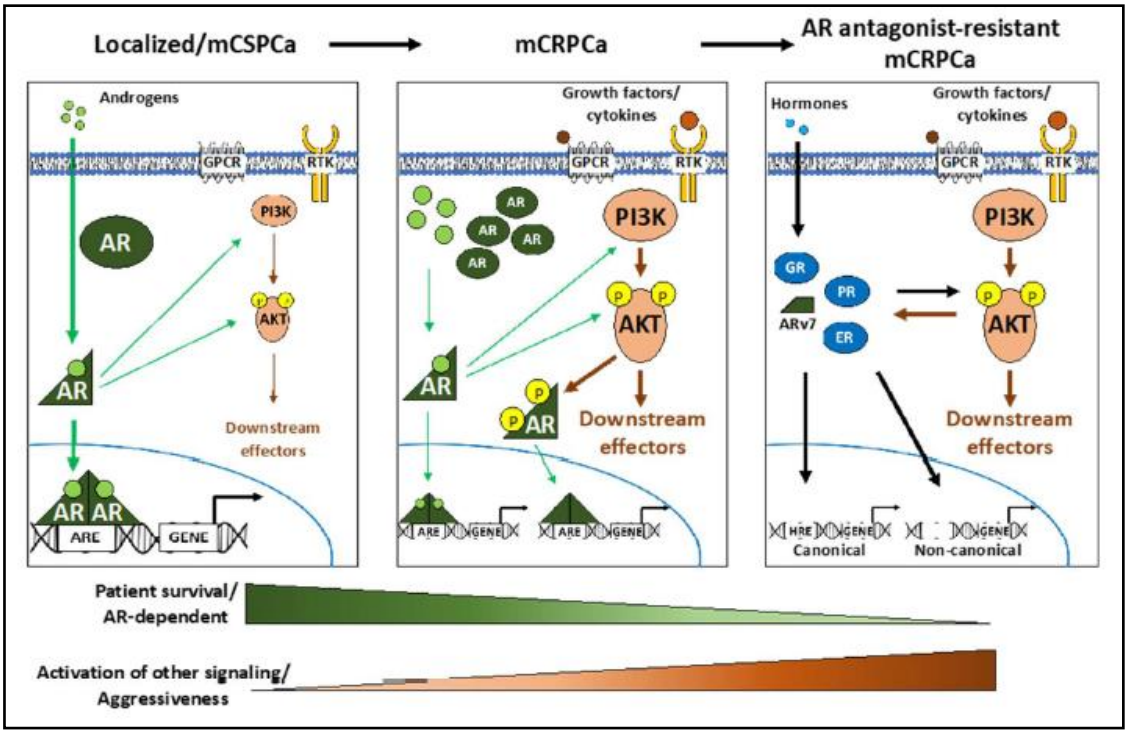



**Figura 1.6:** La transizione dal PC da AR-dipendente, a PI3K/AKT/mTOR pathway-dipendente. Nel pannello di sinistra è possibile apprezzare un esempio di tumore prostatico localizzato, e a questo stadio, la malattia è responsiva al segnale mediato dagli androgeni circolanti, che, mediante AR, stimolano la crescita della neoplasia. E' perciò sensibile alla castrazione. Nel pannello centrale sono invece raffigurati i meccanismi molecolari che rendono il tumore prostatico resistente alla castrazione, in quanto, grazie ad altre pathway come quella di AKT, la segnalazione mediata da AR resta attiva anche in assenza di androgeni. Infine, nel pannello di destra, viene mostrato l'ultimo stadio del tumore, ovvero quando la pressione selettiva indotta dagli antagonisti di AR, lo renda resistente agli stessi, in quanto la sua proliferazione diventa del tutto AR indipendente per via dell'espressione di varianti di splicing del recettore (ARv7) mancanti di ligand binding domain, o mutazioni dello stesso. In questa fase, oltre a sfruttare la via di AKT come principale driver della sua proliferazione, sfrutta anche recettori che lo rendono responsivo anche ad altre tipologie di ligando, come progesterone, glucocorticoidi e estrogeni. Immagine adattata da Pungsrinont et al., 2021.

Inoltre, vi sono altre strategie terapeutiche, quali la SAL (supraphysiological androgen level), e la BAT (bipolar androgen therapy), ovvero una combinazione fra ADT e SAL. Quest'ultima inizialmente sembrava dare risultati interessanti, in quanto, a seguito ad un primo aumento del tasso proliferativo dovuto alla SAL, le cellule tumorali andavano incontro ad una destabilizzazione nella fase della deplezione di androgeni, e quindi del ligando in grado di innescare le pathway di sopravvivenza a valle del AR, dovuta alla ADT (Holroyd et al., 2018). Da un lato però questo portava all'accumulo di cellule tumorali in possesso di varianti di splicing di AR, dall'altro, di cellule PC che non esprimevano AR, quindi, in ogni caso, il risultato finale era quello di ottenere una massa tumorale in grado di progredire in modo AR indipendente nonostante la pressione di queste strategie terapeutiche.

E' importante sottolineare come ogni stadio di resistenza alla terapia, che trasforma un PC localizzato in un CRPC metastatico, rende il tumore via via più aggressivo grazie all'attivazione di meccanismi di resistenza adattativa innescati da pathway di sopravvivenza parallele a quella del AR. In letteratura è riportato che circa il

42% dei PC localizzari e il 100% dei PC in stadio avanzato, manifestano un'attivazione non fisiologica della via di segnale PI3K/AKT/mTOR (Toren et al., 2014).

Uno dei meccanismi più frequenti alla base di questa upregolazione della pathway, è la mutazione o delezione di PTEN. Studi in modelli murini mostrano come la "PTEN loss" rappresenti un importante genetic driver della trasformazione di un tessuto epiteliale prostatico sano in un PC aggressivo e invasivo (Sarker et al., 2009). Inoltre, risulta essere legato allo sviluppo di caratteristiche di insensibilità agli androgeni in CRPC, in quanto, la PTEN loss da un lato de-reprime l'attivazione di EGR1 e c-Jun, regolatori negativi dell'attività dell'AR, dall'altro, promuove l'attivazione di PI3K, favorendo così meccanismi di proliferazione cellulare svincolai però dagli androgeni.

### 1.5.2 La via di segnale PTEN-PI3K/AKT/mTOR e i primi inibitori di protein-chinasi nel cancro prostatico.

Per comprendere l'importanza del ruolo della pathway di PI3K nella cancerogenesi prostatica basta sfogliare la letteratura: una regolazione anomala della via è infatti documentata nel 40% dei casi di PC diagnosticato precocemente, e in oltre il 70% di PC avanzato (Malik et al., 2002). Circa il 30% dei tumori prostatici primari presentano delezione di PTEN, così come il 60% dei CRPC ed è considerata una caratteristica chiave nell'hormone- naïve PC (Evren et al., 2011). Inoltre, da un punto di vista clinico, è associata ad un Gleason score elevato. Il ruolo biologico dell'iperattivazione della pathway è in particolare quello dell'induzione della resistenza al trattamento di ablativo degli androgeni, della progressione verso uno stadio della malattia refrattaria agli ormoni e di un peggioramento generale della prognosi (Sutherland et al., 2014).

In linea con l'importanza di questa via nel cancro, dagli anni '90 sono state stato sviluppate un gran numero di small molecule inhibitors, in grado di agire sia su specifici attori della pathway, che su più di uno contemporaneamente, in base al range di concentrazione utilizzato. Agli inizi degli anni '90, le prime molecole ad essere state utilizzate come strumenti per lo studio e la decodifica della complessa attività di PI3K, sono state i suoi inibitori wortmannina e LY294002. La prima, si lega in modo covalente alla subunità catalitica p110, sito di legame dell'ATP, determinando un'inibizione irreversibile di PI3K. LY294002 invece, come la maggior parte degli altri inibitori, compete in modo reversibile con l'ATP per il legame alla subunità catalitica di PI3K. Sebbene entrambe le molecole siano state molto utili negli studi *in vitro*, la loro tossicità era troppo

alta per l'uso clinico. Sulla base della struttura di questi due composti e grazie alle strutture cristalline delle isoforme catalitiche p110, sono state generate molte piccole molecole altamente selettive, in grado di agire sia come pan-inhibitors, che come inibitori di due o di singole isoforme. Anch'esse competono con l'ATP per il legame al sito attivo, e presentano già un'attività nel range di concentrazione del nano molare, molti sono entrati in studi clinici legati al cancro. L'efficacia clinica dei pan-inhibitors è stata però modesta e correlata ad un'elevata tossicità, probabilmente proprio a causa della simultanea inibizione di tutte le isoforme. Studi sulla diversa localizzazione tissutale delle isoforme di p110 e sui fenotipi risultanti dalla loro alterazione genetica specifica, hanno suggerito che le varie isoforme hanno funzioni biologiche specifiche, guidando così la ricerca verso la sintesi di inibitori isoforma-specifici (Saranyutanon et al., 2019).

Allo stesso modo, negli ultimi decenni sono state sviluppate diverse generazioni di inibitori di mTOR e tutti sono stati ampiamente studiati sia a livello preclinico che clinico. Comprendono sia agonisti dell'ATP per il sito attivo, che inibitori allosterici. Il macrolide rapamicina, derivato dai batteri, è un inibitore allosterico che mostra selettività per mTORC1, sebbene possa inibire anche mTORC2 in caso di esposizione a lungo termine. La rapamicina e i suoi analoghi, i cosiddetti rapalog, RAD001/everolimus e CC1-779/temsirolimus, formano un complesso con FKBP12 che a sua volta lega mTORC1. La riduzione della fosforilazione dei substrati mTORC1, in particolare p70S6K e in misura minore 4EBP1, è utilizzato come readout dell'inibizione. I rapaloghi RAD001/everolimus e CC1-779/temsirolimus sono approvati dalla FDA e dall'EMA (Sasongko et al., 2016). Diversi inibitori ATP-competitive di mTOR che agiscono sia su mTORC1 che mTORC2, o di DNA-PK/mTOR, come vistusertib e sapanisertib, sono in sperimentazione clinica oncologica di fase II (Liao et al., 2013; Saranyutanon et al., 2019).

La maggior parte degli inibitori di AKT si legano al sito catalitico in cui fisiologicamente alloggia l'ATP. Tuttavia, esistono anche inibitori allosterici in grado di generare un ingombro sterico tale da impedire al dominio PH di AKT di legarsi al PIP3, impedendo così l'attivazione della chinasi. L'alchilfosfolipide perifosina, un analogo lipofilo della colina, che impedisce la traslocazione di AKT alla membrana plasmatica e la sua successiva fosforilazione, è stato il primo di questa classe di composti testati *in vitro* e *in vivo*. Sfortunatamente, nonostante i risultati promettenti degli studi preclinici, nessuno studio sulla perifosina in monoterapia ha dimostrato un'efficacia significativa in clinica per pazienti oncologici.

### 1.5.3 La terapia con inibitori di protein-chinasi diretta contro la via di PI3K/AKT e l'induzione di meccanismi di feedback

Vista la frequenza di alterazione dell'asse PI3K/AKT/mTOR in numerose tipologie di cancro, negli ultimi anni sono state sintetizzate molte small molecules che hanno come bersaglio diversi componenti chiave di questa via. Molte di esse sono state testate in trial clinici, principalmente per tumori solidi (Dienstmann et al., 2014). Pur partendo da risultati preclinici molto promettenti, tuttavia, nessuna di queste nuove molecole ha finora prodotto gli effetti sperati. A differenza degli inibitori delle tirosin-chinasi (TKIs), l'insuccesso non è attribuibile a resistenza per l'insorgenza di nuove mutazioni che consentono alla proteina bersaglio di aggirare l'azione dell'inibitore, ma a fenomeni di adattabilità delle cellule o all'esistenza di meccanismi di feedback. Questi ultimi da un lato sono responsabili dell'attivazione di pathway parallele con effetto analogo a quella bersagliata dall'inibitore, dall'altro, sempre in seguito al meccanismo appena citato, innescano mediatori della via di segnale a valle del punto di azione del farmaco. Molti studi clinici che impiegano molecole inibitrici della via PI3K/AKT/mTOR, falliscono a causa dell'incompleta inibizione degli attori della pathway, questo infatti riflette la grande ridondanza di questo meccanismo molecolare e i numerosi feedback loops, positivi/negativi, che esistono sia all'interno della cascata PI3K/AKT/mTOR, che tramite crosstalk con altri vie di segnalazione (Rodrik-Outmezguine et al., 2011; Rozengurt et al., 2014).

Un'altra applicazione interessante è anche quella di mettere a punto una terapia basata sulla combinazione di questi inibitori con farmaci antineoplastici tradizionali, potendo così ridurre il dosaggio di questi ultimi, limitando i loro effetti collaterali a livello sistemico (Steelman et al., 2011).

Le tre classi principali di inibitori basati sulla via di AKT testati su modelli preclinici e entrati successivamente in trial clinico sono gli inibitori allosterici, gli inibitori duali di PI3K/mTOR e gli ATP-competitive.

Uno primo esempio riguarda l'inibitore duale di PI3K/mTOR, ATP-competitive, BEZ235. Studi preclinici, da un lato, hanno evidenziato che la doppia inibizione di queste due chinasi nei topi PTEN-null a livello prostatico, è in grado di ridurre le dimensioni del tumore. Tuttavia, è emerso che BEZ235 è scarsamente tollerato nei pazienti con concomitante delezione di PTEN e resistenza alla castrazione (Cinar et al., 2007). Questo fallimento potrebbe essere spiegato sia in parte dagli effetti dell'inibizione sul bersaglio dell'inibitore, che a causa della sua azione su altre chinasi. Vale la pena ricordare che PI3K controlla infatti molte funzioni

cellulari, quindi una sua inibizione non tessuto-specfica, causa gravi effetti collaterali (Szmulewitz et al., 2009). Inoltre, come già sottolineato, nelle cellule tumorali, un'eccessiva inibizione di mTOR può ridurre la sua attività regolatoria fisiologica del feedback negativo, inducendo così l'attivazione di AKT e quindi limitando l'efficacia del farmaco (Wen et al., 2020).

La dissezione di questi feedback è perciò estremamente complessa: come già spiegato nei capitoli precedenti, nella via canonica, dopo l'attivazione da parte del recettore di membrana (RTK e GPCR), PI3K trasmette il segnale ai suoi effettori intracellulari a valle, in particolare ad AKT. L'intensità del segnale è controllata da circuiti di feedback positivi e negativi. In questo contesto, l'asse mTORC1-p70S6K-S6RP, downregola Irs-1 e, di conseguenza, attenua l'attività di PI3K. Tuttavia, l'inibizione prolungata di mTORC1, da parte dei rapalogs, o di AKT, genera un circuito di feedback inibitorio su Irs-1, e innesca la segnalazione PI3K tramite un effetto rebound (Braglia et al., 2020) (figura 1.7a). Inoltre, la fosforilazione di PRAS40 e TSC2 mediata da AKT, attiva sequenzialmente mTOR, che agisce da un lato su p70S6K-rpS6 per innescare la degradazione di Irs-1/2, e dall'altro, aumentando la stabilità di Grb10, molecola inibitrice di PI3K. Pertanto, l'attività della forma attiva di AKT inibisce sia l'espressione che la stabilità degli attivatori chiave di PI3K, mentre promuove la stabilizzazione di Grb10 (Manning & Toker, 2017). L'inibizione farmacologica di AKT perciò spezza questo fine meccanismo di regolazione negativa a monte, limitando di conseguenza l'efficacia del farmaco stesso (Bertachini et al., 2014). Non è da escludere che anche la pathway Ras/MAPK svolga un ruolo in questi meccanismi, vista la sua interazione con Irs-1 (Pruett et al., 2021). Inoltre, l'inibizione prolungata di AKT o mTORC2, da un lato inattiva fortemente AKT, ma dall'altro stabilizza FoxO1, (regolato negativamente da AKT in un contesto fisiologico), che a seguito di una sua traslocazione al nucleo e un accumulo nello stesso, favorisce la trascrizione e transattivazione di geni FoxO-dipendenti, come ERBB2/3, che codificano per i RTK (HER2/3) del epidermal growth factor (EGF) (Kim et al., 2001). Questi recettori attivati, inducono la fosforilazione di AKT sulla S473 mediante un effetto rebound, e di conseguenza la riattivazione della segnalazione a valle di PI3K, responsabile perciò dell'induzione della resistenza adattativa al farmaco (figura 1.7b). Inoltre, la trascrizione dipendente da FoxO è associata a p110 e co-inibizione di PDK1 (Zhang et al., 2005). Un altro meccanismo analogo a quello appeno descritto, coinvolge un altro effettore chiave di AKT: il fattore di trascrizione FoxO3a, la cui fosforilazione, come per l'isoforma 1, ne impedisce la traslocazione al

nucleo e la transattivazione di geni che codificano per altri attivatori fisiologici di PI3K, IR e IGF-1R (Teply et al., 2018) (figura 1.7b).

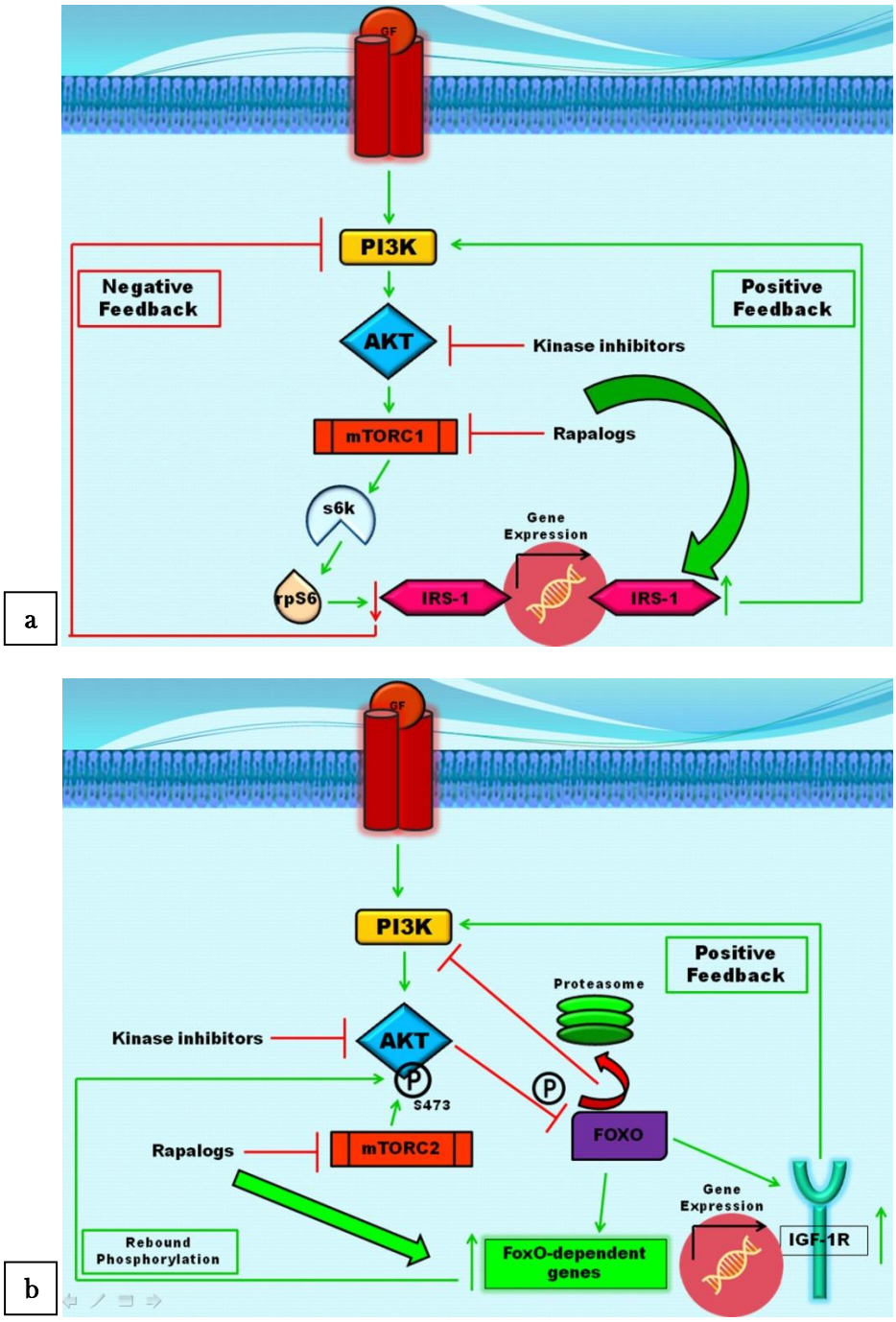



**Figura 1.7:** Meccanismi feedback che coinvolgono la via di PI3K. Pannello "a": rappresentazione schematica dei meccanismi di feedback che coinvolgono Irs-1 in seguito ad inibizione farmacologica di mTORC2, vedere il teso per i dettagli. Pannello "b": Rappresentazione schematica dei di feedback indotti da FoxO che, a seguito dell'inibizione farmacologica di AKT, non risente più della regolazione inibitoria di quest'ultimo che lo indirizzerebbe al proteasoma, permettendo così a questo fattore di trascrizione di regolare positivamente l'espressione di geni attivatori di PI3K, come IGF1-R. Immagini adattate da Braglia et al., 2020.

A causa dell'induzione dei meccanismi compensatori appena descritti, gli sforzi successivi della ricerca si sono concentrati sullo studio di combinazioni di farmaci progettate con lo scopo di bypassare la resistenza adattativa.

In particolare, nel carcinoma prostatico PTEN-null, in cui il targeting selettivo di PI3K  produce solo un'inibizione transitoria della segnalazione a valle, l'aggiunta alla terapia di inibitori dei RTK come IGF1R/IR, interrompe il circuito (Wen et al., 2020). Il perché è facilmente spiegato dal fatto che questi recettori attivino selettivamente l'isoforma  , che rappresenta l'isoforma dominante nel cancro alla prostata, e giustifica il perchè l'inibizione di PI3K / abbia mostrato un'efficacia maggiore della sola inibizione di PI3K . Sfortunatamente, questa associazione ha mostrato un'eccessiva tossicità sul bersaglio (Wen et al., 2020).

Oltre a PI3K, essendone il principale effettore, AKT rappresenta un promettente bersaglio anche nella terapia del cancro alla prostata. L'iperfosforilazione di AKT si correla positivamente con un elevato Gleason score e con un basso tasso di sopravvivenza dei pazienti con CRPC (Denmade et al., 2018). Non sorprende quindi che AKT sia diventato un importante candidato per la generazione di molecole con attività ATP-competitive o in grado di agire come inibitori allosterici. Da esperimenti eseguiti su linee cellulari è emerso che l'inibitore allosterico perifosina riesce ad abrogare la fosforilazione di AKT sul residuo S473, a rallentare la proliferazione e, contemporaneamente, a favorire il processo apoptotico. Tuttavia, questo farmaco è stato abbandonato durante uno studio di fase II a causa della modesta attività clinica se usato come monoterapia (Huang et al, 2018).

D'altra parte, un inibitore di AKT con attività ATP-competitive noto come AZD5363, ha mostrato avere una forte attività inibitoria della proliferazione e una grande capacità nell'indurre apoptosi non solo in linee cellulari, ma anche in un modello di xenotrapianto di LNCaP (Puca et al., 2019). In uno studio di fase I/II molto recente, AZD5363 combinato con enzalutamide (un inibitore del AR), nello stesso contesto clinico appena menzionato, ha mostrato una buona risposta e un'elevata sicurezza e tollerabilità (NCT02525068). Sorprendentemente, l'enzalutamide ha influenzato anche l'attività di AKT, come monitorato dalla fosforilazione dei suoi principali substrati GSK3  e PRAS40, indicando che l'inibizione combinata di AKT e AR può essere una nuova strategia terapeutica in pazienti affetti da CRPC caratterizzato da delezione di PTEN (Shiota et al., 2019). E' importante sottolineare che, sebbene ben tollerato, AZD5363 può interferire con il metabolismo del glucosio causando iperglicemia.

Un inibitore ATP-competitive di AKT, GDC-0980/ipatasertib, ha mostrato in un studio preclinico di poter abrogare l'attivazione della segnalazione a valle della pathway. Inoltre, questo composto ha mostrato un'inibizione dose-dipendente della crescita tumorale in modelli di xenotrapianto di PC con deficit di PTEN

(Puhr et al., 2018). È interessante notare è stato anche ben tollerato come monoterapia in uno studio clinico di fase I (Puhr et al., 2018). Sulla base di queste premesse, recentemente, uno studio di fase II internazionale multicentrico e randomizzato su abiraterone acetato (inibitore di uno degli enzimi chiave per la sintesi del testosterone), ha valutato l'efficacia dell'associazione di quest'ultimo con GDC-0068, in pazienti con PC metastatico con PTEN wild type, rispetto a quelli PTEN-null. I risultati di questo studio sono stati estremamente incoraggianti: è stata osservata un aumento della progression free servival nella coorte abiraterone + ipatasertib, rispetto a solo abiraterone, e tale parametro è risultato essere ulteriormente aumentato nella popolazione di pazienti portatori della delezione di PTEN. La combinazione, inoltre, è anche ben tollerata (De Bono et al., 2019). Su queste basi, è in corso uno studio randomizzato di fase III per valutare GDC-0068 insieme ad abiraterone e prednisone, in pazienti con CRPC che non precedentemente trattati (NCT03072238).

E' stato dimostrato che anche l'inibizione di mTORC1 è in grado di prevenire la stabilizzazione di mTORC1 della proteina Grb10, proteina adattatrice che, ricordiamo, regola negativamente la segnalazione RTK (Manning & Toker, 2017).

Inoltre, il substrato mTORC2, SGK1, può sostituire AKT in risposta all'inibizione di PI3K/AKT, portando all'attivazione di substrati condivisi con AKT che mediano processi cellulari prooncogenici, come alcuni cicli metabolici, la crescita, la sopravvivenza e la migrazione cellulare (Manning & Toker, 2017).

## 1.6 I microRNA

### 1.6.1 microRNA: biogenesi, regolazione e ruolo biologico

I microRNA (miR) sono una classe di piccoli RNA non codificanti (la loro lunghezza varia dai 18 ai 22 nucleotidi), trascritti dalla RNA polimerasi II. La loro funzione biologica consiste nell'appaiare la loro seed region (composta da 2-7 nucleotidi) con porzioni complementari del loro RNA bersaglio, spesso a livello di regioni regolatorie come il 3'UTR. Questo porta all'inibizione della trascrizione dell'mRNA bersaglio o, in alternativa, alla sua degradazione (Alberts et al., 2016).

I geni codificanti per i miR sono evolutivamente conservati, il 70% dei quali possono essere localizzati all'interno degli introni o esoni di geni codificanti proteine, il 30% invece, in aree intergeniche (Hata & Lieberman, 2015). La maggior parte dei miR esonici o intronici, sono orientati nello stesso senso del loro gene ospite, suggerendo che sono trascritti in parallelo con la loro trascrizione ospite. Il secondo gruppo di miR è trascritto da regioni intergeniche o deserti genetici comprendenti unità di trascrizione indipendenti (Hata & Lieberman, 2015). In figura 1.8, sono mostrati gli step principali della biogenesi dei miR, descritta qui di seguito. La polimerasi II genera trascritti lunghi diverse kilobasi (pri-miRNA), che sono successivamente processati nel nucleo dall'enzima Drosha, da questa prima digestione otterremo un precursore lungo 70 nt (pre-miRNA) (Ruvkun et al. 2001). Quest'ultimo viene esportato verso il citoplasma attraverso l'esportina 5, dove è legato al RNase Dicer, e al RNA-induced silencing complex (RISC) (Ruvkun et al. 2001). RISC è composto dalla proteina legante l'RNA sensibile alla transattivazione (TRBP) e Argonaute 2 (Ago2). Studi recenti suggeriscono che prima Ago2 esegue un taglio del pre-miRNA a livello di 12 nt dalla sua estremità 3' (formando miR precursore Ago2-clivato), e successivamente Dicer fende nuovamente questo precursore generando un miR duplex maturo da 22 nt (Alberts et al., 2016). Mentre la mature strand viene mantenuta all'interno di RISC, il passenger strand viene rimosso e degradato (Lee et al., 2004). A questo punto, il singolo filamento maturo di 22 nt che compone il miR, riconosce sequenze complementari nella regione 3' non tradotta del mRNA bersaglio, in particolare, è la seed region di 2-8 nt del miR a svolgere questa funzione di appaiamento. Il legame miR-mRNA guida così il complesso RISC (a sua volta legato al miR) e gli permette di reprimere l'espressione genica, inibendo la traduzione e favorendo la degradazione del messaggero (Lee et al., 2004). Durante la loro biogenesi, i miR sono soggetti ad un'intensa attività di trascrizione e regolazione post-trascrizionale, e la delucidazione di questi meccanismi ha migliorato la comprensione di quali possano essere gli step che ne causano una regolazione non fisiologica in contesti patologici.

Come descritto sopra, la deregolamentazione dei miR nel cancro potrebbe derivare in parte da fattori genomici come delezione, mutazione o amplificazione (Croce et al., 2008). Sono però noti anche meccanismi epigenetici che regolano l'espressione, soprattutto nel contesto di patologie neoplastiche (van Rooji et al., 2007).

Numerosi articoli descrivono la famiglia dei miR-34a, -b e –c, definendola come indotta direttamente da TP53 e suggerendo che alcuni degli effetti di TP53 potrebbero essere mediati attraverso l'attivazione trascrizionale

dei miR stessi (Croce et al., 2008, Alberts et al., 2016). Utilizzando diversi modelli, gli autori hanno confrontato l'espressione di miR in cellule con elevata o bassa espressione di TP53, scoprendo che l'espressione del miR-34 è maggiore in cellule che esprimono TP53 ad alti livelli. Esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina, hanno rivelato che TP53 si lega specificatamente ai promotori dei miR-34. Il ripristino dei livelli fisiologici del miR-34, sia nelle linee, che in cellule primarie, impatta su un programma genetico che se inibito, induce l'arresto del ciclo cellulare (Alberts et al., 2016).

Lavori recenti suggeriscono anche che c-Myc transattivi miR, in particolare il cluster miR-17-92 (Chang et al., 2007). Inoltre, regola negativamente la trascrizione di miR con attività tumor-suppressor, come quelli della famiglia let-7, quelli della famiglia del miR-29 (Chang et al., 2007). Analogamente al caso precedente, esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina hanno dimostrato che c-Myc si lega alle sequenze conservate del promotore del miR che reprime. Funzionalmente, la repressione dei miR indotta da c-Myc contribuisce alla linfomagenesi, poiché il ripristino dei miR silenziati diminuisce il potenziale tumorigenico delle cellule di linfoma (Chang et al., 2007). Nel loro insieme, i dati attuali suggeriscono che i miR svolgano un ruolo importante nelle vie mediate dagli oncogeni c-Myc, E2F e TP53, attraverso la regolazione coordinata di molteplici trascritti (He et al., 2007; Chang et al., 2007).

Un altro importante meccanismo epigenetico di regolazione del miR è il silenziamento dell'espressione mediante ipermetilazione del DNA promotore. Saito e colleghi, hanno documentato per la prima volta, sia in linee che in cellule primarie di cancro alla vescica, che il miR-127 è silenziato mediante l'ipermetilazione del promotore, ma che la sua espressione potrebbe essere ripristinata utilizzando agenti ipometilanti (Saito et al., 2005). Inoltre, gli autori hanno dimostrato che il miR bersaglia l'oncogene BCL-6, suggerendo che gli agenti ipometilanti possono quindi anche attivare l'espressione di miR (Saito et al., 2005). Altri gruppi hanno descritto diversi miR che in condizioni patologiche sono silenziati tramite metilazione, e che, quando viene meno questa condizione inibitoria, si comportano come tumor suppressor (Lujambio et al., 2007). I miR non solo sono regolati dalla metilazione del DNA, ma a loro volta, possono anche modulare la metilazione del DNA in cellule cancerose, attraverso l'interazione e inibizione del macchinario di metilazione del DNA (Garzon et al., 2009). È interessante notare che i miR-29 sono downregolati nei pazienti con cancro al polmone, è stata trovata una correlazione tra miR-29b e l'espressione della metil-transferasi DNMT3B,

suggerendo che la downregulatione del miR, possa contribuire all'aumento dei livelli di DNMT3 e, di conseguenza, all'ipermetilazione e silenziamento di geni tumor suppressor (Fabbri et al., 2007).

Benché si abbiano relativamente poche informazioni sulla loro regolazione a livello post-trascrizionale, l'idea prevalente finora era che i miR fossero i bersagli trascrizionali finali delle vie di segnalazione. La recente comparsa di nuovi studi che identificano questi meccanismi, aiuta a spiegare come il livello di un miR può cambiare rapidamente in risposta ad un segnale intracellulare e, di conseguenza, regolare prontamente l'effetto di un gene senza che vengano coinvolti eventi trascrizionali. Questo fornisce un esempio di meccanismo di come le cellule con un breve ciclo vitale, possano indurre cambiamenti transitori sul livello di espressione in proteina di certi geni. In questi processi, è perciò fondamentale che vi sia una stringente regolazione post-trascrizionale, così da modulare in modo ancora più fine e regolare la fluttuazione dei livelli di espressione dei miR e, di conseguenza, regolare il loro impatto sull'espressione proteica.

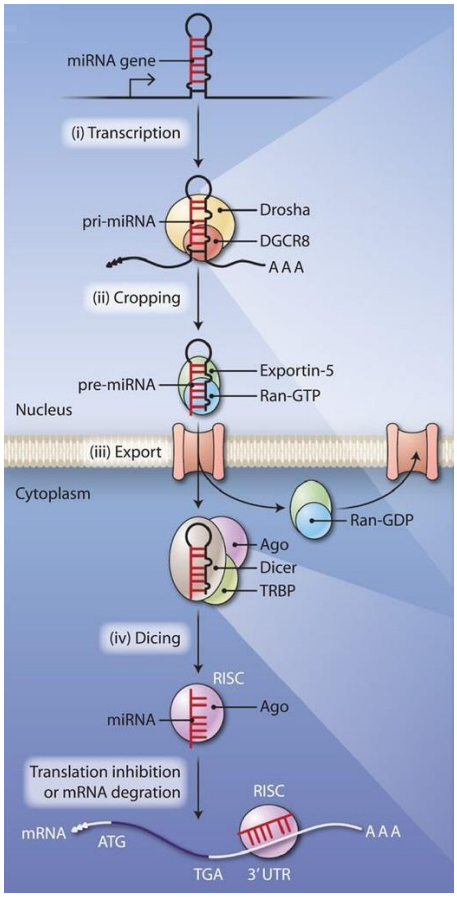



**Figura 1.8:** Biogenesi dei micro-RNA. I miR sono trascritti dalla RNA polimerasi II (pol II) in lunghi miRNA primari (pri-miR), che vengono riconosciuti e scissi nel nucleo dall'enzima Drosha. Si ottiene perciò un precursore a forcina chiamato pre-miR. Quest'ultimo viene esportato dal nucleo al citoplasma tramite l'esportina 5, dove è ulteriormente processato da un altro enzima, Dicer, che produce un duplex di 19-24 nt. Solo un filamento del duplex miR (miR maturo) è incorporato in un grande complesso proteico chiamato RISC. A questo punto, la presenza del mRNA bersaglio, induce il complesso RISC-miR a scindere il target, o ad indurne la repressione tradizionale, a seconda del grado di complementarietà tra il miR e il suo mRNA. Immagine adattata da Hata & Lieberman, Science, 2015.

### 1.6.2 miR e AKT: un esempio di regolazione bidirezionale

Sono stati pubblicati dati in letteratura che spiegano come AKT, e plausibilmente altre vie di segnalazione, possano anch'esse, in modo analogo ma anche in coadiuvazione con i miR da loro regolati, modulare in modo tempestivo la traduzione di un gene o eluderne il processo trascrizionale, nel caso in cui si necessaria una riduzione della sua trascrizione nell'ambito di eventi di segnalazione transitori (Sayed & Abdellatif, 2010).

Ecco un esempio di questo meccanismo: alcuni studi eseguiti su linee cellulari di cancro del colon (SW480) e di cancro al seno (MCF-7) mostrano come l'inibizione di AKT, ottenuta mediante somministrazione di

wortmannina o mediante la generazione di un mutante negativo dominante, inducono upregolazione di FasL (Fas Lingand) forkhead-indotta. Per contro, lo stesso gruppo ha dimostrato che miR-21 (la cui espressione è ridotta in caso di ipossia prolungata), ha come bersaglio diretto FasL. Di conseguenza, overesprimere miR-21 esogeno, porta ad inibizione della ipossia FasL-indotta. Questo ha portato alla dimostrazione che AKT regoli FasL tramite la modulazione dei livelli di miR-21 in linee cellulari. Inoltre, se si overesprimono prima FasL, e successivamente miR-21, si ottiene una downregolazione del primo con successivo distacco e rapida morte delle cellule in coltura.

Il miR-21 svolge un ruolo nel potenziamento della sopravvivenza cellulare, avendo fra i suoi bersagli una pletora di geni proapoptotici e oncosoppressori, come PTEN (Calin et al., 2005), la proteina di morte cellulare programmata-4 (Pdcd4) (Calin et al., 2005), l'isoforma TAp63 (della famiglia di p53), LRRFIP1 (un inibitore della segnalazione di NF  B) (Lee et al. 2003), e FasL (Lee et al. 2003).

Se consideriamo la pathway di AKT, PTEN è appunto inibito dal miR-21, mentre AKT è un inibitore dell'espressione del miR-21, formando così un doppio loop di feedback negativo e una sorta di meccanismo di autoregolazione interno a questi loop, frequente nella regolazione dei miR e dei loro bersagli, fra i quali, per il miR-21, spiccano ZEB1, let-7 e lin-28 (Diederichs et al., 2007). Inoltre, altri geni che regolano positivamente la via di AKT sono spesso soggetti alla regolazione da parte di miR, anche se i meccanismi non sono ancora del tutto compresi. Fra questi, PDK1 è bersagliato dal miR-375 nelle cellule di carcinoma gastrico, la subunità p85 di PI3K è bersagliata da miR-126 nel cancro del colon (Calin et al., 2005). Questi aspetti mostrano perciò che la pathway PI3K/AKT è finemente regolata ad ogni step, e che i miR coinvolti, possono essere impiegati in modo differente dai diversi tipi cellulari in specifiche condizioni fisiologiche o patologiche. Inoltre, studi recenti mostrano che in base alla "motivazione" che porta la cellula a dover regolare l'espressione di un determinato gene, può essere che la fluttuazione dei livelli del miR che lo bersaglia, e quindi il livello di inibizione del gene stesso, possa essere ottenuta regolando il miR sia a livello trascrizionale, che post-trascrizionale. Questo in base perciò alla rapidità in cui deve avvenire la modulazione dell'espressione genica in risposta ad uno stimolo, o al determinato contesto in cui la cellula si trova (Garzon et al., 2009).

### 1.6.3 Il ruolo dei miR nel cancro

I miR svolgono un ruolo importante nella regolazione dell'espressione di oltre il 60% dei geni dei mammiferi e, come spiegato negli esempi riportati nei paragrafi precedenti, nei processi coinvolti nella proliferazione, differenziamento e apoptosi cellulare. Va da sé che il mantenimento della regolazione fisiologica di questi miR, sia necessario per evitare di innescare i meccanismi alla base della progressione tumorale. In effetti, molti miR espressi in modo non canonico, sono coinvolti in processi come l'inizio, la progressione e la metastasi del cancro.

Il ruolo dei miR, in condizioni fisiologiche, è quello di tumor suppressor, infatti, diversi lavori mostrano una loro downregolazione nei tessuti tumorali piuttosto che in quelli sani (Garzon et al., 2009).

Sorprendentemente, circa la metà dei miR noti si trovano all'interno o vicino a siti fragili, regioni minime di perdita di eterozigosi, regioni minime di amplificazione, o breakpoints comunemente associati a patologie neoplastiche (Calin et al., 2005). Ad esempio, il cluster di miR-17-92 si trova nel locus 13q31, una regione frequentemente amplificata nei linfomi (Ota et al., 2004), i miR-143 e miR-145 si trovano invece a livello di 5q33, che è frequentemente deleto nelle sindromi mielodisplastiche (Calin et al., 2005), un ultimo esempio è il riarrangiamento del miR-125b-1, giustapposto al locus della catena pesante delle immunoglobuline, descritto in un paziente con leucemia linfoblastica acuta a cellule B (Sonoki et al., 2005). Visto la loro funzione e l'amplia pletora di fenomeni in cui sono coinvolti, l'interesse per questi piccoli mRNA regolatori è perciò cresciuto nel tempo. Sfogliando la letteratura, è possibile trovare numerosi studi che negli hanno contribuito ad un'analisi sistematica dell'espressione di diversi miR in campioni di cancro, e nei loro corrispondenti tessuti normali (Volinia et al., 2006). Questo ha portato alla identificazione di "firme" di miR, che caratterizzano e distinguono cellule di tumori soldi ed ematologici, dai loro corrispettivi tessuti sani, ma non solo, a volte sono anche associate ad una particolare prognosi, alla possibile predizione di una più o meno rapida progressione della patologia, o ad un particolare stadio o sottogruppo di tumore (Iorio et al., 2005).

Ad esempio, i miR trovano applicazione nel tentativo di risolvere un problema molto attuale, come la diagnosi precoce del cancro. Questo perché a causa dell'attuale mancanza di metodi di diagnosi precoce e screening per molti tipi di neoplasie, i miR, possono giocare un ruolo interessante nella scoperta di biomarcatori.

Accanto alle loro funzioni intracellulari, i miR sono stati rilevati come molecole circolanti in molti fluidi bio-organici (urina, sangue, saliva ecc.).

Indagini attuali suggeriscono che i miR non sono solo molecole circolanti passivamente come sottoprodotti, ma possono agire anche come mediatori della comunicazione intercellulare attraverso il trasporto mediato dall'esosoma in modo analogo agli ormoni, imitando così la via endocrina (Chang et al., 2007). Sono proprio queste caratteristiche a rendere i miR eccellenti biomarcatori, unito al fatto che presentano una elevata stabilità chimica se studiati in preparati tissutali o di fluidi corporei a fresco o anche fissati in formalina, quindi il loro potenziale diagnostico è senza dubbio migliore rispetto ai long-non-coding RNA.

Nel caso del PC, potrebbe essere utile identificare un pannello di miR testabili nel siero o nei tessuti al fine di discriminare i pazienti con un PC locale, da quelli già ad uno stadio più avanzato, così da definire fin da subito il tipo di terapia da somministrare, o per stratificare i pazienti sulla base del rischio di metastasi o di recidiva (Schetter et al., 2008).

Lo studio del profilo dei miR nel siero è davvero un approccio interessante, perché può essere effettuato in modo non invasivo, e permette di stabilire un pannello diagnostico di miR sierici che probabilmente permetterebbe a diversi pazienti di evitare altre tecniche invasive come la biopsia prostatica. Uno studio pubblicato, per esempio, ha cercato di identificare una sorta di finger-print di espressione dei miR circolanti nel siero di pazienti affetti da PC localizzato e metastatico. Da questo lavoro è emerso che i miR che risultano essere espressi in modo anomalo, e che quindi potrebbero diventare potenziali biomarcatori diagnostici, sono i miR-141, miR-375 e miR-378 (Song et al., 2014). Tuttavia, ad oggi, nonostante parte dei meccanismi di azione di diversi miR siano stati in parte elucidati, per tanti altri non vi sono indicazioni univoche rispetto al loro ruolo nel PC e nel cancro in generale, saranno perciò necessari altri studi per arrivare a definire un chiaro profilo dei miR nei pazienti oncologici.

### 1.6.4 I miR come oncosoppressori

Come un gene codificante per proteine, un miR, può agire come tumor suppressor quando la sua perdita di funzione può avviare o contribuire alla trasformazione maligna di una cellula normale. Questo potrebbe avvenire mediante diversi meccanismi, tra cui delezione, mutazione, silenziamento epigenetico e/o alterazione

nelle fasi di biogenesi (Calin et al., 2005). Di seguito, essendo nota la natura oncosoppressoria di diversi miR, saranno passate in rassegna alcune famiglie, così da elucidare alcuni meccanismi e gli oncogeni più frequentemente targettati, per spiegare così come avviene questa loro essenziale funzione regolatoria.

Un primo esempio riguarda l'anomalia cromosomica osservata più frequentemente nella leucemia linfatica cronica (CLL), ovvero la delezione emizigote e/o omozigote della regione 13q14.3, che si verifica in oltre il 50% dei casi ed è associato ad una malattia con decorso per lo più indolente (Bullrich et al., 2001). Questa regione è ora nota per mappare miR-15a e miR-16-1, è stato scoperto nella regione 13q14.2, mappando alla regione cancellata di 30 kb tra gli esoni 2 e 5 del gene LEU2 (Calin et al., 2002). In un sottoinsieme di CLL, si osserva che il cluster miR-15a/16-1 è spesso deleto o downregolato, se paragonato a quello che accade a livello molecolare in normali linfociti CD5+, ottenuti da sani donatori.

Il ruolo di onco-soppressore è stato affibbiato a questo cluster dalla scoperta che il gene anti-apoptotico BCL-2, frequentemente overespresso in CLL, è un suo bersaglio (Cimmino et al., 2006).

Pertanto, mutazioni o delezione genica di miR-15a/miR-16-1, può favorire un'espressione non regolata della proteina BCL-2 in un sottogruppo di pazienti con CLL. A favore di questa ipotesi, per contro, l'induzione di una overespressione dei miR-15a/miR-16-1, correla con una riduzione dell'espressione di BCL-2 nei pazienti con CLL (Cimmino et al., 2006).

Inoltre, l'espressione ectopica di miR-16-1, regola negativamente la crescita e la progressione del ciclo cellulare, induce inoltre apoptosi in diverse linee cellulari tumorali umane (Cimmino et al., 2006) e in modello di xenotrapianto (Calin et al., 2008).

Allo stesso modo, la famiglia dei miR let-7 è downregolata in molti tumori solidi (Johson et al., 2005). Molti dei membri, si trovano in fragili aree genomiche, spesso perciò ricche di mutazioni in pazienti affetti da cancro al polmone, seno e cervice uterina (Calin et al., 2004). Questa famiglia è nota per inibire funzionalmente gli mRNA dei principali oncogeni caratterizzati, come la famiglia Ras, HMGA2 e c-Myc (Akao et al., 2006; Sampson et al., 2007), e inducono l'apoptosi e l'arresto del ciclo cellulare se overespressi in linee cellulari di diverse neoplasia solide ed ematologiche (Sampson et al., 2007). Un ultimo esempio di attività da tumor suppressor è data da studi di overespressione del miR-29b, in grado di indurre apoptosi nelle linee cellulari di colangiocarcinoma e di cancro al polmone, e di ridurre inoltre la tumorigenicità in un modello di xenotrapianto di cancro del polmone (Mott et al., 2007). Questi importanti effetti antitumorali, possono essere

spiegati in parte dal targeting diretto a carico della proteina antiapoptotica MCL-1 e dell'oncogene TCL-1, da parte dei membri della famiglia del miR-29 (Mott et al., 2007).

È interessante notare che la maggior parte dei miR con un chiaro ruolo oncosoppressorio (come quelli citati in precedenza: miR-15-a/16-1, miR-29 e let-7) hanno più di una locazione genomica, e sebbene la forma dei precursori una volta trascritti sia differente, il miR, una volta maturo, è identico. L'espressione nei diversi loci potrebbe essere regolata in modo differente; per esempio, nelle linee HeLa, il miR-29b maturo viene trascritto preferenzialmente dal locus codificante per miR-29b-1/miR-29a localizzato sul cromosoma 7q32, mentre contemporaneamente, l'altro locus miR-29b-2/miR-29c, sul cromosoma 1q23, viene silenziato (Hwang et al., 2007). La presenza di più copie sul genoma, potrebbe essere un meccanismo conservato durante l'evoluzione per preservare la funzione di un importante miR nel caso in cui un suo allele venisse cancellato o silenziato.

### 1.6.5 I miR nel cancro prostatico

Come già definito in precedenza, è noto dalla letteratura che i miR giochino un ruolo fondamentale nella regolazione di numerosi processi alla base del PC, dall'invasione, alla proliferazione non fisiologica delle cellule cancerose. In questo paragrafo passeremo perciò in rassegna i principali miR di cui è stata identificata una funzione biologica all'interno del PC (figura 1.9).

Dalla letteratura è noto che uno degli onco-miR più comunemente overespressi in diverse patologie oncologiche è il miR-21. Molti dei suoi target sono correlati alla proliferazione microvascolare e all'invasività tumorale. La sua espressione è correlata con una frequente recidiva biochimica, e ha valore predittivo per in particolare per pazienti con PC dopo prostatectomia radicale (Li et al., 2012). La sua espressione è correlata con la resistenza alla castrazione e alla tendenza alla metastatizzazione, e aumenta in concomitanza con parametri sfavorevoli come un elevato Gleason score e/o la presenza di metastasi linfonodali. Pertanto, miR-21 è anche utile come biomarcatore per prevedere progressione del cancro (Cannistraci et al., 2014). Diversi studi di letteratura hanno mostrato che i miR-221/miR-222 sono aumentati nel PC e che potrebbero ad un aumento della proteina associata alla chinasi della fase S 2 (Skp2), della cicline A e D1, downregolando invece p27Kip1. Il risultato è quindi che l'attività di questi miR porta alla progressione del ciclo cellulare dalla fase $G_1$ a S, ad una maggiore clonogenicità *in vitro*, e ad una potenziata tumorigenicità *in vivo* (Mercatelli et al., 2008).

Un altro degno di nota è senza dubbio il miR-141, la cui funzione nel PC non è ancora del tutto chiara, ma è stata documentata la sua overepressione a seguito della castrazione, quindi è probabile che vi sia un coinvolgimento di meccanismi androgeno-dipendenti, e nei CRPC metastatici, per questo motivo, il ruolo del miR-141 nel cancro, sembra interessarne la progressione (Zhang et al., 2013). Tuttavia, da dosaggi dei miR circolanti in fluidi corporei, in particolare nel siero, è emerso che i livelli di miR-141 fossero più alti in pazienti con PCa (Mitchell et al., 2008). In questo contesto, potrebbe essere considerato uno strumento importante per la diagnosi e la prognosi del PC.

Un altro degno di interesse è il miR-18a, la cui overespressione è legata alla progressione del PC. Anch'esso è fortemente overespresso in cellule PC e, in particolare, la sua espressione è molto maggiore nel sangue periferico di pazienti con PC rispetto a quelli con IPB e individui sani (Al-Kafaji et al., 2016), rendendo quindi questo miR un possibile biomarcatore per distingue la patologia neoplastica dalla condizione benigna (Al-Kafaji et al., 2016).

La nostra rassegna prosegue con il miR-4534, la cui espressione, che risulta essere maggiore nei pazienti PC, correla positivamente un aumento dei livelli di PSA e con una minor sopravvivenza libera da recidiva. È ipermetilato nelle cellule e nei tessuti normali ma non nel PC, ed esercita i suoi effetti oncogeni in parte inibendo l'attività di PTEN (Nip et al, 2016). La sua overespressione in linee cellulari non tumorali, induce caratteristiche pro-cancerose, mentre il suo silenziamento, compromette la proliferazione, migrazione, invasione cellulare e induce apoptosi e il blocco del ciclo cellulare in $G_0/G_1$ nel PC (Li et al., 2012).

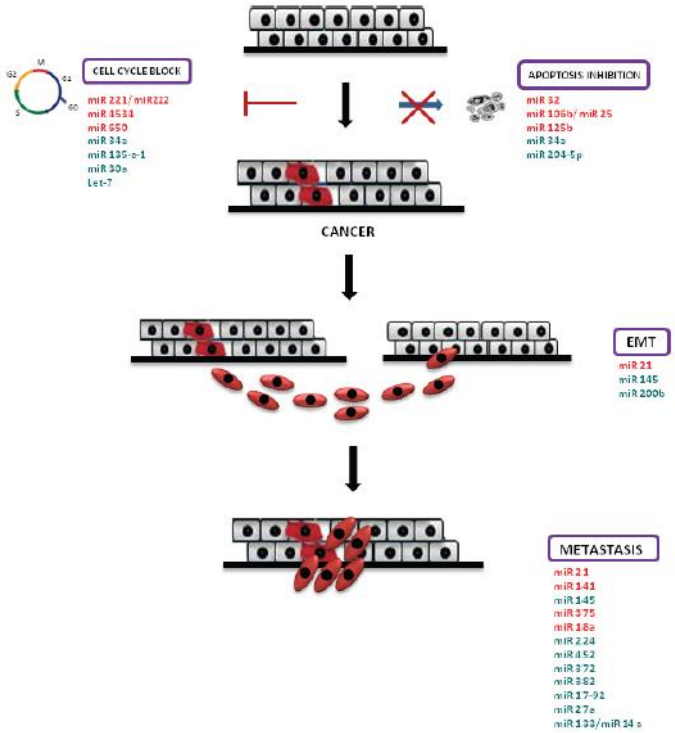



**Figura 1.9:** Rappresentazione schematica della patogenesi del cancro alla prostata e dei principali miR coinvolti nei processi che la caratterizzano. Il blocco del ciclo cellulare e la resistenza all'apoptosi sono responsabili della trasformazione tumorale. Successivamente, le cellule cancerose vanno incontro alla transizione epitelio-mesenchima (EMT), che conferisce loro una maggior capacità migratoria ed invasiva, necessaria per l'evoluzione a PC metastatico. I miRNA overespressi sono evidenziati in rosso, i miRNA downregolati, invece, sono evidenziati in verde. Immagine adattata da Venacore et al., 2017.

Un altro che esercita l'attività di onco-miR se la sua espressione supera i livelli fisiologici è il miR-650. Quest'ultimo ha come target CSRP1, una proteina espressa in situazioni di stress cellulare. È stato dimostrato che l'inibizione del miR-650, upregola CSR1, il quale inibisce la formazione di colonie e blocca il ciclo cellulare in fase S nelle linee prostatiche DU145 e PC3 (Zuo et al., 2015).

Il miR-32 è altamente espresso in campioni di CRPC rispetto a quelli di IPB. Uno studio ha dimostrato che quest'ultimo esercita caratteristiche oncogene attraverso la sua attività inibitoria sui seguenti target: il B-cell traslocation gene 2 (BTG-2), e la phospoinositide-3-kinase interacting protein 1 (PIK3IP1), che controlla l'inibizione di PI3K, rendendo quest'ultima in grado di svolgere la sua attività pro-survival (Jalava et al. 2012).

Il cluster miR-106b/miR-25 è composto da due onco-miR, identificato per la prima volta da analisi *in silico*. E' associato alla progressione del PC in quanto fra i suoi target, spicca la caspasi-7, la cui espressione è inibita sia nel carcinoma prostatico primitivo, che nelle lesioni metastatiche (Walter et al., 2013).

La nostra rassegna termina con il miR-125b, indotto dall'attività del recettore degli androgeni. La sua induzione in linee LNCaP, inibisce l'apoptosi e favorisce la proliferazione cellulare. È stato dimostrato che miR-125b attiva il network di p53, bloccando la degradazione di MDM2 tramite il targeting di $p14^{ARF}$, normalmente deputato al sequestro di Mdm2 (Amir et al., 2013).

### 1.6.6 Il ruolo dei miR nel EMT

Dalla rassegna dello scorso paragrafo si evince perciò che i meccanismi che determinano l'aggressività e l'invasività del tumore coinvolgono una pletora di mediatori e regolatori di meccanismi di trasduzione del segnale, ma che anche il crosstalk fra le diverse vie gioca un ruolo fondamentale. Un aspetto decisivo nel guidare la patologia neoplastica verso un fenotipo metastatico è sicuramente il fenomeno dell'EMT. Come è noto dalla letteratura, i geni Snail, Twist e Slug, fattori trascrizionali deputati alla regolazione, fra le altre, di molecole di adesione come le E-caderine (Martin et al., 2015; Xu et al., 2021), se espressi in modo non fisiologico, rappresentano uno degli inneschi del processo EMT. A sottolineare quanto appena detto, è però il crosstalk di questi tre fattori con altre pathway, e in particolare quella di PI3K/AKT, a completare la regolazione del fenomeno (Larue et al., 2007; Wei et al., 2020). Twist1 è uno dei principali promotori dei

processi alla base dell'EMT e favorisce il mantenimento in uno stato indifferenziato le cellule di PC, fornendo un ponte di connessione fra le cellule staminali del cancro (CSC) e l'EMT (Nam et al., 2015).

Inoltre, l'attivazione anomala della segnalazione PI3K/AKT/mTOR, contemporaneamente contribuisce all'induzione dell'EMT e al mantenimento del fenotipo delle CSC, popolazione cellulare nota per essere una delle principali responsabili della radioresistenza (Chang et al., 2013). All'interno dei meccanismi di crosstalk prima citati, svolgono un ruolo determinante anche i miR. Ad esempio, le cellule staminali/progenitrici, così come il processo metastatico, sono inibiti dal miR-34 attraverso la repressione diretta del CD44. Quest'ultima è una delle principali molecole di adesione della matrice extracellulare, marker che caratterizza le CSC prostatiche, e svolge un ruolo importante nell'induzione dell'EMT e nel mantenimento del fenotipo mesenchimale in PC (Liu et al., 2011).

In questo ambito, è stata documentata un'espressione anormale anche di N-caderina, cruciale non solo nella metastatizzazione, ma anche nei meccanismi di resistenza alla castrazione (Murali et al., 2012). La upregolazione di N-caderina e la simultanea downregolazione di E-caderina, sono state trovate in diverse linee cellulari di PC con caratteristiche di invasività e in tumori primari metastatici (Murali et al., 2012). In numerosi tumori solidi, la upregolazione della N-caderina è dovuta alla sua mancata regolazione da parte di miR che in un contesto fisiologico svolgerebbero un ruolo da tumor-suppressor, ma che risultano downregolati in contesti neoplastici (Gao et al., 2013).

In parallelo alla via di AKT, anche l'attivazione aberrante di quella di Wnt/ -catenina correla con le caratteristiche dell'EMT e influenza positivamente i processi di proliferazione e invasività nel PC (Jiang et al., 2007). Anche in questo caso i miR svolgono un ruolo determinante nella regolazione del processo: ad esempio il miR-320, può inibire l'espressione della -catenina e reprimere il mantenimento dello stato indifferenziato delle CSC CD44+ tramite l'inibizione della via di Wnt (Hsieh et al., 2013). Viceversa, alcune caratteristiche delle CSC come la formazione di sfere tumorali, la tumorigenicità o la chemio resistenza, sono potenziate in modelli di downregolazione del miR-320 (Hsieh et al., 2013).

Nei topi null NOD/SCID IL2RY -/-, Erismodegib, un inibitore della via di Sonic hedgehog, contrasta l'EMT e i meccanismi di crescita delle CSC mediante l'upregolazione del miR-200, che ha come bersaglio Snail, Slug, Zeb1 e Bmi-1. Quest'ultimo è un fattore trascrizionale che regola la capacità di self-renewal delle CSC prostatiche, attraverso l'induzione di un altro miR, il 128 (Nanta et al., 2013).

Terminiamo questa rassegna con un ultimo esempio, il gene let-7, che codifica per una famiglia di miR altamente conservata, già discussa nei paragrafi precedenti. Torniamo a citarla in quanto oltre ad essere significativamente ridotta nel cancro alla prostata localizzato, ha dimostrato di colpire gli oncogeni implicati nella progressione del ciclo cellulare (su tutti Ras e c-Myc), nella migrazione, nella differenziazione e nella progressione della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) (Kojima et al, 2017).

E' chiaro perciò che i miR svolgono un ruolo centrale nella regolazione del EMT, dei processi di migrazione e invasione cellulare, e delle proprietà delle CSC. Possono perciò rappresentare il punto in cui convergono questi fenomeni e la farmacoresistenza.

### 1.6.7 Il ruolo dei miR nella farmacoresistenza del cancro

I miR, visto il loro ruolo di regolatori di vie di segnale e, di conseguenza, del loro crosstalk, svolgono un ruolo determinante anche all'interno dei circuiti di feedback tipici dei meccanismi alla base della farmacoresistenza. In questo paragrafo passeremo in rassegno alcuni esempi che mostrano come i miR possano essere coinvolti nella resistenza delle cellule neoplastiche ad alcune terapie farmacologiche. Il primo esempio è il miR-31, che regola l'espressione genica di enzimi di riparazione del DNA nell'adenocarcinoma esofageo (Nagel et al., 2008). Sembra che la perdita di miR-31 possa promuovere la resistenza alla chemioterapia tramite alterazioni dei meccanismi di riparazione del DNA. Sorprendentemente, dopo il ripristino dell'espressione di miR-31, è stata apprezzata una maggiore resistenza al cisplatino, così come in cellule che esprimono naturalmente alti livelli di miR-31, come la linea leucemica pediatrica P31. In queste ultime è stato determinato un contenuto di platino significativamente ridotto all'interno della regione intranucleare, ed è stato determinato che l'induzione del danno al DNA è comunque inferiore anche alla reintroduzione di miR-31. Infine, OCT1, un potenziale regolatore negativo della trascrizione di miR-31, capace di legarlo nella regione 3′ UTR (Kim et al., 2011), può promuovere la overepressione del trasporto del farmaco via carrier lisosomiale (ABCB9), implicando il sequestro del cisplatino nei compartimenti intracellulari, impedendogli di accedere al compartimento nucleare e perciò di mediare i suoi effetti citotossici primari (Zhang et al., 2014). Questo meccanismo può essere utilizzato per eludere il danno al DNA, promuovendo la resistenza cellulare ai chemioterapici contenenti platino.

Esperimenti di frazionamento dei componenti cellulari hanno permesso di elucidare come diverse cellule resistenti al cisplatino, fossero anche in grado di sopravvivere con elevate concentrazioni di farmaco intracitoplasmatico. In primis è stato osservato un cambiamento nell'accumulo lisosomiale: questo ha promosso l'indagine sui possibili trasportatori di farmaci legati ai lisosomi e sul fatto che le cellule esprimenti miR-31 avessero un elevato numero di lisosomi. Altri gruppi di ricerca hanno mostrato come la sostituzione del miR-205 nelle cellule di PC downregoli la funzionalità dei lisosomi e il traffico delle proteine, portando ad alterazioni nel flusso autofagico delle cellule, modificando così le loro capacità disintossicanti con cui le diventerebbero resistenti al cisplatino (Petrocca et al., 2008). Drayton e colleghi, hanno invece trovato una relazione alla ridotta espressione di miR-27a con l'attività scambiatore di cisteina e glutammato SLC7A11: le linee cellulari di cancro alla vescica resistenti al cisplatino sono state resensibilizzate inducendo l'espressione del miR-27a o riducendo l'attività di SLC7A11 tramite siRNA, il che supporta i risultati secondo cui i miR possano regolare i trasportatori cellulari, connotando così la regolazione della chemioresistenza cellulare (Drayton et al., 2014). Un altro esempio riguarda il miR-93: è stato overespresso in linee cellulari già resistenti al cisplatino. Si è visto che quest'ultimo contribuisce ai meccanismi di sopravvivenza cellulare attraverso la soppressione dell'espressione di PTEN.

L'evidenza *in vitro* di firme di miR specifiche associate alla sensibilità ai farmaci nelle linee cellulari tumorali, rafforza la base razionale per studiare queste piccole molecole nel trattamento personalizzato del cancro.

Il ruolo dei miR nella risposta alla terapia ormonale ha portato a risultati interessanti. I miR-221 e miR-222 sono emersi come indicatori predittivi di resistenza alle strategie di inibizione degli antiestrogeni nel cancro al seno. E' stata infatti evidenziata una firma specifica di miR, con uno specifico pattern di espressione, in linee cellulari resistenti al tamoxifene (Zhang et al., 2014). In particolare, miR-221 e miR-222 sono tra i miRNA overespressi in cellule positive al recettore degli estrogeni (ER-a), rispetto alle cellule ER-a negative. La loro espressione ectopica nelle cellule responsive agli ormoni, ha indotto una downregolazione di ER-a e una resistenza al tamoxifene (Thang et al., 2015). Più recentemente, l'overespressione dei miR-221 e miR-222 è stata collegata alla resistenza delle linee cellulari di cancro al seno al fulvestrant, un altro antagonista di ER (De Robertis et al., 2018), sottolineando l'impatto di questi miRNA sulla sensibilità delle cellule al trattamento antiestrogenico. Il miR-221 gioca però un ruolo fondamentale anche nel cancro del colon-retto, dove è spesso espresso in modo non fisiologico e correlato ad una prognosi sfavorevole (Sun et al., 2011). Fra i suoi bersagli

spiccano gli oncosoppressori p27, p57 e PTEN, la sua attività promuove perciò la progressione del ciclo cellulare e la resistenza ai farmaci (Sun et al., 2011).

Gli ultimi due esempi di farmacoresistenza in tumori solidi, riguardano il miR-451, regolatore negativo della via di Wnt, spesso downregolato in cellule di cancro del colon-retto. L'inibizione di questo miR è collegata ai casi di resistenza di questo tipo di tumore ad uno dei farmaci più frequentemente utilizzati nella pratica clinica: l'irinotecano, questo a causa di una conseguente mancata regolazione fisiologica del carrier dei farmaci ABCB1 (De Robertis et al., 2018).

Infine, il miR-328, che ha fra i suoi bersagli le metallo proteinasi della matrice e il trasportatore ABCG2, se overespresso in modelli cellulari di cancro al colon (come le linee SW116 e SW480), è in grado di indurre modifiche significative nella sensibilità ai farmaci in questi ultimi (De Robertis et al., 2018).

### 1.6.8 miR-145-5p: ruolo nelle patologie neoplasiche, nella via di AKT e nella farmacoresistenza

Come descritto nei precedenti paragrafi, vista la loro attività su mediatori di svariate vie di segnale, i miR che hanno un ruolo nel cancro sono molteplici. Oltre a quelli già descritti, un altro degno di nota per il suo importante ruolo fisiologico da tumor-suppressor è il miR-145, localizzato nella regione cromosomica 5p32. Risulta essere downregolato in vari tipi di cancro, sia solidi (in particolare in quello al polmone, all'intestino e in quello prostatico) che ematologici (Das et al., 2015; Ozen et al., 2008; Mohit et al., 2010). Questo ruolo viene in parte svolto mediante l'inibizione di geni noti per avere un ruolo nella progressione tumorale (Mohit et al., 2010).

L'espressione di miR-145 è regolata in particolare dai fattori trascrizionali FoxO, C/EBP- , breast cancer gene-1 (BRCA1), e Ras-responsive element-binding Protein (RREB1) (Poli et al., 2020; Mohit et al., 2012). Ma, a sua volta, condivide con miR-143 (trascritto in cluster con il 145 in diversi tessuti) i target di proliferazione Ras e il fattore di trascrizione appena citato, RREB1 (Kent et al., 2010). E' interessante notare come fattori associati in letteratura ad un ruolo di repressori dell'espressione dei miR, come ADAM17, NEDD9, SOX2, siano essi stessi target del miR-145, creando così dei meccanismi di autoregolazione a feedback (Das et al., 2015).

Questo miR è però soprattutto un bersaglio a valle di p53, in grado di favorirne la trascrizione e, attraverso la formazione di un complesso con p68 e Drosha, di facilitare la trascrizione (Takaoka et al., 2012). Ciò consente di consolidare il ruolo che p53 e il miR-145 hanno sui bersagli comuni, infatti entrambi inducono una downregolazione della proteina c-Myc, che non sarà quindi in grado di esercitare la sua azione inibitoria sulla proteina p21, rafforzando così il ruolo proattivo di p53 su quest'ultimo (Mohit et al., 2009). Inoltre, svolge un'attività inibitoria su importanti geni a valle coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, come la ciclina D1, l'eIF4E e Cdk6 (Ho et al., 2005). Questa attività induce un arresto del ciclo in $G_0$ / $G_1$ e una riduzione della fase S. Infatti, l'attività biologica di miR-145 è legata ad un'inibizione della crescita e all'induzione di vie proapoptotiche (Mohit et al., 2010).

Esperimenti di miR-145 KO in cellule in cui p53 è attivo, mostrano che si verificano solo interferenze con il suo ruolo legato all'arresto del ciclo cellulare, ma non vengono alterate altre funzioni p53-dipendenti. Inoltre, a conferma del discorso fatto poc'anzi, nei tumori p53-null si verifica sia una riduzione dell'espressione del miR-145 che dell'efficienza dell'apparato proapototico ad esso correlato (Mohit et al., 2009).

Come descritto in precedenza, è in grado di regolare l'attività della pathway PI3K/AKT/mTOR. Infatti, sempre a supporto della sua attività fisiologica antiproliferativa, è stato dimostrato che questo miR inibisce AKT, rendendo così la cellula più sensibile ai trattamenti chemioterapici. Contestualmente, è anche in grado di inibire l'attività di PI3K su MEK ed ERK (Sha et al., 2017).

E' anche vero che esiste una regolazione inversa, ovvero AKT, a sua volta, è in grado di regolare l'espressione del miR (Mohit et al., 2010).

A conferma del suo ruolo fisiologico di oncosoppressore, in diversi tumori solidi, compreso quello prostatico, è frequente osservare un silenziamento epigenetico mediane metilazione delle CpG Island presenti nel suo promotore (Xia et al., 2015). E, sempre nei tumori solidi, meccanismi legati al recettore per ormoni spesso upregolati come ER-a, reprimono il miR-145 (Das et al., 2015).

Uno studio recente ha dimostrato che il miR-145 svolge un ruolo fondamentale nell'inibire la migrazione, l'invasione, la staminalità e le proprietà EMT delle cellule tumorali della prostata attraverso la modulazione di diversi bersagli (Ren et al., 2014). Fra questi, uno dei bersagli diretti è la N-caderina, e la sua downregolazione promuove l'invasione e la conseguente metastatizzazione del tumore (Gao et al., 2013). Inoltre, la N-caderina promuove le caratteristiche di staminalità delle cellule tumorali della prostata e l'EMT, è stato perciò proposto

un ruolo per la N-caderina nella mediazione della funzione del miR-145 nella regolazione di questi eventi (Ren et al., 2013).

Quest'ultimo è anche coinvolto in un altro aspetto fondamentale che caratterizza le patologie neoplastiche avanzate, ovvero la farmacoresistenza (figura 1.10). Questo è confermato da diversi studi, perciò il miR-145 è un possibile candidato biomarcatore per la detection di neoplasie farmacoresistenti al momento della diagnosi. Una sua modulazione non fisiologica, è fra le protagoniste della regolazione di diversi meccanismi come la resistenza multifarmaco (MDR), il mantenimento della staminalità o comunque di una condizione indifferenziata delle cellule staminali del cancro (CSC), l'inibizione della morte cellulare, alterazioni nella riparazione del DNA (Tang et al., 2020). Un meccanismo degno di nota è sicuramente la MDR, responsabile dell'efflusso di farmaci dalla cellula e mediato in particolare dai trasportatori ATP-binding cassette (ABC), una famiglia composta da 49 membri, della quale solo 3 sono stati studiati in modo approfondito per la connessione con la MDR, ovvero: (i) membro della sottofamiglia B ABC 1 (ABCB1), noto anche come proteina di resistenza multifarmaco 1 (MDR1) o P-glicoproteina (P-gp); (ii) membro della sottofamiglia C ABC 1 (ABCC1), noto anche come proteina 1 associata a MDR (MRP1); e (iii) ABC membro della sottofamiglia G 2 (ABCG2), noto anche come gene di resistenza al mitoxantrone (MXR) (Gottesman et al., 2002). P-gp rimuove in modo efficiente agenti citotossici, come doxorubicina, vinblastina e paclitaxel. L'attivazione del ligando di Fas (FasL) migliora la resistenza alla chemioterapia aumentando l'espressione proteica di P-gp attraverso vie di segnale che coinvolgono GSK3 in tumori intestinali e gastrici (Tang et al., 2020).

Inoltre il miR-145 è in grado di sensibilizzare al cisplatino cellule di cancro esofageo, inibendo direttamente il pathway PI3K/AKT che, a sua volta, induce una diminuzione di espressione di MRP1 e P-gp (Zheng et al., 2019). Analogamente, il miR-145 ha inibito la resistenza all'oxaliplatino in cancro colon rettale regolando il recettore accoppiato alla proteina-G "GPR98" e downregolando MRP1 e P-gp (Fu et al., 2019).

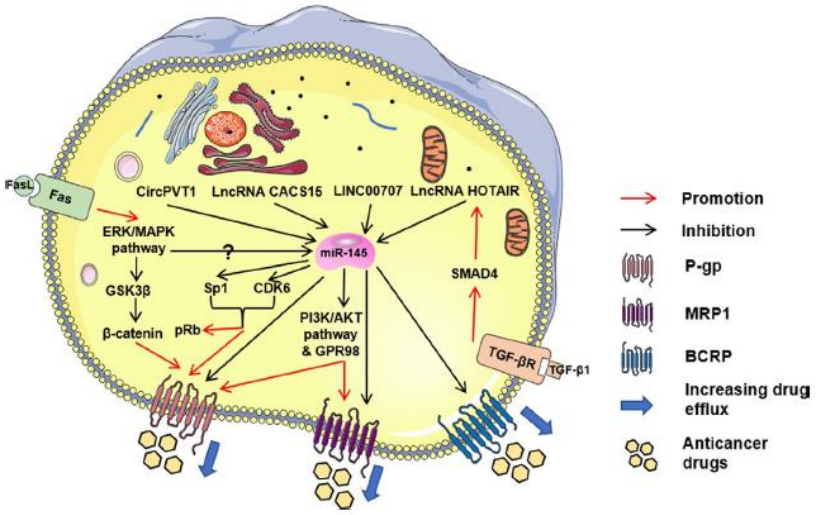



**Figura 1.10:** Il miR-145 e la complessità dell'ampio ventaglio dei meccanismi che lo coinvolgono nella regolazione della farmacoresistenza e dell'efflusso dei farmaci. Vedere il testo per i dettagli (Tang et al., 2020).

# CAPITOLO 2: OBIETTIVI

Il laboratorio presso cui ho svolto il progetto di ricerca descritto in questa tesi, si occupa da molti anni della via di segnale PI3K/AKT/mTOR come target terapeutico in diversi modelli di cancro, tra cui il carcinoma della prostata. Particolare interesse è stato concentrato sulla dissezione dei meccanismi di resistenza alla terapia mirata con inibitori di AKT, un'importante causa di fallimento della "kinase inhibitor therapy". Infatti, negli ultimi due decenni questa via di segnale ha rappresentato uno dei bersagli terapeutici più caldi in questo campo, portando alla produzione e sperimentazione preclinica e clinica di un elevato numero di piccole molecole inibitrici di AKT e di altre proteine chiave della stessa via di segnale. Purtroppo, ben poche di queste sono entrate in uso clinico, a causa non solo della loro tossicità, ma soprattutto della plasticità cellulare che consente il veloce instaurarsi di fenomeni di adattamento e di ricablaggio delle vie di segnale che favoriscono la sopravvivenza. Tuttavia, la cascata PI3K/AKT-dipendente rimane un importante "druggable target", ed è quindi fondamentale identificare i meccanismi che possono portare a resistenza adattativa.

Da esperimenti preliminari eseguiti nel nostro laboratorio, è emerso che il silenziamento di AKT può provocare un aumento di espressione di specifici regolatori e/o effettori della stessa via di segnale, in cellule epiteliali di prostata. Questa osservazione fornisce il razionale per ipotizzare che anche l'inibizione di AKT possa interferire con il profilo trascrizionale dei componenti della stessa via, ed è ragionevole supporre che tale modulazione sia mediata dall'intervento di specifici miR.

L'**obiettivo generale** di questo progetto è stato quindi investigare se il silenziamento di AKT sia in grado di modulare l'espressione di miR che hanno tra i loro target anche regolatori/effettori di AKT stesso, e se un meccanismo analogo possa essere scatenato anche dall'inattivazione farmacologica di AKT. Se confermata, infatti, questa ipotesi fornirebbe una spiegazione meccanicistica della riattivazione della segnalazione osservata in molteplici tipi di cancro, che guida la resistenza adattativa alla terapia con inibitori di AKT o, più in generale, di questa via di segnale.

Gli **obiettivi specifici** che ci siamo proposti di perseguire sono finalizzati a rispondere alle seguenti domande:

1) Possono il silenziamento o l'inibizione farmacologica di AKT modulare l'espressione dei miR intracellulari? In particolare, quali miR sono significativamente downregolati?

2) Esistono miR downmodulati nella cui costellazione sono presenti target regolatori di AKT o dei suoi effettori?

3) Esiste a valle dell'inibizione cronica di AKT un circuito miR/gene target in grado di riattivare la segnalazione e in tal modo instaurare resistenza adattativa?

Questi obiettivi sono stati perseguiti utilizzando molteplici approcci metodologici, dagli array di microRNA, a quelli di fosfoproteine, al silenziamento genico, che hanno portato ai risultati descritti nel capitolo 4.

# CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

## 3.1 Colture Cellulari

I modelli cellulari utilizzati per questo lavoro di tesi sono le linee PC3 e HEK-293.

Le cellule **PC3** sono una linea di carcinoma prostatico umano, caratterizzate da un fenotipo androgeno-indipendente e, oltre a questi ultimi, non sono responsive a glucocorticoidi e al fibroblast growth factor (FGF). La linea è stata stabilizzata nel 1979 da una metastasi ossea di un cancro prostatico di grado IV, in un maschio caucasico di 62 anni. Studi proteomici nelle PC3 hanno evidenziato che hanno tutte le caratteristiche tipiche delle "small cell neoendocrine carcinoma" e, la microscopia elettronica ha permesso di definirle come delle cellule scarsamente differenziate di adenocarcinoma, in possesso di tutte le caratteristiche delle cellule neoplastiche di origine epiteliale: microvilli numerosi, complessi giunzionali, nuclei e nucleoli anormali, mitocondri anomali, assenza di lamelle e lipoidal bodies. Non esprimono il PSA (Tai et al., 2011). La linea cellulare utilizzata per questo lavoro, è stata acquistata dalla American Tissue Culture Collection (ATCC).

In particolare, per questo lavoro di tesi abbiamo utilizzato le PC3 sia come cellule wild type da impiegare nei modelli farmacologici, sia come modello di silenziamento isoforma specifico di AKT (mediato da short-hairpin (ShRNA)), che di silenziamento del miR-145-5p inducibile con doxiciclina, quest'ultimo generato in collaborazione con il laboratorio della dr.ssa Alessandra Recchia, dell'Università di Modena, descritto nel prossimo paragrafo.

Le cellule **HEK-293** (Human embryonic kidney 293 cells), sono una linea cellulare immortalizzata derivata da cellule renali embrionali umane, cresciute in colture di tessuti prelevate da un feto femmina abortito nel 1973. Sono chiamate HEK poiché hanno avuto origine da colture di rene embrionale umano, mentre il numero 293 deriva dall'abitudine del dr. Graham, il primo ad isolarle, di numerare i suoi esperimenti: il clone cellulare HEK-293 originale, proveniva dal suo 293esimo esperimento. Analisi eseguite nello stesso laboratorio, hanno mostrato che la trasformazione e conseguente immortalizzazione, è stata ottenuta inserendo circa 4.5 kilobasi del braccio sinistro del genoma virale di adenovirus 5 nel cromosoma umano 19 (Graham et al., 1997). Esperimenti successivi hanno permesso di determinare che queste cellule fossero in realtà precursori di ghiandole surrenali embrionali, un tessuto contiguo a quello renale, ma trasfettabile con maggior efficienza

dall'adenovirus a differenza da quest'ultimo, e con un trascrittoma tipico di cellule con proprietà neuronali (Shaw et al., 2002). La linea cellulare utilizzata per questo lavoro, è stata acquistata dalla American Tissue Culture Collection (ATCC).

Le linee cellulari vengono conservate in azoto liquido in una soluzione composta per l'80% da fetal bovine serum (FBS), per il 10% da medium base per il loro mantenimento in coltura e dal 10% di dimetilsolfossido (DMSO). Una volta scongelate, le linee PC3 utilizzate per questo progetto (figura 3.1) sono state impiegate per la generazione dei seguenti modelli cellulari, coltivati come riportato di seguito:

-**PC3 wild type (wt)** coltivate in Ham's F12 + 10% FBS (Euroclone) inattivato termicamente, l'1% di penicillina/streptomicina (Sigma-Aldrich) e l'1% di L-Glutammina (Sigma-Aldrich).

-**PC3 trasdotte** con sistema di espressione inducibile (descritto nel paragrafo successivo):

**PC3 ShRNA scramble**

**PC3 ShRNA vs miR145-5p**

coltivate in Ham's F12 + 10% FBS (Euroclone) inattivato termicamente, l'1% di penicillina/streptomicina (Sigma-Aldrich) e l'1% di L-Glutammina (Sigma-Aldrich).

+ puromicina 1 μg/ml per 1 settimana fino a trasfezione stabile;

+ puromicina 0.5 μg/ml dall'inizio della fase di mantenimento.

Il processo di induzione del sistema di espressione viene innescato con la somministrazione di doxiciclina 100 ng/ml o 1 μg/ml per 24/48 h prima dell'esperimento.

Le **HEK-293** sono state invece coltivate in un medium composto da Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Euroclone), anch'esso addizionato con il 10% di FBS (Euroclone) inattivato termicamente, l'1% di penicillina/streptomicina (Sigma-Aldrich) e l'1% di L-Glutammina (Sigma-Aldrich).

Tutte le linee cellulari descritte, vengono incubate in un'atmosfera umidificata a 37°C, contenete il 5% di $CO_2$.

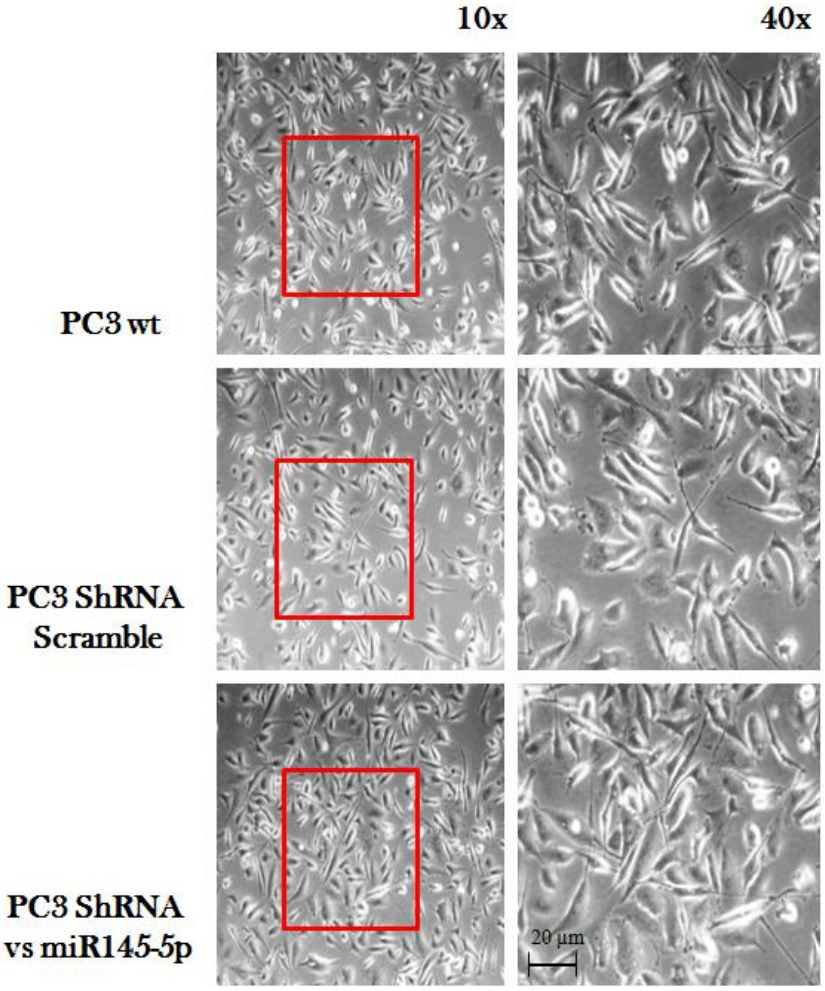



**Figura 3.1:** Linee cellulari di carcinoma prostatico in coltura osservate al microscopio a contrasto di fase (Nikon Eclipse TE2000 inverted microscope). In particolare, in figura sono riportate cellule PC3 wt ed in seguito alla loro trasduzione con il sistema di espressione inducibile (vedere il testo per i dettagli). Il riquadro rosso localizza la zona in cui è stato eseguito lo zoom al momento del cambio di obiettivo ad ingrandimento superiore.

## 3.2 Produzione di Lentivirus "pLKO" in cellule HEK-293 e successiva infezione delle cellule target (Human) con il sistema di espressione inducibile TetOn3G

Di seguito viene descritto il protocollo sperimentale per generare il costrutto virale (scramble o ShRNA (Sh) vs miR145-5p) nelle cellule packaging HEK-293, successivamente utilizzato per infettare le cellule target PC3, così da poter ottenere un modello cellulare in cui è possibile ottenere un silenziamento transiente del miR-145-5p (figura 3.2), mediante induzione dell'espressione con doxiciclina dello short-hairpin "miRZIP-145" (System Biosciences), descritto nel lavoro di Londoño-Vallejo et al., 2020.

DAY 1

(p60 = 4 ml Virus)

Mix:

- 400 µl DMEM SERUM FREE
- 3.7 µg delta8.2(GAG/POL), stock 1 µg/µl, usare pAX2 plasmid
- 0.2 µg VSV-G (ENVELOPE, COAT PROTEINS), stock 0.1 µg/µl

3 µg pLKO scramble o pLKO Sh vs miR145-5p

- Aggiugere 18 µl PEI (1µg/µl conc iniziale)

Vortexare per 10''

Incubare a RT per 15'

Tripsinizzare le HEK-293 e piastrarne 3.5 x $10^6$ in una p60

Aggiungere la mix di trasfezione

Incubatore per 48h

DAY 2

Piastrare le cellule target (PC3) in modo che il giorno dopo siano al 50-70% confluenza, ovvero, partendo da una p100 sub-confluente, tripsinizzarle ed eseguire un passaggio 1:3.

Piastrare una p60 delle stesse cellule come Ctrl per puromicina.

DAY 3

Raccogliere il surnatante dalle HEK-293, filtrarlo con filtri 0.45 µm e utilizzarlo fresco per infettare le cellule target o congelarlo a -80°C.

Infezione: aggiungere 1 ml di surnatante ad una p60 di cellule target + 1 µl di POLYBRENE da stock 5 µg/µl, (finale 5 µg/ml) oppure 3 ml di surnatante ad una p100 + 3 µl di POLYBRENE.

Incubare a 37°C per 3 h

Aggiungere 7 ml di DMEM full e lasciare in incubatore O/N

DAY 4

Cambiare il terreno alle cellule +pLKO e al controllo no-pLKO

Aggiungere DMEM + 10 %FBS + PUROMICINA 2 µg/ml finale per cellule PC3

DAY 5

Se le cellule controllo no-pLKO sono morte (ovvero se la mortalità è > 70-80 %), raccogliere le cellule +pLKO (se vitali > 50%).

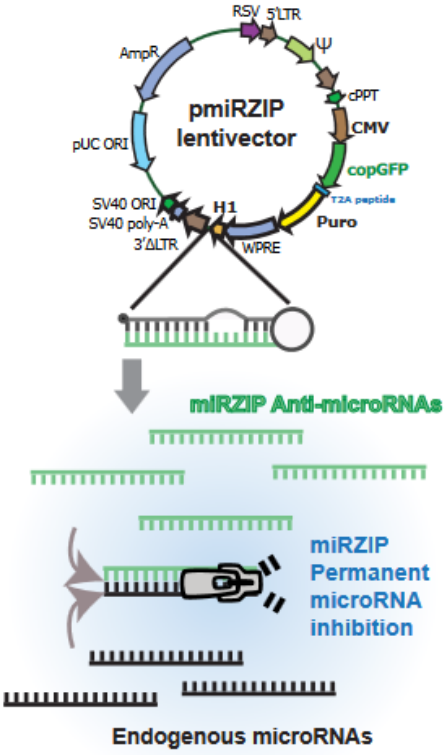



**Figura 3.2:** Illustrazione della struttura del costrutto esprimente lo short-haipin (RNA a forcina corta "miRZip") e del meccanismo con cui quest'ultimo media il silenziamento del miR target. (Immagine adattata da "miRZip™ Lentivector-based Anti-MicroRNAs, User manual, System Biosciences).

Il sistema di espressione inducibile da noi scelto è il Tet-on di terza generazione (**TetOn3G**), noto per essere più stabile nelle cellule eucariotiche grazie all'ottimizzazione dei codoni che sono stati "umanizzati", e all'utilizzo di tre domini minimi di attivazione trascrizionale (Das et al., 2016). Non utilizza la tetracycline transactivator (tTA) protein o il tetracycline repressor (TetR) presenti nei classici modelli Tet-on o Tet-off, ma una più efficiente proteina transattivatrice della tetraciclina di terza generazione (Tet3G), come descritto in figura 3.3. E' stato inserito nel costrutto mediante PCR cloning technology, ed utilizzato per overesprimere il miRZip scramble o Sh vs miR145, secondo le istruzioni dell'azienda produttrice (Clontech Laboratories, Takara Bio). Come descritto in precedenza, viene attivato dalla presenza di determinate concentrazioni di doxiciclina, un analogo più stabile della tetraciclina. Il dosaggio di antibiotico più adatto per l'induzione in

cellule tumorali prostatiche è stato scelto sulle basi delle osservazioni presenti sul lavoro di Brattsand et al., 2020, ed è indicato nella sezione "colture cellulari".

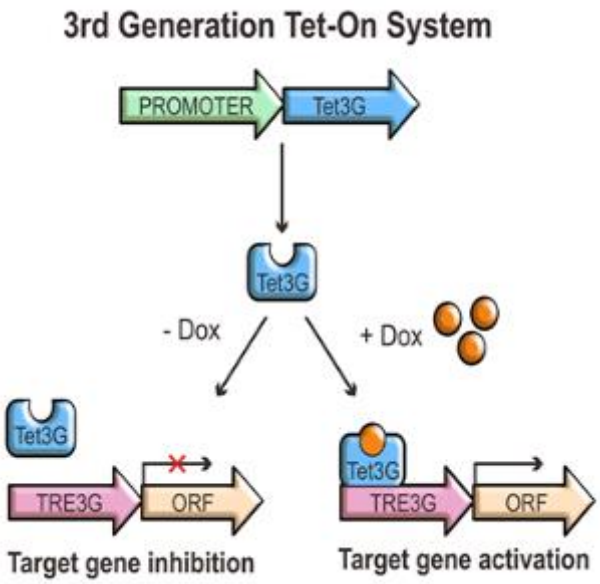



**Figura 3.3:** Illustrazione del meccanismo di funzionamento di un sistema inducibile TetOn3G. In questi costrutti, sono presenti specifiche sequenze di promotori forti (PROMOTER), che regolano la trascrizione della proteina transattivatrice della tetraciclina di terza generazione (Tet3G). Quest'ultima è in grado di legare le porzioni sul plasmide composte da operatori TetO, poste a monte di tre promotori minimi, il cui insieme è noto come elemento di risposta della tetraciclina di terza generazione (TRE3G). Tet3G non è in grado di legare TRE3G in assenza di doxiciclina, il sistema rimane perciò spento in assenza di antibiotico. La somministrazione di quest'ultimo, porta alla generazione di un complesso doxiciclina-Tet3G. Il cambio conformazionale lo rende in grado di legare l'operatore, avviando in questo modo la trascrizione del gene target di interesse (ORF). (Immagine adattata da Bio , BRIC . Copyright © BRIC, 2021).

## 3.3 Trasfezione delle linee cellulari

### 3.3.1 Trasfezione cellule HEK-293 ed overespressione di AKT wt e AKT K179M

Abbiamo deciso di preparare un modello cellulare HEK-293 in cui l'inibizione di AKT avvenisse attraverso la trasfezione di una sua forma nota come "kinase dead", ovvero un gene codificante per la chinasi in possesso però della mutazione K179M (figura 3.4). Questa sostituzione provoca una alterazione della conformazione del sito attivo di AKT, solitamente deputato ad accogliere l'ATP, e a scindere da essa il gruppo fosfato necessario per l'attività catalitica della chinasi che, perciò, in questo caso, non è in grado di svolgere la sua funzione biologica (Li et al., 2002). In parallelo, abbiamo anche trasfettato altre cellule HEK-293 con lo stesso

plasmide, contenete però una versione wt di AKT (figura 3.4), oltre al controllo di questi due modelli di overespressione, ovvero le stesse cellule non trasfettate. L'inserto contenuto nei plasmidi utilizzati per l'overespressione, contiene oltre al gene codificante per la particolare forma di AKT, anche la sequenza codificante per la green fluorescent protein (GFP), necessaria come "tag" per la valutazione della percentuale delle cellule trasfettate sulla popolazione totale. I plasmidi utilizzati al fine di ottenere l'overespressione di AKT wt e della variante kinase dead AKT K179M nelle cellule HEK-293, sono pEGFP-AKT-HA (nel caso della forma wt), e pEGFP-AKT(K179M) (nel caso del mutante K179M) (Watton et al., 1999).

In breve: è stata verificata l'integrità di entrambi i plasmidi mediante una elettroforesi di DNA a seguito dell'esecuzione del taglio con gli enzimi di restrizione EcoRI e BamHI (Fermentas®), rispetto al rispettivo plasmide non digerito. Il risultato, che ha confermato l'integrità strutturale dei plasmidi, è stato rivelato somministrando UV-viewer ai campioni prima della corsa elettroforetica e rivelando le bande sul gel mediante il transilluminatore. La concentrazione del DNA è stata determinata attraverso la misura dell'assorbanza a 260 nm e 280 nm allo spettrofotometro NanoDrop® ND-1000, e la buona qualità del DNA plasmidico, in termini di valutazione di contaminazione con acidi nucleici o proteine (OD 260/280 e OD 260/230), è stata verificata con lo stesso strumento.

La trasfezione è avvenuta mediante la preparazione di un medium composto da medium DMEM e da un rapporto polyethylenimine (PEI)/DNA plasmidico di 3:1 PEI (μg):total DNA (μg), il quale, a seguito di una veloce centrifugata a 1200 rpm per 10'' e lasciato incubare per 15' a temperatura ambiente, è stato somministrato alle cellule in coltura al 70% di confluenza. Il sistema è stato incubato a 37°C per 24 h. Le cellule usate come controllo sono state trasfettate con un empty vector. Dopo un'analisi delle cellule al microscopio invertito Nikon Eclipse TE2000, la detection delle cellule trasfettate positivamente, nonché read-out della avvenuta trasfezione, è stata effettuata mediante il microscopio a fluorescenza Nikon DS-Fi2 e telecamera Nikon Digital Sight DS-U3, essendo entrambi i plasmidi marcati con il tag GFP.

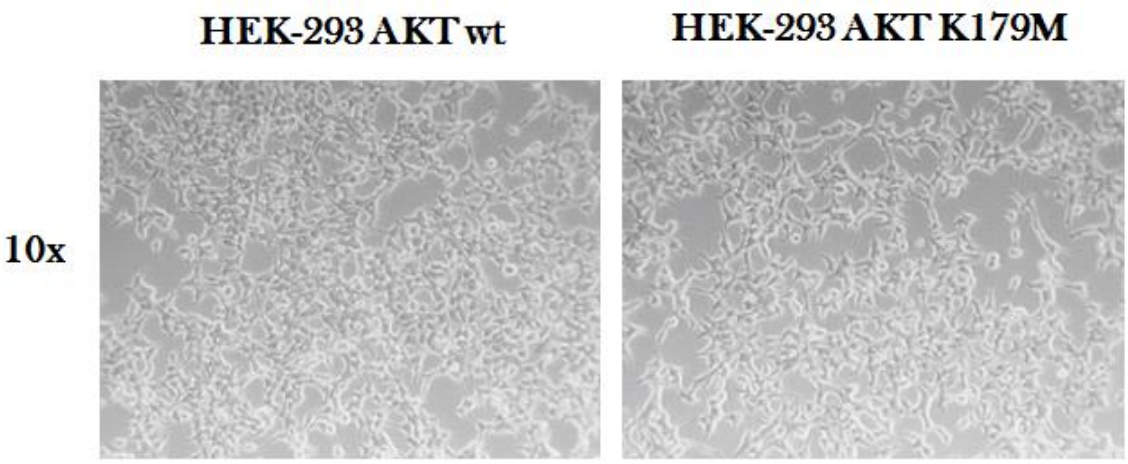



**Figura 3.4:** Linee cellulari HEK-293 in coltura in seguito della trasfezione con i plasmidi esprimenti le forme di AKT wt e del mutante K179M, descritte nel paragrafo precedente. Le cellule sono state osservate al microscopio a contrasto di fase (Nikon Eclipse TE2000 inverted microscope).

### 3.3.2 Trasfezione cellule PC3 e silenziamento isoforma-specifico di AKT

Il silenziamento isoforma-specifico di AKT nelle linee PC3 è stato è stato eseguito con ShRNA specifico (Santa Cruz), trasfettato per 72 h con ShRNA transfection reagent (Santa Cruz, CA), il tutto gentilmente fornito dal prof. Alex Toker (Beth Israel Deaconess Center, Boston, USA). Il protocollo sperimentale è del tutto analogo a quello descritto nel paragrafo 3.3.1. Per il controllo negativo, le cellule sono state trasfettate con ShRNA-scramble alla concentrazione di 100 nM. I costrutti esprimenti ShAKT1 e ShAKT2, pronti per l'infezione delle cellule PC3, sono stati ottenuti dal supernatante lentivirale generato nelle cellule packaging HEK-293, come descritto nella sezione "Day 1" del paragrafo 3.2.

AKT1 e AKT2 sono quindi stati silenziati con il set di ShRNA vs AKT1 o AKT2. Visto il gene di resistenza alla puromicina inserito nei costrutti, le cellule infettate sono state selezionate con 5 μg/ml del suddetto antibiotico.

I tre campioni di PC3 (Ctrl, ShAKT1, ShAKT2), sono stati preparati ciascuno in quadruplicato.

### 3.4 Lisi cellulare, estrazione e quantificazione proteica

Le cellule sono state raccolte e centrifugate a 1200 rpm per 5'. Il pellet così ottenuto è stato risospeso con 1 ml di PBS 1x e centrifugato nuovamente. Dopo aver rimosso il PBS usato per il lavaggio, è stato aggiunto AT buffer (20 mM Tris-Cl pH 7, 10% glicerolo, 1% NP-40, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM NaF, 5 mM sodio pirofosfato) con l'aggiunta di 1 mM sodio ortovanadato, 10 mM para-nitrofenilfosfato e 10 mM inibitori delle fosfatasi (PIC, Sigma-Aldrich) e il campione così ottenuto è stato vortexato per 10" e lasciato per 20' in ghiaccio. A questo punto il lisato cellulare viene sonicato tre volte, ciascuna per 10", e centrifugato a 12000 rpm per 15' a 4°C. Il surnatante così ottenuto è stato quantificato mediante il metodo Bradford, ovvero diluendo 1 µl di quest'ultimo con 800 µl di acqua distillata e 200 µl di colorante Bradford (BioRad).

Il valore della concentrazione proteica del lisato è stato ottenuto attraverso la lettura allo spettrofotometro (Genesys 10UV, Thermo Scientific) alla lunghezza d'onda di 595 nm, utilizzando una curva standard costruita utilizzando albumina di siero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) con concentrazioni da 0.5 a 5 mg/ml. Tutti i campioni sono stati misurati in duplicato e la concentrazione finale è stata determinata calcolando la media dei due valori. L'estratto proteico è stato infine addizionato di una quantità di Sample buffer 6x (Tris-Cl 20 mM pH 7.8, SDS 2%, glicerolo 20%, DTT 0.6 M e blu di bromofenolo) pari ad 1/5 del suo volume ed è stato denaturato a 100°C per 5'.

## 3.5 SDS page e Western blotting

La tecnica SDS-PAGE (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) permette di separare campioni di denaturato proteico (generalmente costituiti da 50 µg prelevati dal lisato totale) caricati su gel di poliacrilammide di percentuale variabile (generalmente 7-8%), utilizzando come riferimento uno standard di peso molecolare (250÷15 kDa, BioRad).

L'elettroforesi viene eseguita all'interno di una cella elettroforetica Mini-PROTEAN® (BioRad), utilizzando un Running buffer costituito da una soluzione di Tris/glicina/SDS (BioRad), inizialmente facendo correre i campioni caricati nel gel per 100 V a temperatura ambiente per 10' e successivamente per 150 V a 4°C fino all'arrivo del fronte all'estremità opposta ai pozzetti.

A questo punto le proteine vengono trasferite su una membrana di polivinildenfluoruro (PVDF) Immobilon-P (Millipore) mediante l'utilizzo di un campo elettrico di 90 mA per 1 ora e 45 minuti in condizione di semi-dry in Transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanolo). La membrana è stata poi incubata in agitazione con BSA 3% in tampone TBS/Tween20 (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.1% Tween20) a temperatura ambiente per circa 30 minuti per saturarne i siti aspecifici prima dell'incubazione overnight a 4°C con l'anticorpo primario diretto verso le proteine di interesse (Tabella 3.2), opportunamente diluito. A questa seguono tre lavaggi con tampone TBS/Tween20 di 10' ciascuno. Successivamente la membrana viene incubata per 45' a temperatura ambiente con un anticorpo secondario coniugato con l'enzima perossidasi opportunamente diluito (Tabella 3.2). Terminato il tempo di incubazione, seguono altri tre lavaggi con tampone TBS/Tween20 di 10'ciascuno.

Gli anticorpi sono stati rilevati mediante l'utilizzo di una soluzione di luminolo (5 ml composti da 0.8 ml di luminolo (2.5 mM luminolo, 4.3 mM 4-iodofenolo in Tris 0.1 M pH 9,35), 2.25 ml acqua, 0.25 ml di Tris 1 M pH 9.35, 40 µl BSA 30% e 1 µl $H_2O_2$). Il segnale luminoso è stato acquisito mediante lo strumento Kodak Image Station 440 CF.

## 3.6 Reverse-Phase Protein Arrays (RPPA)

Le cellule da sottoporre all'analisi in RPPA sono state opportunamente trattate, centrifugate e conservate a -80°C fino all'esecuzione della stessa. I pellet raccolti vengono lisati utilizzando un buffer di lisi TPER (Pierce) a cui è stato addizionato sodio ortovanadato 1 mM, NaCl 300 mM e PIC 10 mM.

I campioni, il cui titolo di concentrazione proteica è stato determinato utilizzando il metodo Bradford citato nel paragrafo 3.4, vengono diluiti ad una concentrazione finale di 0.5 μg/μl.

Ad ogni lisato proteico è stata poi aggiunta Tris-glicina SDS NOVAX Sample Buffer 2x (Invitrogen) addizionata col 5% di β-mercaptoetanolo e tutti i campioni sono stati denaturati a 100°C per 8'. A questo punto, i lisati vengono depositati sul supporto mediante lo strumento Arrayer Aushon 2470 (Biosystems, Affymetrix). Quest'ultimo possiede un pin in grado di trasferire una quantità di lisato nell'ordine del nanolitro su una matrice di nitrocellulosa montata su un vetrino (FAST slides, Schleicher & Schuell), il campione genererà perciò uno spot sulla slide dedicata. I lisati sono stati depositati secondo una curva di diluizione costituita da un campione non diluito e delle sue successive diluizioni 1:2, 1:4 e 1:8. L'array così ottenuto sarà trattato con I-block (Applied Biosystem) overnight e, successivamente, incubato con un determinato anticorpo primario (la cui diluizione oscilla dal 1:50 all'1:1000) per 30'. Nella procedura di immunostaining è stato utilizzato un pannello di anticorpi primari commerciali diretti verso specifiche proteine fosforilate o clivate (Tabella 3.2). Ciascuno di essi, prima dell'utilizzo, è stato validato mediante western blot per la sua specificità verso la proteina e il residuo fosforilato/clivato da lui bersagliato. Al fine della validazione, deve essere in grado di determinare la presenza della proteina verso cui è diretto facendo apparire un'unica banda sulla lastra impressionata dell'esatto peso molecolare verso cui è diretto.

In seguito all'incubazione con il primario, segue quella con l'anticorpo secondario coniugato ad una perossidasi (concentrato 1:10 per l'anti-mouse e 1:5000 per l'anti-rabbit) per 30'. L'amplificazionedella reazione è stata perciò ottenuta mediante perossidazione del cromogeno diaminobenzidina (DAB) ad opera di una perossidasi biotinilata. Il reverse phase immunostaining è stato effettuato utilizzando uno stainer automatizzato (DAKO Autostainer Plus).

Ad ogni set di array viene associato sia un controllo positivo che uno negativo. Il primo consiste in una serie di lisati cellulari, la cui espressione e grado di attivazione delle diverse proteine di interesse sono note. Il secondo,

in vetrini incubati con i soli anticorpi secondari utilizzati. La colorazione non specifica ottenuta, sarà sottratta all'array finale.

La variabilità di concentrazione delle proteine totali dei vari campioni è stata eliminata utilizzando un protocollo di normalizzazione basato sulla colorazione Sypro Ruby (Molecular Probes), un colorante fluorescente in grado di colorare permanentemente le proteine, la cui sensibilità è compresa nell'intervallo 0.25÷1.00 ng di proteine/$mm^2$.

I vetrini a questo punto subiscono 4 lavaggi con acqua bi-distillata ciascuno della durata di 1 minuto e, successivamente, vengono fatti asciugare 1 ora a temperatura ambiente prima di essere scansionati.

Al termine della scansione, le slides vengono analizzate utilizzando un software prodotto dalla VigeneTech (MicroVigene™, versione 2.2) in grado di identificare singoli spot corrispondenti a singoli campioni, associando ad essi un valore corrispondente all'intensità dei pixel che li costituiscono. Al fine di rendere possibile la comparazione di differenti campioni, ogni valore così ottenuto viene normalizzato sulla concentrazione delle proteine totali.

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il pacchetto "multitest" contenuto nel software "RStudio" (RStudio Team (2019). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. http://www.rstudio.com/). Infine è stata generata una heatmap per rendere più semplice ed intuitivo il confronto fra i livelli di espressione delle proteine analizzate, ad esempio nel caso in cui derivino da cellule che hanno subito trattamenti diversi (Marmiroli et al., 2011).

### 3.7 Ibridizzazione del RNA sul microarray Affymetrix e preparazione dei raw data

Per l'analisi dell'espressione del miRNA, è stato utilizzato l'array Affymetrix "GeneChip miRNA 4.0" (figura 3.5), seguendo le istruzioni del produttore. Per ogni campione, 1 μg di RNA (estratto come descritto nella sezione 3.11) è stato "etichettato" utilizzando il kit di marcatura dell'RNA con biotina, FlashTag™ (Genisphere, Hatfield, PA, USA). L'RNA marcato è stato quindi quantificato, frazionato e ibridato sul microarray seguendo i seguenti passaggi: i campioni di RNA biotinilati sono stati portati alla temperatura prima di 99 °C per 5', in seguito a 45 °C per altri 5'. Successivamente, l'ibridazione è stata eseguita ad agitazione continua a 60 rpm per 16 h a 48 °C, su una Affymetrix® 450 Fluidics Station. I chip microarray-miR sono stati

quindi lavati e colorati utilizzando la Genechip Fluidics Station 450 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Infine, il chip è stato scansionato utilizzando uno scanner Affymetrix GCS 3.000 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), in grado, attraverso l'emissione di un raggio laser ad argon della lunghezza d'onda di 488 nm, di eccitare i fluorocromi dei complessi. Il fotomoltiplicatore dello scanner raccoglie e converte l'emissione fluorescente in un valore numerico tramite convertitore digitale. Questi valori di intensità sono registrati da aree discrete (pixel) della superficie dell'array e salvati come file immagine (.Dat). Quest'ultimo viene valutato utilizzando il software Affymetrix® GeneChip™ Command Console, che visualizza i dati relativi all'intensità della fluorescenza e determina le intensità relative a ciascuna cella della sonda nell'array, salvandole in un file .CEL. I dati grezzi sono quindi stati estratti automaticamente utilizzando il protocollo di estrazione Affymetrix, nel software Affymetrix GeneChip® Command Console® (AGCC). L'importazione di CEL file, l'analisi RMA+DABG-All a livello di miRNA e l'esportazione dei risultati sono stati tutti eseguiti utilizzando il software Affymetrix® Expression Console™.

**Figura 3.5:** Microarray GeneChip miRNA 4.0. Affymetrix®.

L'analisi statistica dell'espressione differenziale dei miR viene eseguita mediante i test statistici descritti nella sezione successiva.

## 3.8 Analisi statistica dei dati

### 3.8.1 Test t-Student

L'analisi statistica dei dati di espressione genica è stata effettuata mediante test t-Student, ponendo $p \leq 0.05$ il valore minimo di significatività attraverso il software Microsoft Office Excel, confrontando il valore medio del campione in esame, rispetto al suo rispettivo campione di controllo. I dettagli sono riportati nelle didascalie delle figure corrispondenti. In queste ultime e nei rispettivi grafici, sono presenti degli asterischi. Il loro numero è direttamente proporzionale alla significatività statistica del dato. Dove possibile, gli esperimenti sono

stati eseguiti in triplicato e il valore riportato in tabella o nella rappresentazione grafica, è il risultato della media eseguita sui valori dei replicati.

### 3.8.2 Indice di correlazione di Pearson

Per l'analisi statistica dell'esecuzione delle correlazioni dei risultati dell'esperimento di RPPA, è stato utilizzato il coefficiente di Pearson, ponendo come > 0.5 il valore che indica "high correlation", 0.3 ÷ 0.5 "medium correlation" e 0.1 ÷ 0.3 "low correlation".

### 3.8.3 Wilcoxon t-test

I dati ottenuti dall'analisi del profilo di espressione dei miR nei 3 campioni di PC3 tramite Microarray GeneChip miRNA 4.0, sono stati analizzati *in silico*, mediante test statistici a stingenza decrescente, in collaborazione con la prof.ssa Silvia Bresolin, dell'Università di Padova. La prima analisi è stata effettuata mediante il Wilcoxon t-test, un test non parametrico utilizzato quando oltre a voler considerare se ogni osservazione è maggiore o minore di un certo valore di interesse, si vuole tener conto anche dell'ampiezza delle osservazioni. Si procede innanzitutto con il calcolo della differenza tra ciascuna osservazione e il valore d'interesse. Si ordinano ignorando il segno e si assegna il "rango" a partire dal più piccolo (nel caso in cui due o più ranghi fossero uguali, viene scelto quello intermedio). Si calcola la somma dei ranghi delle osservazioni che sono negative rispetto al valore ipotetico quella delle osservazioni positive. Si confrontano i risultati così ottenuti con gli opportuni valori tabulati di Wilcoxon, nel caso in cui la numerosità del campione sia ≤ 25. In caso contrario, andranno confrontati con la normale $Z\alpha_{/2}$, assumendo $\mu=n^*(n-1)/4$ e $\sigma= n^*(n+1)^*(2n+1)/24$. Il suddetto test, è stato utilizzato per studiare la significatività statistica dei valori di espressione differenziale dei miR all'interno delle seguenti coppie di campioni: Ctrl vs ShAKT1 e il Ctrl vs ShAKT2.

### 3.8.4 Linear models for microarray data (LIMMA)

In seguito, sui miR ottenuti dalle stesse coppie di campioni, è stato impiegato il "package" statistico "linear models for microarray data" (LIMMA), una tipologia di t-test utilizzato in particolare per l'analisi dell'espressione differenziale fra due campioni derivanti da esperimenti di microarrays, ma non solo: anche per dati derivanti da PCR, array di proteine e altre piattaforme (Ritchie et al., 2015).

I valori p-value sono stati adeguati per test multipli utilizzando il metodo di Benjamini e Hochberg per limitare il rate di false discovery, e impostati perciò a valori < 0.05. Il cut-off del fold-change è stata impostata su gradi di libertà a stringenza variabile, così da ottenere un ventaglio di miR il cui livello di espressione differenziale fosse classificata sulla base di una significatività statistica crescente.

### 3.8.5 Transcriptome Analysis Console (TAC)

Infine, l'ultimo step della nostra analisi statistica dei risultati dell'esperimento di microarray, è stato l'utilizzo del software "Transcriptome Analysis Console (TAC)", un tool in possesso di un ampio spettro di funzioni che seguono un esperimento con questi Chip, su tutte il controllo qualità, la normalizzazione dei dati e l'esecuzione di test statistici per studiare l'espressione differenziale, focalizzare lo studio solo certi particolari geni e iscriverli nelle pathway di nostro interesse, esplorare interazioni fra coding e non-coding RNA (TAC user manual, ThermoFisher). L'analisi è stata eseguita seguendo il manuale appena citato, impostando i seguenti gradi di libertà:

i) p-value < 0.05;

ii) linear FC > 2 and < -2.

### 3.8.6 miRNet: miRNA-centric network visual analytics platform

Utilizzando la piattaforma "miRNet", un tool online che permette di identificare i network di interazione fra un particolare miR e i suoi target, abbiamo approfondito il loro ruolo funzionale, e le principali pathway con cui interagiscono. Il flusso di lavoro principale consta di tre passaggi principali: immissione dei dati, creazione della

rete e analisi visiva della rete. Inizialmente si sfrutta il modulo "miRNAs" consente agli utenti di connettere i miR insieme a geni target, TF, ncRNA ecc. di interesse; i moduli "Genes" e "TFs" collegano gli input corrispondenti ai loro partner, nel contesto di interazioni note. Il modulo "SNPs", infine, associa gli SNP agli stessi attori chiave appena citati. A questo punto si caricano perciò i dati, ovvero l'elenco di miR differenzialmente espressi ottenuti dall'esperimento. Verrà applicata una consolidata analisi dell'espressione differenziale per identificare miR o geni significativi, come nuove liste di input. Nella seconda fase, questi elenchi verranno mappati sulla base delle knowledge base sottostanti, così da creare tabelle e reti di interazione. Nella terza fase, i risultati saranno presentati come reti interattive per l'esplorazione visiva (Le Chang et al., 2020).

Sulla base di questa analisi, abbiamo concentrato la nostra attenzione solo su quei miR la cui espressione era stata significativamente downregolata e i cui target diretti, secondo quanto riportato dalla letteratura o dai database pubblici, comprendono interattori della via di AKT. Il risultato è stato rappresentato con diagrammi dalle sembianze di costellazioni, con il miR in esame al centro e i suoi target in periferia.

### 3.8.7 Rappresentazione grafica mediante heatmap e clusterizzazione dei campioni

La rappresentazione grafica mediante heatmap dell'espressione genica differenziale e successiva clusterizzazione dei miR nei tre campioni studiati mediante microarray, è stata ottenuta attraverso il pacchetto "ggplot2", utilizzando la piattaforma RStudio (RStudio Team (2019). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. http://www.rstudio.com/). Sono stati selezionati i parametri "complete linkage" e "euclidean distance" come metodi per la misura della similarità fra l'espressione dei miR nella fase di clusterizzazione dei campioni.

### 3.8.8 Analisi della varianza (ANOVA)

Per lo studio della valenza statistica di più set di dati di espressione genica in contemporanea, è stata usato usato il test noto come analisi della varianza (ANOVA). Quest'ultimo consiste in un insieme di tecniche facenti parte della statistica inferenziale che permettono di confrontare due o più gruppi di dati confrontando la

variabilità intra e inter gruppi. L'ipotesi nulla solitamente prevede che i dati di abbiano la stessa origine, ovvero la stessa distribuzione stocastica, e che le differenze osservate siano dovute solo al caso.

Il calcolo dell'ANOVA è stato eseguito mediante il con il software RStudio. Prima di procedere è necessario verificare i seguenti assunti:

1. Indipendenza dei punteggi osservati;
2. normalità della distribuzione, eseguito mediante il test Kolmogorov-Smirnov;
3. omoschedasticità (o omogeneità delle varianze), calcolato mediante il test di Bartlett;

l'output è un p-value che dovrà essere maggiore o uguale ad una soglia prefissato (di default, come nel nostro caso, è 0.05). Verificati gli assunti si può procedere con l'ANOVA vera e propria, utilizzando il seguente comando su RStudio:

*>anova(lm(y ~A))*

la cui l'ipotesi alternativa che vogliamo sostenere è che almeno una delle medie è diversa dalle altre. Infine, risultato finale dell'analisi, espresso come p-value che, nel nostro caso, è stato posto a 0.5, si ottiene come output della funzione "summary" (RStudio Team (2019). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. http://www.rstudio.com/).

### 3.9 Inibitori farmacologici delle protein-chinasi

**AKT inhibitor XII** (AKTi XII) è un inibitore allosterico, permeabile alla membrana cellulare, non ATP-competitive, in grado di indurre una variazione conformazionale del PH-domain di AKT, che se utilizzato in un certo range di concentrazione, risulta essere selettivo soprattutto per l'isoforma AKT2. Presenta infatti un $IC_{50}$ = 805 nM per l'inibizione di quest'ultima, > 10 μM per AKT1/3, e > 50 μM per le chinasi PKA/PKC/SGK. Questo farmaco, se somministrato simultaneamente ad altri agenti chemioterapici come herceptin, camptotecina, doxorubicina, o il ligando TRAIL, induce un significativo aumento di espressione della caspasi-3 (read-out dell'induzione dell'apoptosi), rispetto alla sola chemoterapia, in linee cellulari tumorali, in particolare nelle LNCaP, HT29, MCF7 e A2780 (Zhao et al., 2007).

**AKT inhibitor VIII** (noto anche come AKTi 1/2) è un inibitore allosterico, permeabile alla membrana cellulare, non ATP-competitive, capace di forzare AKT a mantenere la conformazione inattiva "PH-in". E' in

grado di agire su tutte e tre le isoforme di AKT, AKT1, 2 e 3, con un $IC_{50}$ di 58, 210, e 2200 nM, rispettivamente (Calleja et al., 2009). Mostra inoltre una buona selettività contro un pannello di altre 70 chinasi, mostrando un'attività farmacolgica nel range del micromolare. Alcune di queste sono le protein-chinasi calcio/calmodulina-dipendenti e la chinasi della catena leggera della miosina (Desai et al., 2011). Esperimenti condotti su modelli cellulari di cancro, in particolare in quello prostatico e della cervice uterina, mostrano come questo inibitore sia in grado di sensibilizzare le cellule a stimoli apoptotici (DeFeo-Jones et al., 2005). Nelle cellule HeLa, inoltre, induce un blocco mitotico e inibisce la migrazione cellulare (Jo et al., 2011).

I due farmaci, AKTi XII (Merck) e AKTi 1/2 (Calbiochem®), sono stati utilizzati per il trattamento delle cellule alla concentrazione di 1 μM per le tempistiche indicate nei rispettivi esperimenti riportati nel capitolo risultati, prima della raccolta delle stesse. Il campione cellulare utilizzato come controllo, non viene trattato con il farmaco, ma addizionato con l'1% di DMSO per la stessa tempistica del trattamento, prima di essere anch'esso raccolto.

### 3.10 Immunofluorescenza

Prima di procedere con l'immunofluorescenza, le cellule sono state fissate con soluzione di paraformaldeide al 4% in PBS 1X per 15'. Successivamente le membrane cellulari delle cellule PC3 wt o trasdotte con il costrutto scramble/Sh vs miR145-5p, sono state permeabilizzate utilizzando Triton X100 (0.1%) in PBS 1X per 5' a temperatura ambiente. Sono seguiti 3 lavaggi in PBS 1X da 5' ciascuno.

Per saturare i siti di legame aspecifici è stata utilizzata una soluzione di PBS 1X contenente 3% BSA, per 30' a temperatura ambiente.

I vetrini sono quindi stati incubati overnight a 4°C con una soluzione di BSA 3% in PBS 1X in cui è stata diluita l'opportuna quantità di anticorpo primario, secondo la tabella 3.2.

Dopo 3 lavaggi da 5' in PBS 1X le cellule sono state incubate per 45' a temperatura ambiente con una soluzione contenente l'anticorpo secondario Alexa Fluor FITC 488 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), diluito 1:200 in PBS 1X BSA 3%.

Dopo 3 lavaggi in PBS 1X ed un lavaggio in acqua i nuclei sono stati marcati con e 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI 1:200) per 5'.

Dopo un lavaggio con acqua e 3 lavaggi da 5' con PBS, i vetrini sono stati montati su un portaoggetti di 26x76 mm con il montante DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane) e osservati al microscopio a fluorescenza Nikon DS-Fi2 e telecamera Nikon Digital Sight DS-U3.

### 3.11 Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule al termine della trasfezione o del trattamento farmacologico, come descritto nella sezione "risultati e discussione", con l'RNeasy Mini Kit (Qiagen) seguendo le istruzioni fornite dal produttore, rimuovendo la quota di DNA genomico mediante trattamento con DNasi. La concentrazione dell'RNA totale è stata determinata misurando l'assorbanza a 260 nm (A260) e a 280 nm (A280) con lo spettrofotometro NanoDrop® ND-1000: il rapporto A260/A280 permette di valutare la purezza dell'RNA estratto. Il corrispondente cDNA è stato generato con il kit commerciale High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem) seguendo le istruzioni fornite dall'azienda produttrice. Successivamente, è stata eseguita la quantificazione dell'espressione genica dei geni riportati nella tabella 3.1 mediante Real Time PCR quantitativa (RT-qPCR) in triplicato. I campioni sono stati caricati in una 96-well reaction plate: un'aliquota (2,5 µl) di cDNA diluito (1 50) è stata amplificata in un volume finale di 10 µl, contenente 5 µl di Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG 2 × (Invitrogen) e 0.25 µl di ciascun primer gene-specifico (10 µM), disegnati mediante il sofware Beacon Designer 2.06 (Premier Biosoft International), la cui sequenza è anch'essa riportata nella tabella 3.1. Il protocollo di amplificazione consiste in una fase iniziale di 2' a 50°C e 2' a 95°C, seguiti da 45 cicli di 10" a 95°C e 30" a 60°C. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in un termociclatore LightCycler 480 (Roche Diagnostics). La relativa quantificazione dell'espressione genica è basata su un metodo comparativo di soglia (Cycle-threshold, 2-ΔΔCt) con normalizzazione dei dati su un gene ubiquitario (GAPDH, Gliceraldeide 3-fosfato Deidrogenasi).

E' importante sottolineare che la coppia di primers utilizzati per amplficare il Ras, è in grado di riconoscere entrambe le isoforme N/K-Ras.

Il miR-145-5p è stato amplificato mediante il kit "Taqman gene expression" (Thermo Fisher), seguendo le istruzioni e utilizzando i reagenti della ditta fornitrice, il protocollo di amplificazione è però lo stesso appena citato e impiegato per gli altri geni.

| **GAPDH** | **MDM2** |
|---|---|
| Forward: 5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA-3' | Forward: 5'-GAATCATCGGACTCAGGTACATC-3' |
| Reverse: 5'-TTCACACCCATGACGAACAT-3' | Reverse: 5'-TCTGTCTCACTAATTGCTCTCCT-3' |
| **AKT1** | **c-Myc** |
| Forward: 5'-TGGACTACCTGCACTCGGAGAA-3' | Forward: 5'-TTCTCTCCGTCCTCGGATTC-3' |
| Reverse: 5'-GTGCCGCAAAAGGTCTTCATGG-3' | Reverse: 5'-GTAGTTGTGCTGATGTGTGGA-3' |
| **AKT2** | **CDK4** |
| Forward: 5'-GAAGTCGCTCACACAGTCAC-3' | Forward: 5'-TGAAATTGGTGTCGGTGCCT-3' |
| Reverse: 5'-ATACTTCAGCGCAGTGAGGA-3' | Reverse: 5'-CAGTCGCCTCAGTAAAGCCA-3' |
| **Ras** | **PHLPP1** |
| Forward: 5'-TGTGGGTAGTTGGAGCTGGTG-3' | Forward: 5'-GCCACATAATCCCCTGGAAC-3' |
| Reverse: 5'-CATGTACTGGTCCCTCATTGC-3' | Reverse: 5'-CCATTGCAGTGGGGCTTC-3' |
| **Irs-1** | |
| Forward: 5'-GCAACCAGAGTGCCAAAGTGA-3' | |
| Reverse: 5'-GGAGAAAGTCTCGGAGCTATGC-3' | |

**Tabella 3.1:** Sequenze nucleotidiche dei primers utilizzati per l'amplificazione dei geni target mediante RT-qPCR.

| Anticorpi primari per Western blot | Diluizione | Fornitore |
|---|---|---|
| Actina | 1÷8000 | CST |
| Tubulina | 1÷8000 | Sigma-Aldrich |
| Phospho-AKT1 S473 | 1÷1000 | CST |
| Phospho-AKT2 S474 | 1÷1000 | CST |
| Phospho-AKT1/2 | 1÷1000 | CST |
| AKT tot | 1÷1000 | CST |
| N/K-Ras | 1÷1000 | GeneTex |
| GFP | 1÷1000 | Sigma-Aldrich |
| Anticorpi primari per IF | Diluizione | Fornitore |
| N/K-Ras | 1÷200 | GeneTex |
| Anticorpi primari per RPPA | Diluizione | Fornitore |
| Phospho-AKT S473 | 1÷100 | CST |
| Phospho-GSK3α/β S21-9 | 1÷100 | BioSource |
| cl-PARP | 1÷50 | CST |
| Anticorpi secondari | Diluizione | Fornitore |
| Goat Anti-Rabbit IgG, HRP conjugated | 1÷5000 | Thermo Fisher Scientific |
| Goat Anti-Mouse IgG, HRP conjugated | 1÷5000 | Thermo Fisher Scientific |
| Goat Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor FITC 488 | 1÷200 | Thermo Fisher Scientific |

**Tabella 3.2:** Anticorpi primari e secondari utilizzati per Western blot, immunofluorescenza (IF), e RPPA.

# CAPITOLO 4: RISULTATI

### 4.1 Il silenziamento di AKT modula l'espressione della fosfatasi PHLPP1/2.

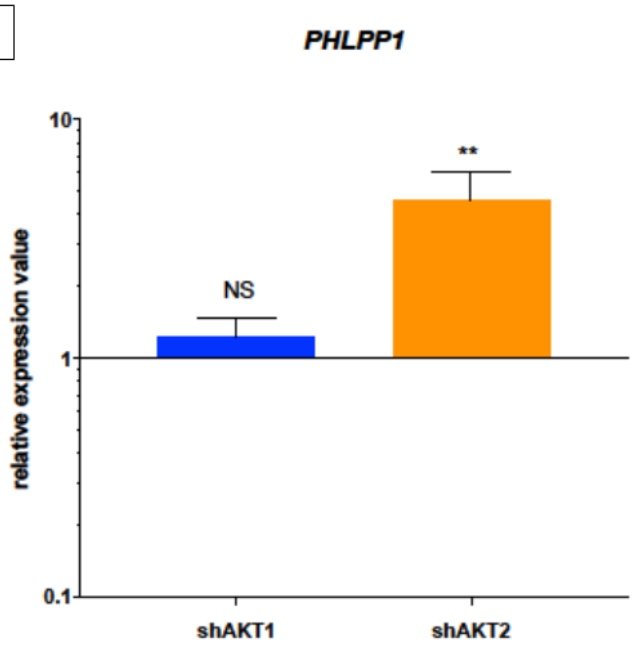
Precedenti ricerche condotte nel nostro laboratorio hanno dimostrato che in linee epiteliali prostatiche normali (PNT1a) e cancerose (PC3) l'overespressione ectopica della glicoproteina chaperon clusterina è in grado di attivare la via di PI3K/AKT. È stato dimostrato che tale attivazione è regolata dalla modulazione dell'espressione del miR-190 e, a cascata, di uno dei suoi target, la fosfatasi PHLPP1 (Bertacchini et al, 2019). Essendo PHLPP1 la fosfatasi che termina il segnale AKT2-dipendente defosforilando la S474, la diminuita espressione di PHLPP1 si traduce in una iperfosforilazione di AKT2 S474 e quindi nell'attivazione costitutiva della via di segnale a valle di AKT2. Oltre ad offrire una spiegazione meccanicistica dell'attivazione dell'asse PI3K/AKT da parte di clusterina in queste cellule, i risultati descritti nella pubblicazione ci hanno indotto a studiare più a fondo i rapporti reciproci tra AKT e i miR in questo modello sperimentale.

Il primo obiettivo del mio progetto di dottorato è stato quindi analizzare quale effetto abbia il silenziamento di AKT2 sull'espressione di PHLPP1 in un modello di carcinoma prostatico *in vitro*.

Cellule PC3 sono state quindi trasdotte con il vettore lentivirale pLKO esprimente ShRNA specifici per AKT1 o AKT2, o il vettore pLKO privo di inserto, e dopo 24 h sono state selezionate con puromicina per le seguenti 72 h. Successivamente sono state sottoposte a estrazione di RNA seguita da RT-qPCR per la valutazione quantitativa di PHLPP1.

In risposta al silenziamento di AKT2, abbiamo potuto osservare un significativo aumento dell'espressione di PHLPP1 (figura 4.1).

a




b

| RT-qPCR | AKT1 | AKT2 |
|---|---|---|
| ShAKT1.1 | 0.20 | 1.22 |
| ShAKT1.2 | 0.17 | 1.14 |
| ShAKT1.3 | 0.14 | 0.92 |
| ShAKT1.4 | 0.19 | 1.32 |
| ShAKT2.1 | 0.95 | 0.39 |
| ShAKT2.2 | 1.96 | 0.44 |
| ShAKT2.3 | 1.09 | 0.38 |
| ShAKT2.4 | 2.03 | 0.39 |

**Figura 4.1** Il silenziamento di AKT2 aumenta l'espressione di PHLPP1. Cellule PC3 sono state trasdotte con pLKO-ShAKT1, pLKO-ShAKT2 o pLKO vuoto (pLKO Ø), in quadruplicato. La valenza statistica della riduzione dell'espressione del dato è stata studiata mediante test t-student, paragonando la media dell'espressione genica di un determinato set di replicati silenziati, rispetto alla media dei replicati del controllo.
a) Dopo estrazione di RNA, l'espressione di PHLPP1 è stata quantificata tramite RT-qPCR. PHLPP1, ShAKT1 vs pLKO Ø: $p > 0.05$; PHLPP1, ShAKT2 vs pLKO Ø: $p < 0.01$**.
b) Il silenziamento di AKT nei quadruplicati è stato controllato tramite RT-qPCR e i valori ottenuti sono riportati nella tabella 4.1
AKT1 ShAKT1 vs Ctrl: p-value = 0.002 ***; AKT1 ShAKT2 vs Ctrl: p-value > 0.05.
AKT2 ShAKT1 vs Ctrl: p-value > 0.05; AKT2 ShAKT2 vs Ctrl: p-value = 0.004 ***.

Questi risultati non sono solo una conferma di quelli precedentemente pubblicati. Infatti, per la prima volta aprono una finestra sulla possibilità che AKT, guidando il profilo d'espressione dei miR intracellulari, sia in grado di modulare la propria attività, e di conseguenza tutta la cascata di segnale. Questa osservazione appare particolarmente suggestiva se si considera che finora la terapia mirata del cancro basata sull'utilizzo di farmaci inibitori di AKT è stata frustrata principalmente dalla rapida insorgenza di resistenza, mediata dai veloci e dinamici meccanismi di rewiring delle vie di segnalazione intracellulare.

Ci siamo pertanto chiesti se i dati descritti sopra possano costituire la base di un meccanismo molecolare, non ancora noto, che guida l'instaurarsi di resistenza adattativa alla terapia con inibitori di AKT mediante riattivazione della cascata di segnale.

## 4.2 Il silenziamento di AKT1 e di AKT2 modula l'espressione dei miR in modo differenziale.

Le osservazioni riportate nel paragrafo precedente ci hanno portato a chiederci quanti e quali miR siano modulati da AKT in questo modello sperimentale di carcinoma prostatico, e quali di questi siano modulati differenzialmente dal silenziamento di AKT1 e di AKT2.

A questo scopo, in collaborazione con la dr.ssa Bresolin dell'Università di Padova, il trascrittoma dei quadruplicati descritti nel paragrafo precedente (figura 4.2 a), ottenuti dal silenziamento delle singole isoforme, è stato analizzato mediante la tecnologia GeneChip miRNA 4.0 (Affymetrix®). In particolare, questo array ci ha permesso di studiare il livello di espressione di 6369 miR.

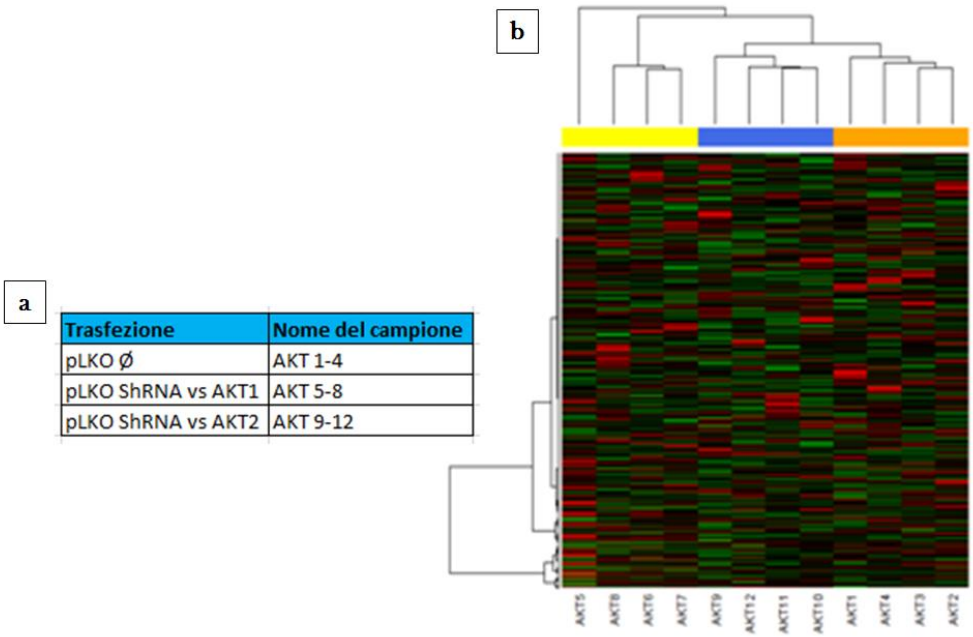


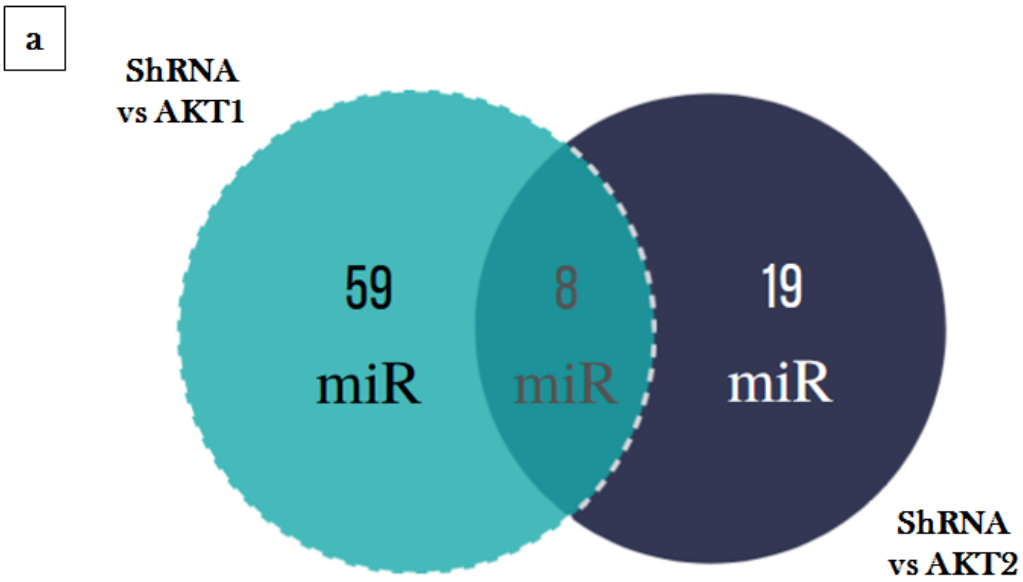

**Figura 4.2** a) Legenda dei quadruplicati sperimentali. b) Heatmap rappresentativa dell'espressione genica differenziale e isoforma specifica dei tre gruppi di campioni.

È importante notare che i quadruplicati clusterizzano fra loro, a conferma della buona qualità dei campioni sperimentali (figura 4.2 b). Come ci si aspettava, il silenziamento di AKT produce un profilo di espressione di miR molto diverso rispetto al controllo trasdotto con vettore vuoto. Un risultato ancora più stimolante è che il profilo è significativamente diverso anche se si confrontano i silenziati di AKT1 con i silenziati di AKT2.

Tramite la successiva analisi *in silico,* mediante il Wilcoxon t-test, LIMMA, e TAC, è stato possibile stabilire che dal confronto ctrl vs ShAKT1 risultano differenzialmente espressi 67 miR, mentre dal confronto ctrl vs ShAKT2 risultano differenzialmente espressi 27 miR.

È inoltre importante sottolineare che un sottogruppo di miR è modulato in entrambi i campioni (figura 4.3 a, b).

In base a questi risultati possiamo concludere che AKT è in grado di modulare pesantemente il profilo di espressione intracellulare dei miR in questo particolare modello sperimentale. Inoltre, l'osservazione che alcuni miR sono differenzialmente regolati da AKT1 e da AKT2 potrebbe essere estremamente utile per identificare funzioni non sovrapponibili delle due isoforme.




b

| miR modulati dal silenziamento di entrambe le isoforme AKT1 e AKT2 |
|---|
| miR-145-5p |
| miR-543 |
| miR-2277-5p |
| miR-3127-5p |
| miR-4668-5p |
| miR-6737-5p |
| miR-6742-5p |
| miR-6848-5p |

**Figura 4.3:** a) Rappresentazione mediante diagramma di Eulero Venn del risultato dell'analisi *in silico* dei miR differenzialmente espressi a seguito del silenziamento isoforma-specifico di AKT. b) Tabella riportante gli 8 miR differenzialmente espressi comuni ai due campioni, ovvero emersi da entrambi i confronti ctrl vs ShAKT1 e ctrl vs ShAKT2 a seguito dell'analisi *in silico*.

### 4.3 Numerosi geni correlati alla via di segnale PI3K/AKT entrano nella costellazione del miR-145-5p.

La piattaforma "miRNet" permette di raggruppare i target noti di ogni miR, e quindi di costruire network di interazione fra un particolare miR e una specifica via di segnale. Particolarmente interessanti sono apparsi alcuni miR coinvolti nella regolazione di meccanismi proinfiammatori e/o patologie neoplastiche, quali il miR-329-3p, il cui bersaglio è il fattore di trascrizione legato alla regolazione del ciclo cellulare E2F, il miR-543, il cui bersaglio Twist è coinvolto nell'EMT, o ancora il miR-149-5p, che inibisce l'espressione di IL6.

Tuttavia, la nostra attenzione si è concentrata soprattutto sui miR, modulati dal silenziamento di AKT, che possiedono tra i loro target interattori della via di PI3K/AKT, secondo quanto riportato dalla letteratura o dai database.

Il miR-145-5p figura tra i miR maggiormente downregolati, anche nelle analisi a più alta stringenza, sia da AKT1 che da AKT2. L'esecuzione del test statistico ANOVA, ci ha permesso di verificare la valenza statistica del risultato riportato di seguito:

- ShAKT1: riduzione dell'espressione del miR-145-5p con un fold change di 2.07, rispetto al Ctrl. ANOVA p-value = 0.0004***
- ShAKT2: riduzione dell'espressione del miR-145-5p con un fold change di 2.32, rispetto al Ctrl. ANOVA p-value = 0.001***

Questo miR, che localizza nella regione cromosomica 5p32, è noto per il suo ruolo di tumor-suppressor, e la diminuzione della sua espressione è stata descritta in tumori sia solidi (in particolare polmone, intestino e prostata) sia ematologici (Das et al., 2015; Ozen et al., 2008; Mohit et al., 2010). La sua azione si basa sull'inibizione di geni che favoriscono la progressione tumorale, molti dei quali presenti nella costellazione ottenuta dal nostro studio (figura 4.4). Ha attratto la nostra attenzione poiché nella sua costellazione si trovano numerosi geni legati alla via di segnale di PI3K, come c-Myc, MDM2, IRS1, IGF-1R, N/K-Ras, CDK4 (figura 4.4 a).

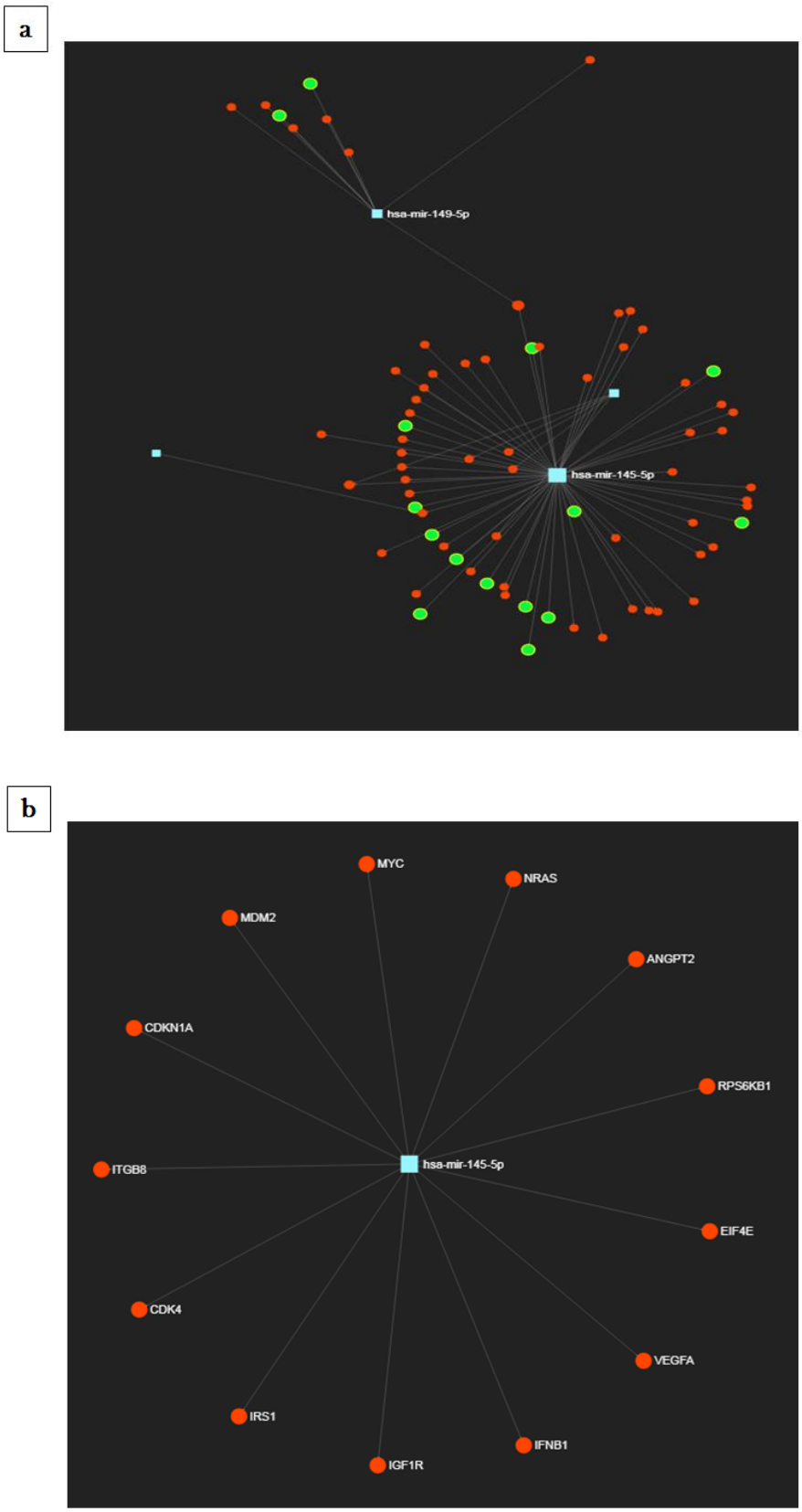



**Figura 4.4:** Costellazioni ottenute tramite miRNet, che illustrano l'interazione tra il miR-145-5p e i suoi target fisiologici. Nel pannello (a) è possibile apprezzare due esempi della complessità dei network di interazione. Nel pannello (b) sono rappresentati i principali target del miR-145-5p legati alla pathway di PI3K/AKT/mTOR.

### 4.4 L'espressione del proto-oncogene N/K-Ras è drammaticamente upregolata dalla riduzione di miR-145-5p.

Abbiamo quindi deciso di verificare se l'espressione dei target più significativi nell'ambito di questa costellazione sia modificata dalla riduzione del miR-145-5p dopo silenziamento di AKT.

I livelli di mRNA di IRS-1, MDM2, c-Myc e CDK4 non hanno mostrato variazioni significative nei campioni silenziati per AKT2; il silenziamento di AKT1 sembra provocare una piccola, ancorché significativa, riduzione dell'espressione di questi geni (i p-values sono riportati nella didascalia della figura 4.5). Tuttavia, partendo dall'osservazione che il miR-145-5p è drammaticamente abbassato dal silenziamento di AKT, questo risultato non è stato oggetto di ulteriori investigazioni. Ci siamo invece concentrati sui geni upregolati dalla diminuzione di miR-145-5p.

| RT-qPCR | Irs-1 | MDM2 | c-Myc | CDK4 |
|---|---|---|---|---|
| ShAKT1 | 0.48 | 0.55 | 0.50 | 0.37 |
| ShAKT2 | 1.06 | 1.02 | 1.15 | 1.14 |

**Figura 4.5:** Espressione dei geni target del miR-145-5p mediante RT-qPCR. I valori dei replicati sono normalizzati sul rispettivo controllo pLKO vuoto. La valenza statistica della riduzione dell'espressione del dato è stata studiata mediante test t-student, paragonando la media dell'espressione genica di un determinato set di quadruplicati silenziati, rispetto alla media dei replicati del controllo. Irs-1 ShAKT1 vs Ctrl: p-value = 0.04 *; Irs-1 ShAKT2 vs Ctrl: p-value > 0.05
MDM2 ShAKT1 vs Ctrl: p-value = 0.004 ***; MDM2 ShAKT2 vs Ctrl: p-value > 0.05.
c-Myc ShAKT1 vs Ctrl: p-value = 0.04 *; c-Myc ShAKT2 vs Ctrl: p-value > 0.05.
CDK4 ShAKT1 vs Ctrl: p-value = 0.005 ***; CDK4 ShAKT2 vs Ctrl: p-value > 0.05.

Estremamente interessante è il drammatico aumento di espressione di N/K-Ras, in particolare dopo silenziamento di AKT2 (figura 4.6). Infatti, il silenziamento di AKT1 non sembra invece influenzare l'espressione di questa proteina. Essendo Ras un importante regolatore a monte di PI3K (Manning & Toker 2017, Wang et al., 2020), questo risultato potrebbe essere di fondamentale supporto alla nostra ipotesi. Abbiamo infatti ragionato che se non solo il silenziamento, ma anche l'inibizione farmacologica di AKT provoca una upregolazione di Ras, l'effetto finale su PI3K potrebbe riattivare la cascata di segnale (Wang et al., 2020).

I risultati presentati finora stabiliscono pertanto che AKT è in grado di modulare uno spettro di miR i cui geni target possono, a loro volta, regolare la cascata di segnalazione intracellulare PI3K/AKT, ed in particolare indicano che ad una significativa diminuzione del livello di espressione di AKT può corrispondere un drammatico aumento di N/K-Ras, possibilmente mediato dal miR-145-5p.

a

| RT-qPCR | N/K-RAS |
|---|---|
| ShAKT1 | 1.10 |
| ShAKT2 | 12.24 |

b

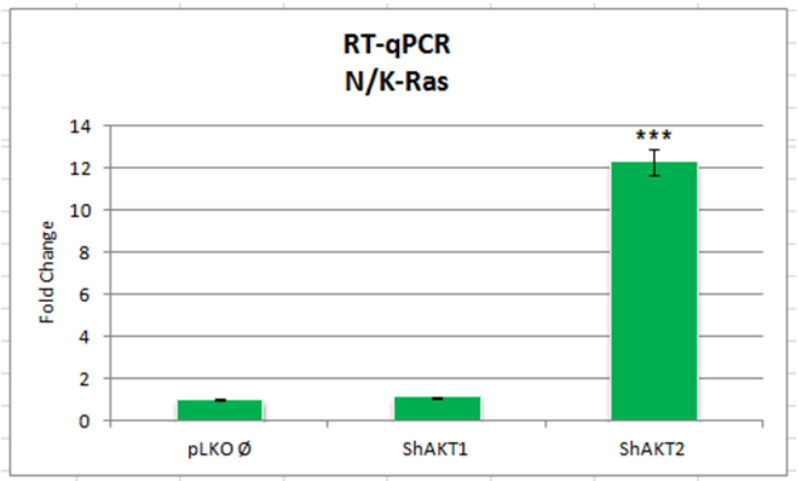


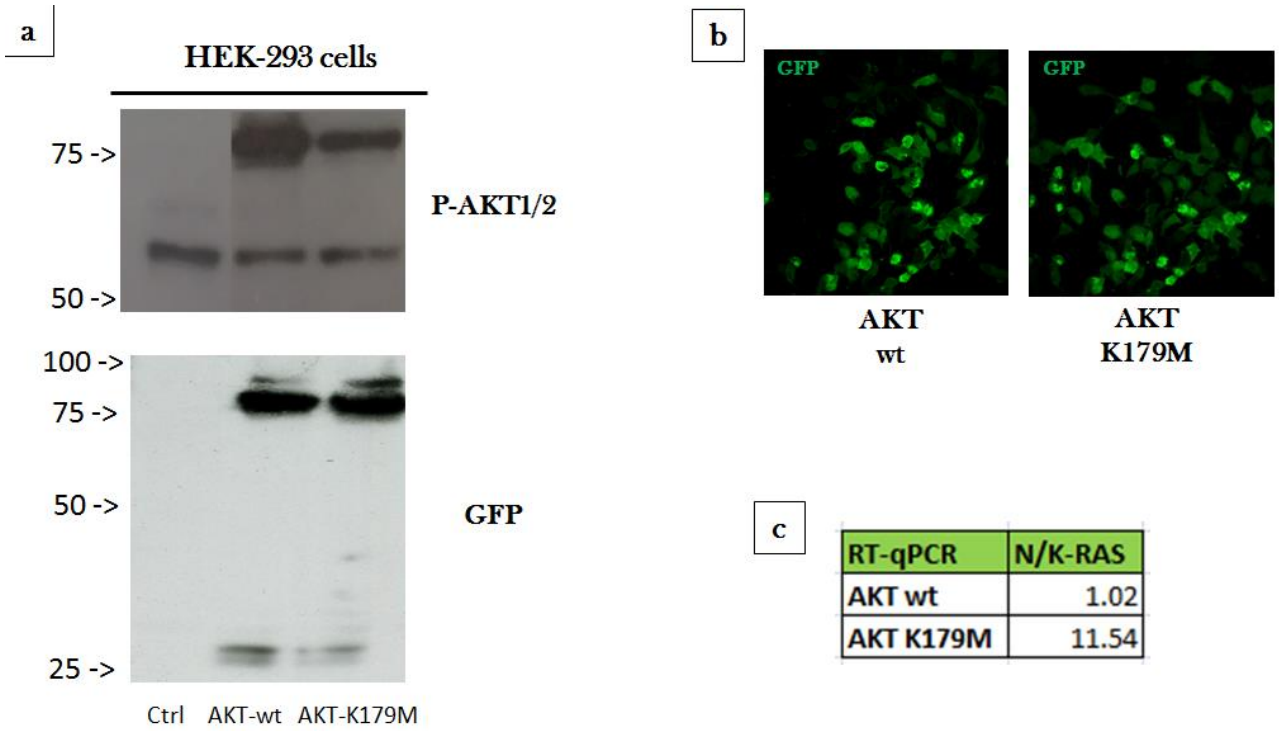

**Figura 4.6:** Il silenziamento di AKT2 aumenta l'espressione di Ras. I replicati sono normalizzati sul rispettivo controllo. La valenza statistica della riduzione dell'espressione è stata confermata mediante test t-Student, paragonando la media dell'espressione genica di un determinato set di replicati silenziati, rispetto alla media dei replicati del controllo (pLKO Ø). Il grafico (b) riporta la media dell'incremento del valore di espressione genica (a) dei replicati che compongono i due campioni silenziati, rispetto al controllo, che è stato posto = 1. Ras, ShAKT1 vs Ctrl: p-value > 0.05, non statisticamente significativo; Ras, ShAKT2 vs Ctrl: p-value = 0.001 ***

Una prima conferma di questa ipotesi è stata ottenuta con un approccio sperimentale semplificato, rappresentato da cellule HEK-293 trasfettate con AKT wt o con la forma kinase dead K179M, espressi come proteina di fusione con la green fluorescent protein (GFP). Una serie di vetrini seminati nella stessa piastra Petri sono stati fissati e utilizzati per valutare la percentuale di cellule trasfettate sulla popolazione totale tramite microscopia a fluorescenza. Il pellet ottenuto dalle restanti cellule è stato diviso in due. Una parte è stata utilizzata per monitorare l'espressione della proteina ectopica in Western blotting con un anticorpo anti-GFP tag, mentre l'altra parte è stata sottoposta ad estrazione di RNA e RT-qPCR per quantificare l'espressione di N/K-Ras. Come è possibile apprezzare dalla figura 4.7, le bande corrispondenti a GFP-AKT wt e K179M sono rivelate da anti-GFP (pannello "a") al peso atteso di circa 80 kDa solo nelle cellule trasfettate con il plasmide esprimente GFP-AKT, ma non in quelle trasfettate con vettore vuoto. L'incubazione con anti-AKT S473 rivela invece sia la proteina ectopica di 80 kDa che quella endogena di 60-62 kDa in tutti i campioni. Il pannello "b" mostra l'intensità della GFP nei diversi campioni, ottenuta al microscopio a fluorescenza, che conferma l'efficienza di trasfezione.

Il risultato della RT-qPCR mostra un aumento di circa 6 volte di Ras, rispetto al controllo non trasfettato, nelle cellule che esprimono la forma dominante negativa priva di attività chinasica di AKT. Al contrario, non si rilevano fluttuazioni nell'espressione del target nelle cellule esprimenti AKT wt (figura 4.7c). Il risultato

suggerisce quindi che anche l'inattivazione di AKT, e non solo il silenziamento, sia in grado di modulare l'espressione di Ras, rafforzando la nostra ipotesi.

Inoltre, suggerisce che la perturbazione dell'attività di AKT possa ripercuotersi sul livello intracellulare di Ras anche in contesti cellulari differenti dal modello epiteliale prostatico.




| RT-qPCR | N/K-RAS |
|---|---|
| AKT wt | 1.02 |
| AKT K179M | 11.54 |

**Figura 4.7:** L'espressione di un dominante negativo di AKT provoca un aumento dell'espressione di Ras. Cellule HEK-293 esprimenti GFP-AKT wt o K179M, sono state analizzate mediante Western-blotting (a) con anti p-AKT S473 e anti-GFP. (b) la fluorescenza del tag GFP conferma la trasfezione con efficienza simile nei due campioni, come osservato anche in Western blotting con anti-GFP. (c) espressione di Ras quantificata mediante RT-qPCR. Valori normalizzati sul controllo non trasfettato.

Nella fase successiva, la mia attenzione si è quindi concentrata sullo studio dell'effetto dell'inibizione farmacologica di AKT su Ras, e sul ruolo del miR-145-5p in questo meccanismo.

Dato che l'effetto sull'espressione di Ras sembra scatenato solo dal silenziamento di AKT2, abbiamo tentato di confermare o meno questa importante differenza tra le due isoforme con inibitori isoforma-specifici.

Per questo scopo, sono stati utilizzati l'AKT inhibitor VIII (da qui in poi denominato per brevità AKTi 1/2) e l'AKT inhibitor XII (da qui in poi AKTi XII), due diversi inibitori allosterici che inducono una modificazione della conformazione del PH domain bloccandolo nello stato inattivo "PH-in", che dovrebbero mostrare un certo grado di preferenza rispettivamente nei confronti di AKT1 e di AKT2 (Calleja et al., 2009; Zhao et al., 2007). Si tratta di molecole cell-permeant che esercitano un effetto sostanzialmente citostatico anche a tempi

lunghi di trattamento. Essendo inibitori allosterici, la fosforilazione degli epitopi S473 e T308 di AKT può essere utilizzata per monitorare l'effetto del trattamento. Tuttavia, come mostrato dal Western blot con anti-pS473 (Figura 4.8 b), alla concentrazione di 1μM per 1h di trattamento, necessaria per ottenere un calo di fosforilazione e quindi di attività di AKT nel nostro modello cellulare, sia AKTi 1/2 che AKTi XII sembrano bloccare entrambe le isoforme. Nonostante questo, l'analisi tramite RT-qPCR dei replicati degli stessi campioni mostra che l'aggiunta al medium di coltura di AKTi XII per 16h induce un aumento dell'espressione di Ras di circa 17 volte, mentre l'aggiunta di AKTi 1/2 provoca un aumento di solo 1.5 volte (tabella 4.8 a). Il risultato è estremamente incoraggiante perché indica che l'inibizione di AKT in cellule 293 è in grado di indurre l'espressione di Ras, anche se apparentemente in disaccordo con l'effetto dei due inibitori sulla fosforilazione di AKT a 1 h di trattamento. Questa discrepanza può essere dovuta all'aspecificità del riconoscimento anticorpale, ovvero alla capacità dell'anticorpo primario di legare entrambe le isoforme fosforilate di AKT: p-AKT1 S473 e p-AKT2 S474.

a

| RT-qPCR | N/K-RAS |
|---|---|
| HEK-293 cells + AKTi XII | 17.09 |
| HEK-293 cells + AKTi 1/2 | 1.47 |

b

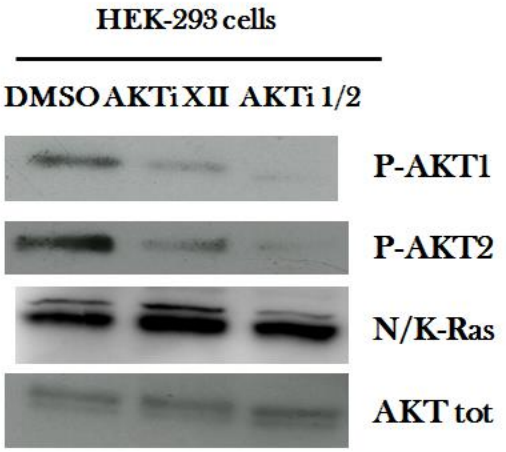


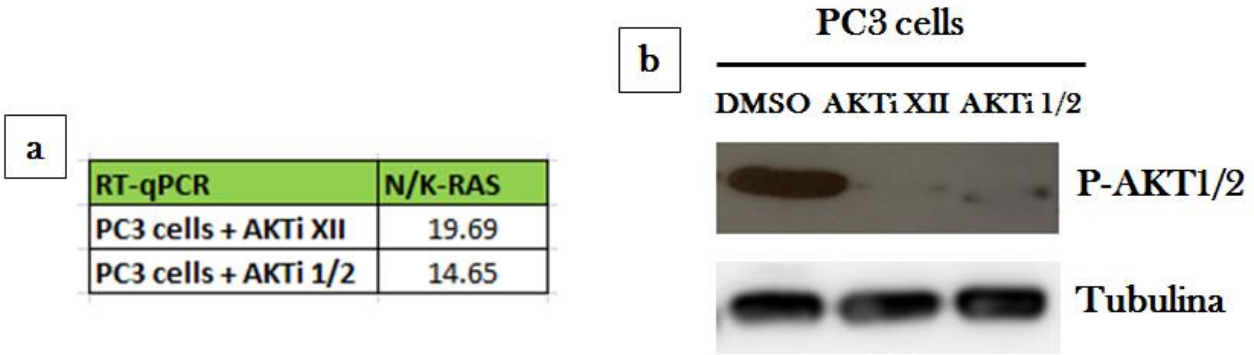

**Figura 4.8:** Effetto di AKTi XII e AKTi 1/2 sull'espressione di Ras in cellule HEK-293. Cellule HEK-293 sono state trattate con gli inibitori indicati alla concentrazione 1 μM, per 16 h o 1h rispettivamente per l'analisi dell'espressione di Ras mediante RT-qPCR, espressa come fold change rispetto al controllo non trattato (a), o della fosforilazione mediante Western-blotting dei corrispondenti lisati (b). Si osserva un leggero incremento di espressione di Ras in Western blotting già dopo 1 h di trattamento. AKT totale è stato rivelato con il rispettivo anticorpo per il controllo della carica proteica.

## 4.5 L'inibizione farmacologica di AKT induce un aumento dell'espressione di Ras nel modello di carcinoma prostatico PC3.

Per valutare se l'espressione di Ras viene modificata da inibizione farmacologica di AKT anche in cellule di adenocarcinoma prostatico, abbiamo utilizzato la linea PC3 per generare i seguenti campioni:

- PC3 trattate con DMSO vehicle;
- PC3 trattate con AKTi XII 1μM per 24 h;
- PC3 trattate con AKTi 1/2 1μM per 24 h.

Entrambi gli inibitori, a questa concentrazione, causano una forte inattivazione di AKT, rilevabile come calo della fosforilazione dell'epitopo S473 dopo 1 h di trattamento (figura 4.9 b). In accordo con i risultati descritti in precedenza, in cellule PC3 dopo 24 h di incubazione con il farmaco è osservabile un aumento di espressione di Ras quasi 20 volte superiore al controllo nel caso di AKTi XII, oltre ad un aumento di quasi 15 volte nel caso di AKTi 1/2 (figura 4.9 a), del tutto inaspettato e in disaccordo con il precedente esperiente dove AKTi 1/2 non aveva provocato la stessa risposta di AKTi XII. Va tuttavia osservato che non solo la linea cellulare, benché sempre epiteliale, è diversa, ma soprattutto in questo caso il trattamento è stato portato avanti non per 16 ma per 24 h. E' quindi possibile che anche l'AKTi 1/2 eserciti un'azione sul circuito miR-145-5p/Ras, ma che necessiti di un tempo più lungo.




| RT-qPCR | N/K-RAS |
|---|---|
| PC3 cells + AKTi XII | 19.69 |
| PC3 cells + AKTi 1/2 | 14.65 |

**Figura 4.9:** Effetto di AKTi XII e AKTi 1/2 sull'espressione di Ras in cellule PC3. Cellule PC3 sono state trattate con gli inibitori indicati per 24 h alla concentrazione 1μM. a) Analisi dell'espressione di Ras mediante RT-qPCR, espressa come fold change rispetto al controllo non trattato. b) Western-blotting dei lisati corrispondenti ai campioni in (a). La tubulina è stata rivelata con il rispettivo anticorpo per il controllo della carica proteica.

### 4.6 Analogamente all'inibizione e al silenziamento di AKT, anche il silenziamento transiente del miR-145-5p induce un aumento di espressione di Ras

Avendo stabilito con approcci differenti (silenziamento, espressione di un dominante negativo privo di attività chinasica e inattivazione farmacologica) e in diversi modelli cellulari l'esistenza di una correlazione tra l'attività di AKT e l'espressione di N/K-Ras, abbiamo voluto chiarire quale sia il ruolo del miR-145-5p in questo meccanismo. In collaborazione con la dr.ssa Alessandra Recchia, del Centro di Medicina Rigenerativa dell'Ateno di Modena e Reggio Emilia, è stato possibile ottenere un modello di cellule PC3 in cui l'espressione del miR-145-5p è silenziabile in modo transiente grazie alla presenza di un promotore inducibile. Abbiamo considerato il modello inducibile preferibile rispetto ad uno stabile per evitare l'instaurarsi di meccanismi cellulari di compensazione. Utilizzando il "TetOn3G expression system" (Brattsand et al., 2020), un inserto corrispondente alla sequenza short hairpin del miR-145-5p (PC3-ShmiR145) o ad una sequenza scramble (PC3-Sc) è stato subclonato nel vettore lentivirale pLKO sotto la regolazione di un promotore inducibile con doxiciclina.

Le cellule trasdotte e selezionate con dosi decrescenti di puromicina, come descritto nella sezione "Materiali e Metodi", denominate PC3-Sc e PC3-ShmiR145, sono quindi state trattate con doxiciclina 100 ng/ml o 1 μg/ml per 24 o 48 h per attivare il promotore (Brattsand et al., 2020). Il silenziamento del miR-145-5p con la dose di 1 μg/ml è completo già dopo 24 h e persiste anche a 48 h seppure con una leggera variazione, mentre al dosaggio più basso di 100 ng/ml il silenziamento completo è raggiunto solo dopo 48 h (figura 4.10). Abbiamo quindi optato per le 24 h di induzione con doxiciclina 1 μg/ml.

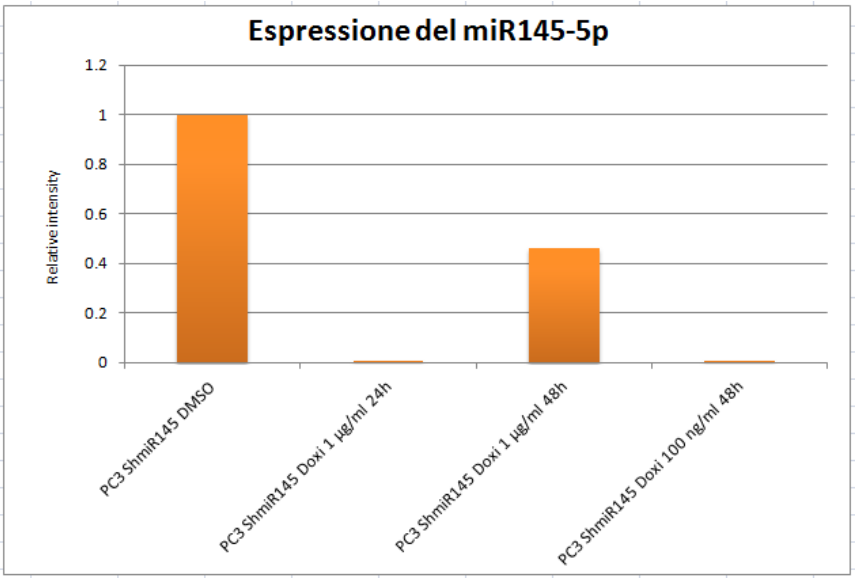



**Figura 4.10:** Induzione del silenziamento del miR-145-5p in PC3 tradotte con il sistema TetOn3G. Per trovare le condizioni ottimali di silenziamento, sono state utilizzate due concentrazioni di doxiciclina, 100 ng/ml o 1 µg/ml, per 24 o 48h. PC3- ShiR145 trattato solo con DMSO vehicle è posto per convenzione pari a 1.

Abbiamo poi verificato se in queste condizioni la downregolazione diretta del miR-145-5p sia sufficiente a modulare l'espressione di Ras in cellule PC3-Sc e PC3-ShmiR145 trattate con DMSO vehicle o con doxiciclina per 24 e 48 h. Alcune cellule sono state seminate su vetrino all'interno delle capsule Petri, per permettere di osservare le variazioni di Ras in immunfluorescenza, oltre che in Western blotting.

Come possibile osservare dalle immagini ottenute al microscopio a fluorescenza, la doxiciclina non provoca perturbazioni dell'espressione di Ras rispetto al controllo nelle cellule PC3-Sc (figura 4.11 a). Al contrario, il silenziamento del miR-145-5p favorisce un netto aumento di Ras rispetto al controllo (figura 4.11 b). Questo risultato rappresenta una prima conferma del meccanismo che pone il miR-145-5p a monte, con il ruolo di regolatore, e l'oncogene Ras a valle.

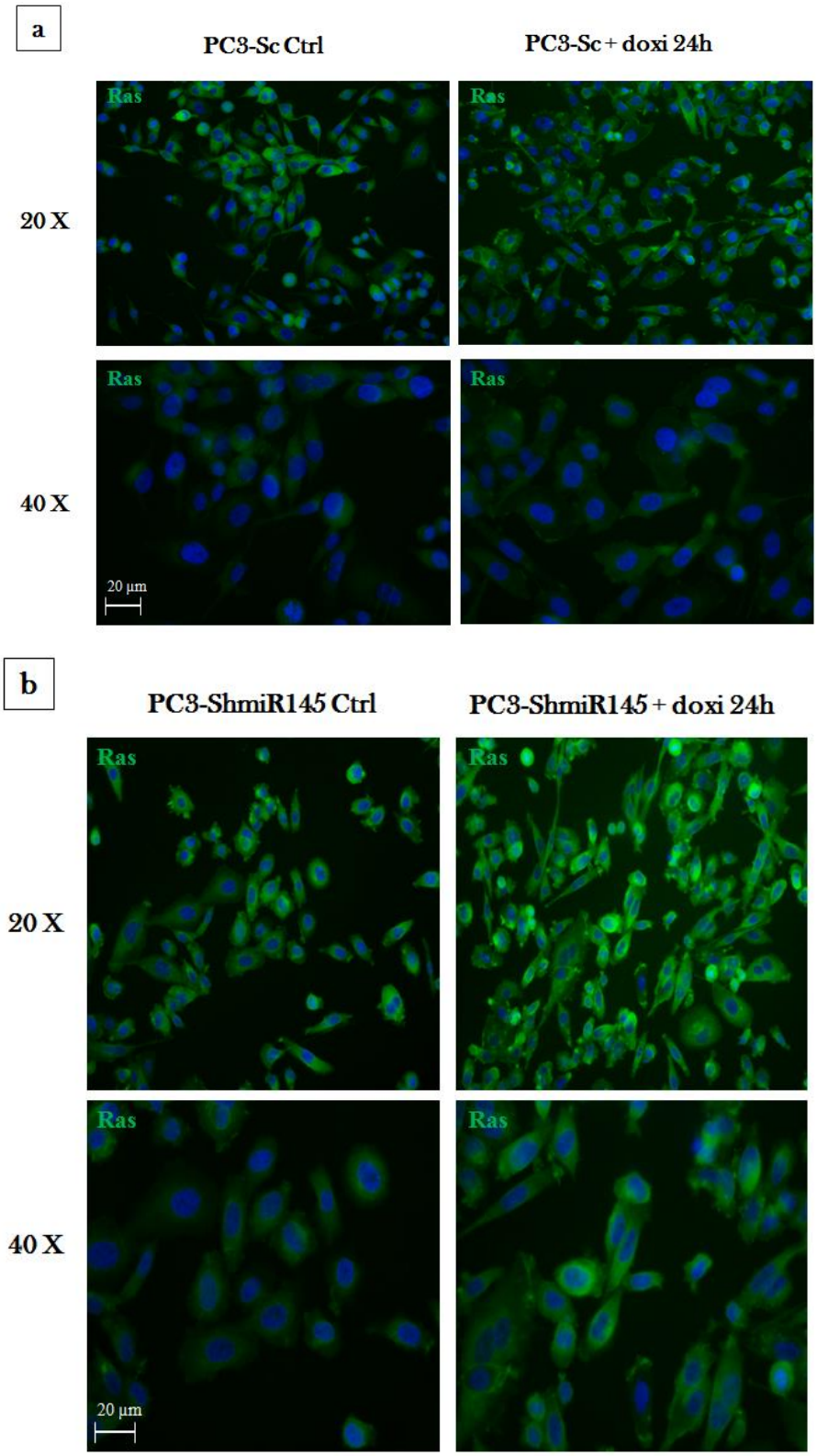



**Figura 4.11** Espressione della proteina Ras nel modello cellulare PC3 trasdotto con il sistema TetOn3G. a) Cellule trasdotte con il vettore PLKO scramble + DMSO (sinistra) o + doxiciclina 1 µg/ml per 24 h (destra). Come è possibile notare, non si verificano differenze significative nell'espressione di Ras prima e dopo l'induzione. b) PC3 trasdotte con il vettore PLKO shmiR145 + DMSO (sinistra) o + doxiciclina 1 µg/ml per 24 h (destra). In questo caso, il silenziamento del miR-145-5p, a seguito dell'induzione dello short-hairpin, provoca un importante aumento dell'espressione di Ras. Le immagini sono state ottenute a due diversi ingrandimenti, come riportato sulla sinistra dei pannelli. In verde (FITC) anti-Ras, in blu (DAPI) sono evidenziati i nuclei.

I lisati provenienti dallo stesso esperimento, in duplicato, sono stati rivelati con anti-Ras e anti-actina mediante Western blotting, e l'intensità delle bande è stata normalizzata sulla proteina housekeeping. A conferma del risultato precedente, non si è osservata una significativa variazione di Ras a seguito dell'induzione nelle cellule trasdotte con la sequenza scramble. Come ci aspettavamo, invece, è stato possibile apprezzare un chiaro aumento nei campioni PC3-ShmiR145 sia a 24 che 48 h di induzione (figura 4.12 a). In particolare, a 24 h si osserva un incremento di circa 1.7 volte rispetto al controllo (figura 4.12 b). Da notare che la diminuzione del contenuto di Ras a 48 h correla con il minore silenziamento osservato in figura 4.10. Possiamo concludere che il miR si colloca a monte di Ras in un possibile meccanismo di riattivazione di AKT attraverso il crosstalk fra queste due vie di sopravvivenza cellulare.

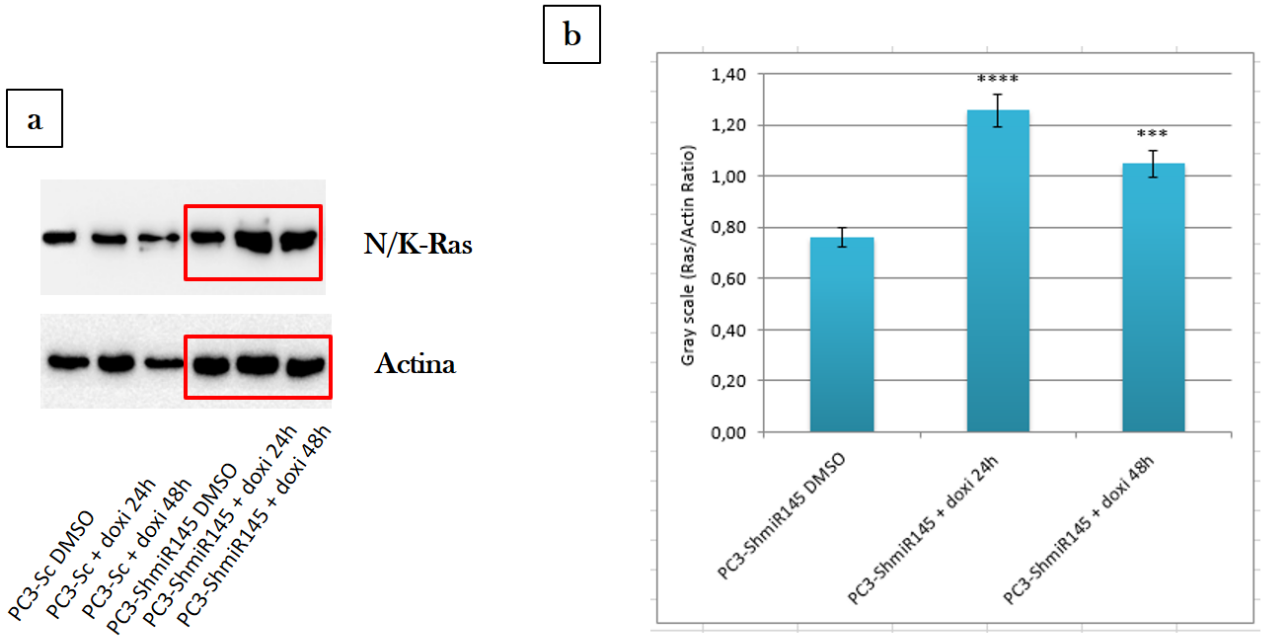



**Figura 4.12:** Espressione di Ras in PC3-Scramble e -ShmiR145 in seguito all'induzione con doxiciclina. a) I lisati sono stati rivelati con anti-Ras (MW = 21 kDa) e successivamente con anti-actina (MW = 42 kDa) per il controllo della carica proteica. b) Analisi densitometrica dell'intensità della banda di Ras nei e campioni ShmiR145 indotti e non con doxiciclina, corrispondenti al riquadro rosso in (a), normalizzata sulla rispettiva actina. L'induzione dello short-hairpin dopo 24 o 48 h di doxicliclina induce un significativo aumento dell'espressione di Ras.
P-value PC3-ShmiR145 DMSO vs doxi 24 h < 0.0001;
P-value PC3-ShmiR145 DMSO vs doxi 48 h = 0.0001).

### 4.7 L'incremento di Ras causato da inibizione cronica di AKT riattiva la segnalazione AKT-dipendente

Infine, per valutare lo stato di attivazione del meccanismo di segnalazione, a definitiva conferma dell'effetto rebound che l'inibizione di AKT può provocare attraverso il circuito miR-145-5p/Ras, abbiamo monitorato l'andamento della fosforilazione di AKT e del suo substrato diretto GSK3, sia a tempi sia brevi che lunghi di trattamento, tramite sia Western blotting (figura 4.13 a) e sia un array di fosfoproteine. Infatti, come già accennato in precedenza, essendo sia AKTi XII che AKTi 1/2 inibitori allosterici, questo è un buon parametro di valutazione indiretta dell'attività della chinasi. In buon accordo con quanto esposto nei paragrafi precedenti, il risultato mostra che un'ora di trattamento con AKTi 1/2 è sufficiente ad abbassare fortemente il livello di fosforilazione dell'epitopo S473 di AKT (figura 4.13, grafico RPPA). Tuttavia, l'attività/fosforilazione inizia a recuperare già dopo 4 h, per tornare ai livelli basali a 24 h, e perdura fino a 48 h (figura 4.13, grafico RPPA). Va infine notato che pur mantenendo fino a 48 h le cellule nello stesso medium di coltura in cui è stato aggiunto il farmaco, non si nota aumento di apoptosi, monitorata con anti-PARP. Questo risultato è compatibile con l'effetto citostatico, più che citotossico, di questi farmaci, in particolare alla concentrazione utilizzata (figura 4.13, grafico RPPA).

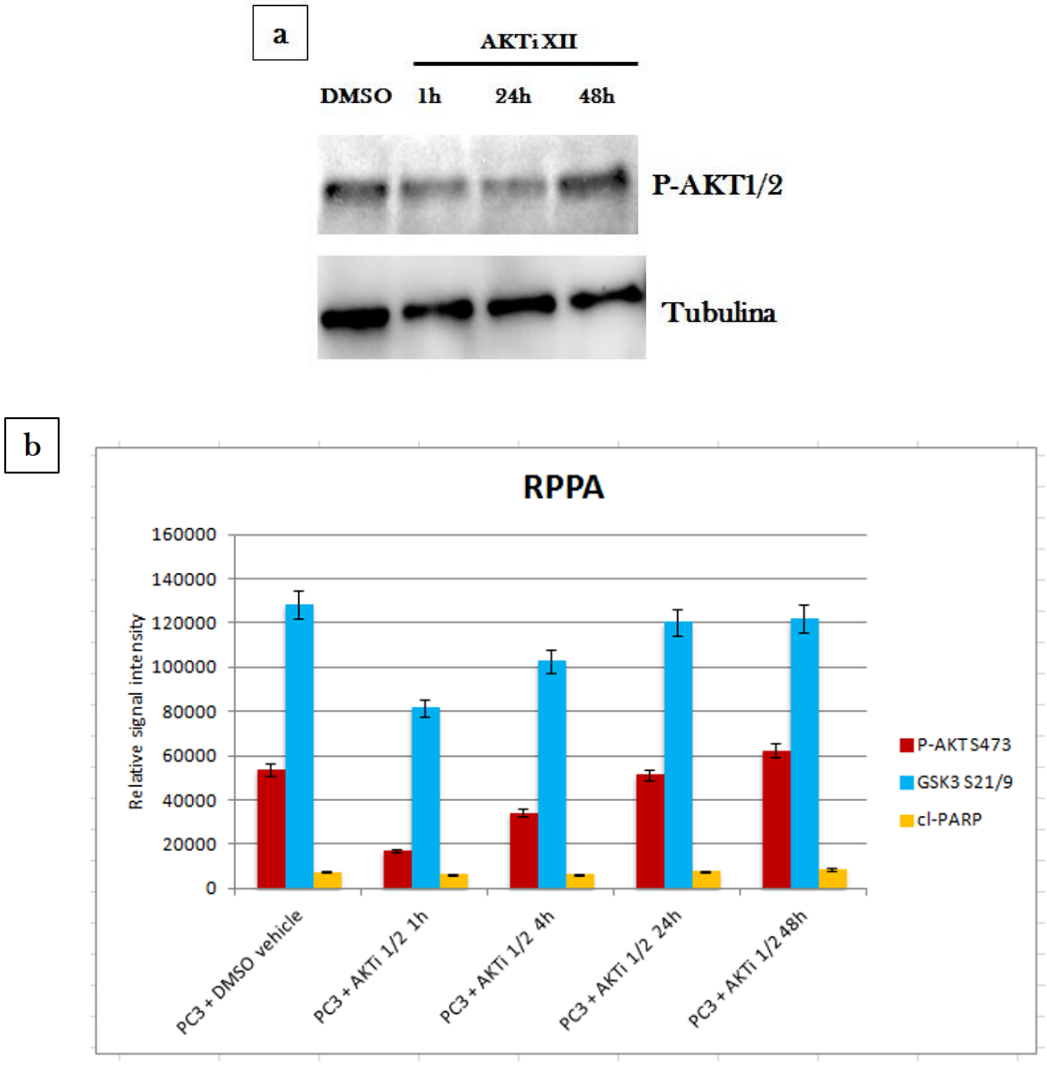



**Figura 4.13.** Il trattamento con AKTi XII è in grado di ridurre la fosforilazione di AKT solo in modo transiente. a) I lisati di cellule PC3 trattate con AKTi XII 1 µM per i tempi indicati sono stati analizzati tramite Western blotting e rivelati con anti-AKT pS473 e successivamente con anti-tubulina per il controllo della carica proteica. b) I lisati sono stati analizzati anche tramite RPPA con gli stessi anticorpi e con anti-GSK3 pS21/9 e anti-PARP. Quest'ultimo con lo scopo di verificare lo stato di salute delle cellule dopo 24 h di trattamento.

# CAPITOLO 5: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La resistenza alla terapia mirata del cancro è un fenomeno complesso e una sfida importante nel trattamento delle neoplasie. In molti tumori, sta diventando via via più evidente che una frequente causa di fallimento del trattamento e/o di recidiva del paziente è causata da una particolare forma di farmacoresistenza acquisita, nota come "resistenza adattativa" (Cremers et al., 2019). L'insorgenza di resistenza può dipendere dalla comparsa di mutazioni inducenti un guadagno di funzione del gene della proteina bersaglio, da meccanismi di adattamento, o da perturbazione dei feedback fisiologici, innescate dall'attivazione di vie di segnale parallele a quelle inibite farmacologicamente. Infatti, quantunque generalmente schematizzate come cascate lineari che passano l'informazione da un componente a quello successivo, è ormai chiaro che queste vie di segnale si ramificano continuamente e si intrecciano e dialogano tra loro in una rete estremamente dinamica e complessa, sottoposta a un continuo ricablaggio. Il risultato è spesso quello di produrre un effetto rebound che causa la riattivazione della pathway bersaglio del farmaco. Questo è senza dubbio vero per quanto riguarda gli approcci basati sulla terapia con inibitori di protein-chinasi della via di PI3K, dove i meccanismi di resistenza descritti sono prevalentemente di tipo adattativo, quindi non tanto legati ad insorgenza di mutazioni secondarie nei geni codificanti per le proteine bersaglio, quanto al crosstalk fra vie di sopravvivenza in grado di supplire la pathway bloccata, fino a provocare la riattivazione della segnalazione e sottrarsi così all'effetto terapeutico (Wu et al., 2021).

Nonostante la sua grande importanza clinica, la resistenza adattativa rimane poco compresa. Il nostro laboratorio ha descritto per la prima volta come nella leucemia mieloide acuta l'inibizione sia di AKT sia di PI3K/mTOR possa turbare l'asse AKT-FoxO e l'asse mTOR-p70-S6 chinasi, portando ad un'aumentata espressione di recettori per fattori di crescita a monte di PI3K, e quindi ad una riattivazione della stessa PI3K e dei suoi effettori (Bertacchini et al., 2014). Altri meccanismi sono stati descritti. Infatti, occorre considerare che sia l'attivazione fisiologica che quella oncogenica di questa cascata di segnali è sottoposta a meccanismi di regolazione a feedback tesi a contenere l'eccessiva attivazione, in particolare limitando la durata del segnale e l'attivazione di pathway parallele attraverso i regolatori negativi, quali PTEN. In tal senso, un'importante osservazione è stata riportata recentemente, che sottolinea ulteriormente l'importanza della dissezione dei meccanismi di resistenza adattativa per assicurare il successo della terapia. Infatti, è stato dimostrato che

l'inibizione farmacologica di questa cascata di segnale riduce l'espressione di PTEN, portando alla riattivazione della via di segnale nei tumori trattati con inibitori della via di PI3K, limitando ampiamente l'efficacia del trattamento (Mukherjee et al. 2021). Gli autori hanno mostrato che, in condizioni fisiologiche, PI3K regola l'espressione di PTEN a livello traduzionale attraverso l'asse mTOR/4E-BP1. In tal modo PI3K tampona eventuali oscillazioni della sua stessa attività. La regolazione traduzionale di PTEN è quindi un importante controllo omeostatico della segnalazione fisiologica di PI3K, e non solo. Infatti può intervenire per ridurre l'attivazione della via anche in cellule recanti mutanti oncogenici di PIK3CA. Di conseguenza, non sorprende che la via sia costitutivamente attivata quando nelle cellule tumorali coesistono mutazioni di PIK3CA e perdita di funzione di PTEN (Mukherjee et al. 2021).

Un'importante implicazione di queste osservazioni è che l'inibizione farmacologica di PI3K potrebbe ridurre i livelli di PTEN, in tal modo contrastando l'efficacia del trattamento. Ed infatti una drastica diminuzione dell'efficacia anti-tumorale degli inibitori di PI3K è stata descritta dagli stessi autori sia in vitro, in numerose linee cellulari, sia in vivo in un modello murino di carcinoma della mammella (Mukherjee et al. 2021).

In questo studio, è stato affrontato il problema della resistenza adattativa all'inibizione mirata di uno dei principali assi di segnalazione oncogenica frequentemente deregolati nel cancro alla prostata, cioè la via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR; i risultati ottenuti rivelano l'esistenza di un meccanismo di resistenza all'inibizione farmacologica di AKT, non descritto precedentemente, che prevede la riattivazione della via a causa dell'aumentata espressione dell'oncogene Ras sotto il controllo di un microRNA.

La crescita del tumore prostatico è, in fase iniziale, primariamente dipendente dagli androgeni; tuttavia, progredisce poi verso la fase di androgeno indipendenza, nota come carcinoma prostatico metastatico resistente alla castrazione, in cui manifesta resistenza alle terapie ormonali convenzionali, soprattutto a causa della deregolazione della via di segnale mediata da questi ormoni (Jenster et al., 1999). L'inibitore della sintesi degli androgeni abiraterone acetato, combinato con la terapia di deprivazione androgenica, si è dimostrato altamente efficace nel migliorare i risultati nei pazienti trattati (Wei et al., 2017). Tuttavia, circa il 20% dei pazienti progredisce verso la malattia resistente alla castrazione entro 12 mesi, e le ulteriori opzioni di trattamento sono molto limitate, perciò questi pazienti hanno una sopravvivenza più breve.

L'attivazione aberrante della via PI3K/AKT è comune nel cancro alla prostata, specialmente nella malattia in stadio avanzato, principalmente a causa della perdita di PTEN verificata nel 40-60% dei pazienti. La

segnalazione del recettore degli androgeni e la via AKT sono reciprocamente regolati in modo incrociato, tale che l'inibizione di uno porti alla sovraregolazione dell'altro. Pertanto, l'inibizione combinata dell'abiraterone e di AKT può essere utile nei pazienti che hanno deficit di PTEN o attivazione aberrante del via di PI3K. In studi preclinici, il capivasertib, un inibitore pan di AKT somministrabile per via orale, blocca la proliferazione di modelli di carcinoma prostatico sensibile agli ormoni e resistente alla castrazione con perdita di PTEN. Pertanto, esiste una finestra terapeutica per la inibizione contemporanea delle vie di AR e PI3K in questi pazienti. I risultati dello studio di fase I (NCT04087174) hanno confermato la dose accettabile di capivasertib in combinazione con abiraterone. Inoltre, studi di fase II/III (NCT03072238) hanno recentemente dimostrato che un altro inibitore orale di AKT, ipatasertib, prolunga la sopravvivenza del carcinoma prostatico metastatico resistente alla castrazione quando combinato con abiraterone rispetto a placebo più abiraterone, in particolare tra i pazienti con perdita di PTEN. Infine, è in corso di reclutamento di pazienti uno studio multicentrico di fase III (NCT04493853) per valutare l'efficacia della combinazione di capivasertib con abiraterone (+ prednisone/prednisolone), in pazienti con carcinoma prostatico metastatico con delezione di PTEN.

Quindi, benché da un punto di vista clinico gli inibitori di AKT o di altre proteine chiave della stessa cascata come monoterapia non abbiano prodotto finora i risultati desiderati, le stesse molecole utilizzate in combinazione mostrano un'efficacia terapeutica molto promettente.

In questo scenario, è fondamentale ottenere un quadro il più possibile completo dei meccanismi molecolari che si possono instaurare in seguito al trattamento cronico con tali molecole, e che possono favorire l'adattabilità delle cellule cancerose e di conseguenza la resistenza.

Partendo dalla nostra iniziale osservazione, ovvero che in cellule tumorali prostatiche PC3 il silenziamento di AKT può modulare l'espressione di numerosi miR, alcuni dei quali legati a vie di sopravvivenza e/o proliferazione cellulare, ci siamo concentrati sul miR-145-5p, noto per il suo ruolo di tumor-suppressor (Das et al., 2015; Mohit et al., 2010). L'espressione di miR-145-5p risultava fortemente downmodulata dal silenziamento di AKT. Inoltre, importanti effettori o regolatori della stessa via di PI3K entrano nella costellazione dei geni target del miR-145-5p, tra cui l'oncogene H/K-Ras.

La segnalazione intracellulare a valle di Ras è strettamente controllata attraverso una serie di meccanismi post-trascrizionali che sono spesso alterati in condizioni patologiche, producendo stati metabolici che stimolano la crescita, la migrazione, la sopravvivenza, la metastasi e la plasticità del cancro (Gimple et al., 2019; Abida et al.,

2019; Pearson et al., 2020). Nonostante il targeting farmacologico di Ras sia stato perseguito intensamente per decenni con ben poco successo, recentemente sono emerse nuove strategie che sembrano avere grande potenziale di efficacia terapeutica (Sheridan et al., 2020; Conroy et al., 2021; Molina-Arcas et al., 2021). Pertanto, la comprensione della complessa biologia di Ras può tradursi in terapie migliori per i pazienti con tumori aggressivi guidati da quest'ultimo. Questo oncogene svolge un ruolo importante nell'attivazione della rete di PI3K/AKT, promuovendo l'attività trascrizionale pro-oncogenica attraverso NF-κB, l'evasione dell'apoptosi attraverso l'inibizione dell'enzima pro-sopravvivenza BAD e la crescita cellulare attraverso l'attivazione di mTOR.

Pertanto, Ras ci è subito sembrato un bersaglio estremamente interessante. E a maggior ragione, dopo la constatazione che l'espressione della maggior parte degli altri target non è risultata drammaticamente modulata in seguito alla diminuzione dei livelli del miR-145-5p, a fronte invece di un forte aumento di espressione di Ras. Questo risultato di per sé importante ha acquistato ulteriore rilievo in seguito alla conferma che anche l'inibizione farmacologica di AKT, e non solo il suo silenziamento, producevano lo stesso effetto, permettendoci di ipotizzare un nuovo meccanismo di resistenza adattativa. Poiché la letteratura suggerisce che AKT possa essere sia regolatore che bersaglio del miR-145-5p (Sha et al., 2017; Xia et al., 2015), abbiamo poi verificato che il silenziamento diretto di questo miR porta allo stesso aumento di espressione di Ras ottenuto in seguito a silenziamento/inattivazione di AKT. Infine, abbiamo appurato che agli alti livelli di Ras corrisponde un rapido recupero della fosforilazione/attivazione di AKT, indicando quindi l'esistenza di un circuito miR-145-5p/Ras in grado di riattivare l'asse PI3K/AKT.

Dal punto di vista meccanicistico, nel modello in vitro di cellule di carcinoma prostatico PC3 utilizzato per questo studio, l'inibizione di AKT provoca l'abbassamento fino quasi a scomparsa del contenuto intracellulare di miR-145-5p che, a sua volta, causa un forte aumento di espressione di Ras e a cascata la riattivazione della via di PI3K (figura 5.1).

E' possibile che, a seguito dell'inibizione di AKT, vengano meno i meccanismi regolatori bidirezionali fra la chinasi e il miR, causando una downregolazione di quest'ultimo. Ras, posizionato a valle del miR, è in grado di sollevare la pressione inibitoria del farmaco su AKT. Oltre a identificare un meccanismo di resistenza adattativa nel carcinoma prostatico non precedentemente documentato, quindi, questo studio sottolinea la necessità di caratterizzare in modo approfondito il ruolo dei miR nel cancro.

Sono inoltre attualmente in corso esperimenti di stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC), allo scopo di confermare questi risultati e identificare altri bersagli modulati dal circuito miR-145-5p-Ras in risposta al blocco farmacologico della via di segnale PI3K/AKT e al successivo ricablaggio.
Oltre a ciò, per concludere questo studio sarà fondamentale valutare anche l'effetto dell'aumento di espressione di Ras sulla via di segnale guidata da MAPK/ERK (Sheridan, 2020; Conroy et al., 2021).

E' infine opportuno sottolineare che anche se da un lato evidenze crescenti suggeriscono che la riattivazione delle vie di segnalazione inizialmente inibite causi resistenza ai farmaci perturbando i meccanismi di feedback, dall'altro un'analisi della topologia delle reti di segnalazione intracellulare nella risposta al trattamento farmacologico dimostrerebbe che i circuiti di feedback da soli non porterebbero ad una riattivazione permanente dei meccanismi di segnalazione (Boris et al., 2021; Kholodenko et al., 2021). Secondo questi studi, infatti, anche farmaci inibitori di nuova generazione sembrerebbero provocare il superamento solo parziale dei livelli fisiologici del meccanismo di segnalazione bersagliato. La riattivazione completa si verificherebbe solo quando almeno due vie, una attivante e una inibitoria, collegano una proteina a monte, inibita dal farmaco, ad un'uscita a valle. Solo così, e indipendentemente dalla topologia della rete, il farmaco potrebbe ripristinare o addirittura aumentare paradossalmente l'attività della segnalazione a valle (Kholodenko et al., 2021).
Va poi considerato che se da un lato nel loro insieme tutti i processi descritti conferiscono alle cellule tumorali la plasticità necessaria per la sopravvivenza in condizioni dinamiche, dall'altro essi creano anche vulnerabilità che possono essere oggetto di terapie mirate. Solo una più profonda comprensione della biologia di PI3K/AKT e delle vie di segnale che mantengono i circuiti di sopravvivenza e proliferazione fornirà una visione globale che potrà contribuire a migliorare l'approccio terapeutico e servire da modello per la comprensione delle alterazioni di ulteriori meccanismi che guidano il cancro.

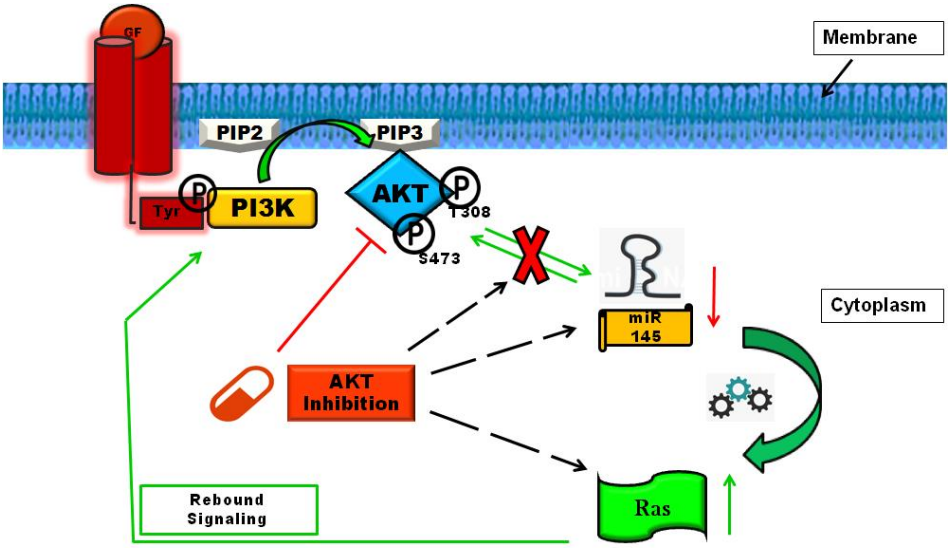



**Figura 5.1** Rappresentazione schematica dell'ipotesi perseguita in questo studio. L'inibizione di AKT provoca un forte calo dell'espressione di miR-145-5p che, a sua volta, aumenta la quantità di Ras nella cellula, producendo così a cascata la riattivazione della via di PI3K.

# BIBLIOGRAFIA


1. Abida, W., Cyrta, J., Heller, G., Prandi, D., Armenia, J., Coleman, I., Sawyers, C. L. et al. (2019). Genomic correlates of clinical outcome in advanced prostate cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences, 116(23), 11428-11436.
2. Aggarwal RR, Feng FY, Small EJ. Emerging Categories of Disease in Advanced Prostate Cancer and Their Therapeutic Implications. Oncology (Williston Park). 2017 Jun 15;31(6):467-74. PMID: 28620903.
3. Alberts Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. Molecular biology of the cell, 6th edition. New York: Garland Science, 2016
4. Albertsen, P. C., J. A. Hanley, D. F. Gleason, e M. J. Barry. «Competing Risk Analysis of Men Aged 55 to 74 Years at Diagnosis Managed Conservatively for Clinically Localized Prostate Cancer». JAMA 280, n. 11 (1998): 975–80. https://doi.org/10.1001/jama.280.11.975.
5. Alessi DR1, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase FEBS Lett. 1996; 399(3):333-8.
6. Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, e B. A. Hemmings. «Mechanism of Activation of Protein Kinase B by Insulin and IGF-1». The EMBO Journal 15, n. 23 (1996): 6541–51.
7. Al-Kafaji, Ghada, et al. "Decreased expression of circulating microRNA-126 in patients with type 2 diabetic nephropathy: a potential blood-based biomarker." Experimental and therapeutic medicine 12.2 (2016): 815-822.
8. Amir, S., Ma, A. H., Shi, X. B., Xue, L., Kung, H. J., & deVere White, R. W. (2013). Oncomir miR-125b suppresses p14ARF to modulate p53-dependent and p53-independent apoptosis in prostate cancer. PloS one, 8(4), e61064.
9. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. Nat Rev Cancer. 2013;13:11–26.
10. Angelo R. Bianco, Sabino De Placido, Giampaolo Tortora. Core curriculum. Oncologia clinica. Mc-Graw-Hill libri, April 2011. Antiangiogenic therapy. Science 2002;295:1526–8.
11. Armstrong AJ, Halabi S, Healy P, Alumkal JJ, Winters C, Kephart J, Bitting RL, Hobbs C, Soleau CF, Beer TM, Slottke R, Mundy K, Yu EY, George DJ. Phase II trial of the PI3 kinase inhibitor buparlisib (BKM-120) with or without enzalutamide in men with metastatic castration resistant prostate cancer. Eur J Cancer. 2017; 81:228-236.
12. Armstrong AJ, Healy P, Halabi S, Vollmer R, Lark A, Kemeny G, Ware K, Freedland SJ. Evaluation of an epithelial plasticity biomarker panel in men with localized prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2016; 19:40- 45.
13. Auger, K. R., Chang, H. W., Aoki, M., Fruman, D., Bellacosa, A., Tsichlis, P. N., ... & Vogt, P. K. (1997). Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI 3-kinase. Science, 276(5320), 1848-1850.
14. Barbieri, Christopher E., Sylvan C. Baca, Michael S. Lawrence, Francesca Demichelis, Mirjam Blattner, Jean-Philippe Theurillat, Thomas A. White, et al. «Exome Sequencing Identifies Recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 Mutations in Prostate Cancer». Nature Genetics 44, n. 6 (2012): 685–89. https://doi.org/10.1038/ng.2279.
15. Bedolla, Roble, et al. "Determining risk of biochemical recurrence in prostate cancer by immunohistochemical detection of PTEN expression and Akt activation." Clinical cancer research 13.13 (2007): 3860-3867.

16. Benhamou D, Labi V, Getahun A, et al. The c-Myc/miR17-92/PTEN Axis Tunes PI3K Activity to Control Expression of Recombination Activating Genes in Early B Cell Development. Front Immunol. 2018;9:2715. Published 2018 Nov 22. doi:10.3389/fimmu.2018.02715
17. Bertacchini J, Beretti F, Cenni V, Guida M, Gibellini F, Mediani L, Marin O, Maraldi NM, de Pol A, Lattanzi G, Cocco L, Marmiroli S. The protein kinase Akt/PKB regulates both prelamin A degradation and Lmna gene expression. FASEB J. 2013; 27(6):2145-55.
18. Bertacchini J, Guida M, Accordi B, et al. Feedbacks and adaptive capabilities of the PI3K/Akt/mTOR axis in acute myeloid leukemia revealed by pathway selective inhibition and phosphoproteome analysis. Leukemia. 2014; 28(11):2197–2205.
19. Bertacchini J, Mediani L, Beretti F, Guida M, Ghalali A, Brugnoli F, Bertagnolo V, Petricoin E, Poti F, Arioli J, Anselmi L, Bari A, McCubrey J, Martelli AM, Cocco L, Capitani S, Marmiroli S. Clusterin enhances AKT2-mediated motility of normal and cancer prostate cells through a PTEN and PHLPP1 circuit. J Cell Physiol. 2019;234(7):11188-11199.
20. Betz, C., & Hall, M. N. (2013). Where is mTOR and what is it doing there? Journal of Cell Biology, 203(4), 563-574.
21. Bhatia-Gaur, R., A. A. Donjacour, P. J. Sciavolino, M. Kim, N. Desai, P. Young, C. R. Norton, et al. «Roles for Nkx3.1 in Prostate Development and Cancer». Genes & Development 13, n. 8 (1999): 966–77. https://doi.org/10.1101/gad.13.8.966.
22. Bisson I, Prowse DM. WNT signaling regulates self-renewal and differentiation of prostate cancer cells with stem cell characteristics. Cell Res. 2009; 19:683-697.
23. Bitting RL, Armstrong AJ. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in castration-resistant prostate cancer. Endocr Relat Cancer. 2013;20(3):R83-99.
24. Bono, Johann Sebastian de, Stephane Oudard, Mustafa Ozguroglu, Steinbjørn Hansen, Jean-Pascal Machiels, Ivo Kocak, Gwenaëlle Gravis, et al. «Prednisone plus Cabazitaxel or Mitoxantrone for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Progressing after Docetaxel Treatment: A Randomised Open-Label Trial». The Lancet 376, n. 9747 (2010): 1147–54. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61389-X.
25. Boris N. Kholodenko, Nora Rauch, Walter Kolch, Oleksii S. Rukhlenko, A systematic analysis of signaling reactivation and drug resistance, Cell Reports, Volume 35, Issue 8, 2021.
26. Boris N. Kholodenko, Nora Rauch, Walter Kolch, Oleksii S. Rukhlenko, A systematic analysis of signaling reactivation and drug resistance, Cell Reports, 35, 8, 2021
27. Bozulic, L., Surucu, B., Hynx, D. & Hemmings, B. A. PKBα/Akt1 Acts Downstream of DNA-PK in the DNA Double-Strand Break Response and Promotes Survival. Mol. Cell 30, 203–213 2008
28. Braglia L, Zavatti M, Vinceti M, Martelli AM, Marmiroli S. Deregulated PTEN/PI3K/AKT/mTOR signaling in prostate cancer: Still a potential druggable target? Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2020 Sep;1867(9):118731. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118731. Epub 2020 Apr 29. PMID: 32360668.
29. Brattsand, M. (2020). Doxycycline at Low Concentrations Could Influence Your Experimental Results When Working With Prostate Cancer Cell Lines. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research, 28(2), 21515-21519.
30. Brawer, Michael K, Georg Bartsch, Jonathan L Epstein, L. Michael Glodé, e Wael A. Sakr. «Assays for Complexed Prostate-Specific Antigen and Other Advances in the Diagnosis of Prostate Cancer». Reviews in Urology 5, n. Suppl 6 (2003): S10–16.

31. Brawley, C. D. et al. (2018). Systemic Therapy for Advanced or Metastatic Prostate cancer: Evaluation of Drug Efficacy (STAMPEDE) investigators. Radiotherapy to the primary tumour for newly diagnosed, metastatic prostate cancer (STAMPEDE): a randomised controlled phase 3 trial. Lancet, 392, 2353-66.
32. Brognard, John, et al. "PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms." Molecular cell 25.6 (2007): 917-931.
33. Bullrich, Florencia, et al. "Characterization of the 13q14 tumor suppressor locus in CLL: identification of ALT1, an alternative splice variant of the LEU2 gene." Cancer research 61.18 (2001): 6640-6648.
34. Bunney, T. D., & Katan, M. (2010). Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN. Nature Reviews Cancer, 10(5), 342-352.
35. Bhutani J, Sheikh A, Niazi AK. Akt inhibitors: mechanism of action and implications for anticancer therapeutics. Infect Agent Cancer. 2013 Dec 13;8(1):49. doi: 10.1186/1750-9378-8-49.
36. Butler, Dominika E., et al. "Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway activates autophagy and compensatory Ras/Raf/MEK/ERK signalling in prostate cancer." Oncotarget 8.34 (2017): 56698.
37. Cairns, P., K. Okami, S. Halachmi, N. Halachmi, M. Esteller, J. G. Herman, J. Jen, W. B. Isaacs, G. S. Bova, e D. Sidransky. «Frequent Inactivation of PTEN/MMAC1 in Primary Prostate Cancer». Cancer Research 57, n. 22 (1997): 4997–5000.
38. Cairns, Paul, et al. Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. Cancer research, 1997, 57.22: 4997-5000.
39. Calin et al. "MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer." Cancer research 65.16 (2005): 7065-7070.
40. Calin, George Adrian, et al. "Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." Proceedings of the national academy of sciences 99.24 (2002): 15524-15529.
41. Calleja, V., Laguerre, M., & Larijani, B. (2012). Role of the C-terminal regulatory domain in the allosteric inhibition of PKB/Akt. Advances in biological regulation, 52(1), 46-57.
42. Calleja, V.; Laguerre, M.; Parker, P.J.; Larijani, B. Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: Structural mechanism for allosteric inhibition. PLoS Biol. 2009, 7, e17
43. Cannistraci, Alessio, et al. "MicroRNA as new tools for prostate cancer risk assessment and therapeutic intervention: results from clinical data set and patients' samples." BioMed research international 2014 (2014).
44. Carnero, A. (2010). The PKB/AKT pathway in cancer. Current pharmaceutical design, 16(1), 34-44.
45. Carr, Theresa D., et al. "Conditional disruption of rictor demonstrates a direct requirement for mTORC2 in skin tumor development and continued growth of established tumors." Carcinogenesis 36.4 (2015): 487-497.
46. Carracedo A, Alimonti A, Pandolfi PP. PTEN level in tumor suppression: how much is too little? Cancer Res. 2011; 71(3):629-33.
47. Carver BS, Chapinski C, Wongvipat J, Hieronymus H, Chen Y, Chandarlapaty S, Arora VK, Le C, Koutcher J, Scher H, Scardino PT, Rosen N, Sawyers CL. Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer. Cancer Cell. 2011;19(5):575-86.
48. Cenni V, Bavelloni A, Beretti F, Tagliavini F, Manzoli L, Lattanzi G, Maraldi NM, Cocco L, Marmiroli S. Ankrd2/ARPP is a novel Akt2 specific substrate and regulates myogenic differentiation upon cellular exposure to H(2)O(2). Mol Biol Cell. 2011;22(16):2946-56.

49. Cenni V, Bertacchini J, Beretti F, Lattanzi G, Bavelloni A, Riccio M, Ruzzene M, Marin O, Arrigoni G, Parnaik V, Wehnert M, Maraldi NM, de Pol A, Cocco L, Marmiroli S. Lamin A Ser404 is a nuclear target of Akt phosphorylation in C2C12 cells. J Proteome Res. 2008; 7(11):4727-35.
50. Cenni, Vittoria, Jessika Bertacchini, Francesca Beretti, Giovanna Lattanzi, Alberto Bavelloni, Massimo Riccio, Maria Ruzzene, et al. «Lamin A Ser404 Is a Nuclear Target of Akt Phosphorylation in C2C12 Cells». *Journal of Proteome Research* 7, n. 11 (7 november 2008): 4727–35. https://doi.org/10.1021/pr800262g.
51. Cesaro L, Pinna LA. Prevalence and significance of the commonest phosphorylated motifs in the human proteome: a global analysis. Cell Mol Life Sci. 2020 Feb 12. doi: 10.1007/s00018-020-03474-2.
52. Chandarlapaty S. Negative feedback and adaptive resistance to the targeted therapy of cancer. Cancer Discov. 2012;2(4):311–319
53. Chang et al. "The microRNA (miRNA): overview of the RNA genes that modulate gene function." Molecular biotechnology 38.3 (2008): 257-268.
54. Chang L, Graham PH, Hao J, Ni J, Bucci J, Cozzi PJ, Kearsley JH, Li Y. Acquisition of epithelial–mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance. Cell Death Dis. 2013; 4:e875.35389
55. Chee KG, Longmate J, Quinn DI, Chatta G, Pinski J, Twardowski P, Pan CX, Cambio A, Evans CP, Gandara DR, Lara PN Jr. The AKT inhibitor perifosine in biochemically recurrent prostate cancer: a phase II California/Pittsburgh cancer consortium trial. Clin Genitourin Cancer. 2007.
56. Chen M, Pratt CP, Zeeman ME, et al. Identification of PHLPP1 as a tumor suppressor reveals the role of feedback activation in PTEN-mutant prostate cancer progression. Cancer Cell. 2011;20 (2):173–186.
57. Chen, Kuen-Feng, et al. "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 337.1 (2011): 155-161.
58. Chin, Arnold I., Dhiren S. Dave, e Jacob Rajfer. «Is Repeat Biopsy for Isolated High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia Necessary?» *Reviews in Urology* 9, n. 3 (2007): 124–31.
59. Cho KH, Choi MJ, Jeong KJ, Kim JJ, Hwang MH, Shin SC, Park CG, Lee HY. A ROS/STAT3/HIF-1α signaling cascade mediates EGF-induced TWIST1 expression and prostate cancer cell invasion. Prostate. 2014; 74:528-536.
60. Cimmino, Amelia, et al. "Erratum: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (September 27, 2005) 102, 39 (13944-13949." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103.7 (2006): 2464.
61. Ciuffreda L, Di Sanza C, Cesta Incani U, Eramo A, Desideri M, Biagioni F, Passeri D, Falcone I, Sette G, Bergamo P, Anichini A, Sabapathy K, McCubrey JA, Ricciardi MR, Tafuri A, Blandino G, Orlandi A, De Maria R, Cognetti F, Del Bufalo D, Milella M. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade controls phosphatase and tensin homolog (PTEN) expression through multiple mechanisms. J Mol Med (Berl). 2012; 90(6):667-79.
62. Ciuffreda, Ludovica, et al. "The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade controls phosphatase and tensin homolog (PTEN) expression through multiple mechanisms." Journal of molecular medicine 90.6 (2012): 667-679.
63. Clark, Abbe R., e Alex Toker. «Signalling Specificity in the Akt Pathway in Breast Cancer». *Biochemical Society Transactions* 42, n. 5 (2014): 1349–55. https://doi.org/10.1042/BST20140160.

64. Clevers H, Batlle E. EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer. Cancer Res. 2006; 66(1):2-5.
65. Clevers H, Nusse R. Wnt/β-catenin signaling and disease. Cell. 2012;149:1192–1205.
66. Conroy M, Cowzer D, Kolch W, Duffy AG. Emerging RAS-directed therapies for cancer. Cancer Drug Resist 2021;4:543-58. http://dx.doi.org/10.20517/cdr.2021.07
67. Cremers CG, Nguyen LK. Network rewiring, adaptive resistance and combating strategies in breast cancer. Cancer Drug Resist 2019;2:1106-26. http://dx.doi.org/10.20517/cdr.2019.60
68. Croce C, Petrocca F, Vecchione A, "Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor β signaling." Cancer research 68.20 (2008): 8191-8194.
69. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature. 1995; 378(6559):785-9.
70. Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, Pearl LH. Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. Cell. 2001; 105(6):721-32.
71. Damber, Jan-Erik, e Gunnar Aus. «Prostate Cancer». *Lancet (London, England)* 371, n. 9625 (17 maggio 2008): 1710–21. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60729-1.
72. Das, A.V., Pillai, R.M. Implications of miR cluster 143/145 as universal anti-oncomiRs and their dysregulation during tumorigenesis. *Cancer Cell Int* 15, 92 (2015). https://doi.org/10.1186/s12935-015-0247-4
73. Das, Atze, Liliane Tenenbaum, and Ben Berkhout. "Tet-on systems for doxycycline-inducible gene expression." Current gene therapy 16.3 (2016): 156-167.
74. De Bono JS, De Giorgi U, Rodrigues DN, Massard C, Bracarda S, Font A, Arranz Arija JA, Shih KC, Radavoi GD, Xu N, Chan WY, Ma H, Gendreau S, Riisnaes R, Patel PH, Maslyar DJ, Jinga V. Randomized Phase II Study Evaluating Akt Blockade with Ipatasertib, in Combination with Abiraterone, in Patients with Metastatic Prostate Cancer with and without PTEN Loss. Clin Cancer Res. 2019; 25(3):928-936.
75. De Marzo, Angelo M., Theodore L. DeWeese, Elizabeth A. Platz, Alan K. Meeker, Masashi Nakayama, Jonathan I. Epstein, William B. Isaacs, e William G. Nelson. «Pathological and Molecular Mechanisms of Prostate Carcinogenesis: Implications for Diagnosis, Detection, Prevention, and Treatment». Journal of Cellular Biochemistry 91, n. 3 (2004): 459–77. https://doi.org/10.1002/jcb.10747.
76. De Robertis, Mariangela, et al. "Current understanding and clinical utility of miRNAs regulation of colon cancer stem cells." Seminars in Cancer Biology. Vol. 53. Academic Press, 2018.
77. DeFeo-Jones, Deborah, et al. "Tumor cell sensitization to apoptotic stimuli by selective inhibition of specific Akt/PKB family members." Molecular cancer therapeutics 4.2 (2005): 271-279.
78. Desai, Leena P., et al. "Mechanical stimuli and IL-13 interact at integrin adhesion complexes to regulate expression of smooth muscle myosin heavy chain in airway smooth muscle tissue." American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 301.3 (2011): L275-L284.
79. Dey N, Crosswell HE, De P, Parsons R, Peng Q, Su JD, Durden DL. The protein phosphatase activity of PTEN regulates SRC family kinases and controls glioma migration. Cancer Res. 2008; 68(6):1862-71.
80. Dhanasekaran, S. M., T. R. Barrette, D. Ghosh, R. Shah, S. Varambally, K. Kurachi, K. J. Pienta, M. A. Rubin, e A. M. Chinnaiyan. «Delineation of Prognostic Biomarkers in Prostate Cancer». *Nature* 412, n. 6849 (23 agosto 2001): 822–26. https://doi.org/10.1038/35090585.

81. Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. Nat Genet. 1998; 19(4):348-55.
82. Dibble, Christian C., John M. Asara, and Brendan D. Manning. "Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1." Molecular and cellular biology 29.21 (2009): 5657-5670.
83. Diederichs, S., & Haber, D. A. (2007). Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. Cell, 131(6), 1097-1108.
84. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. J Cell Sci. 2003;116:1175–1186.
85. Dong, J. T., P. W. Lamb, C. W. Rinker-Schaeffer, J. Vukanovic, T. Ichikawa, J. T. Isaacs, e J. C. Barrett. «KAI1, a Metastasis Suppressor Gene for Prostate Cancer on Human Chromosome 11p11.2». Science (New York, N.Y.) 268, n. 5212 (1995): 884–86. https://doi.org/10.1126/science.7754374.
86. Drayton, R. M., Dudziec, E., Peter, S., Bertz, S., Hartmann, A., Bryant, H. E., & Catto, J. W. (2014). Reduced expression of miRNA-27a modulates cisplatin resistance in bladder cancer by targeting the cystine/glutamate exchanger SLC7A11. Clinical cancer research, 20(7), 1990-2000.
87. Dual PI3 K/mTOR inhibition reduces prostate cancer bone engraftment altering tumor-induced bone remodeling. Mancini A, Colapietro A, Pompili S, Del Fattore A, Delle Monache S, Biordi LA, Angelucci A, Mattei V, Liang C, Gravina GL, Festuccia C. Tumour Biol. 2018; 40 (4):1010.
88. Dubrovska A, Kim S, Salamone RJ, Walker JR, Maira SM, García-Echeverría C, Schultz PG, Reddy VA. The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. Proc Natl Acad Sci USA. 2009; 106:268-273.
89. Ebner M, Lučić I, Leonard TA, Yudushkin I. PI(3,4,5)P(3) Engagement Restricts Akt Activity to Cellular Membranes. Mol Cell. 2017; 65(3):416-431.e6.
90. Ebner, Michael, Benjamin Sinkovics, Magdalena Szczygieł, Daniela Wolfschoon Ribeiro, e Ivan Yudushkin. «Localization of MTORC2 Activity inside Cells». The Journal of Cell Biology 216, n. 2 (2017): 343–53. https://doi.org/10.1083/jcb.201610060.
91. Ellwood-Yen, Katharine, Thomas G. Graeber, John Wongvipat, M. Luisa Iruela-Arispe, JianFeng Zhang, Robert Matusik, George V. Thomas, e Charles L. Sawyers. «Myc-Driven Murine Prostate Cancer Shares Molecular Features with Human Prostate Tumors». *Cancer Cell* 4, n. 3 (2003): 223–38. https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00197-1.
92. Elvire Pons-Tostivint, Benoît Thibault, and Julie Guillermet-Guibert. Targeting PI3K Signaling in Combination Cancer Therapy. Trends in Cancer. Volume 3, ISSUE 6, P454-469 2017.
93. Epstein, Jonathan I. «An Update of the Gleason Grading System». *The Journal of Urology* 183, n. 2 (febbraio 2010): 433–40. https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.10.046.
94. Escriva M, Peiro S, Herranz N, Villagrasa P, Dave N, Montserrat-Sentis B, et al. Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis. Mol Cell Biol 2008 28(5):1528.
95. Evangelisti C, Chiarini F, Paganelli F, Marmiroli S, Martelli AM. Crosstalks of GSK3 signaling with the mTOR network and effects on targeted therapy of cancer. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2020;1867(4):118635.
96. Fabbri, Muller, et al. "MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B." Proceedings of the National Academy of Sciences 104.40 (2007): 15805-15810.

97. Facchinetti V, Ouyang W, Wei H, Soto N, Lazorchak A, Gould C, Lowry C, Newton AC, Mao Y, Miao RQ, Sessa WC, Qin J, Zhang P, Su B, Jacinto E. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. EMBO J. 27, 1932–1943 (2008).
98. Facchinetti, Valeria, Weiming Ouyang, Hua Wei, Nelyn Soto, Adam Lazorchak, Christine Gould, Carolyn Lowry, et al. «The Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 Controls Folding and Stability of Akt and Protein Kinase C». *The EMBO Journal* 27, n. 14 (2008): 1932–43. https://doi.org/10.1038/emboj.2008.120.
99. Feng Q, He B. Androgen Receptor Signaling in the Development of Castration-Resistant Prostate Cancer. Front Oncol. 2019;9:858.
100. Ferron, Mathieu, et al. "Inositol polyphosphate 4-phosphatase B as a regulator of bone mass in mice and humans." Cell metabolism 14.4 (2011): 466-477.
101. Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. Biochem J. 2001; 359(Pt 1):1-16.
102. Fu, L. W. et al. (2009). Reversal of P-gp-mediated multidrug resistance by Bromotetrandrine in vivo is associated with enhanced accumulation of chemotherapeutical drug in tumor tissue. Anticancer research, 29(11), 4597-4604.
103. Gao P, Xing AY, Zhou GY, Zhang TG, Zhang JP, Gao C, Li H, Shi DB. The molecular mechanism of microRNA-145 to suppress invasion-metastasis cascade in gastric cancer. Oncogene. 2013; 32:491-501.
104. Gao, Tianyan, Frank Furnari, and Alexandra C. Newton. "PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth." Molecular cell 18.1 (2005): 13-24.
105. Garrett JT, Sutton CR, Kuba MG, Cook RS, Arteaga CL. Dual blockade of HER2 in HER2-overexpressing tumor cells does not completely eliminate HER3 function. Clin Cancer Res. 2013; 19(3):610-9.
106. Garzon, R., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2009). MicroRNAs in cancer. Annual review of medicine, 60, 167-179.
107. Gewinner, Christina, et al. "Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling." Cancer cell 16.2 (2009): 115-125.
108. Gillessen, Silke, et al. "Repurposing metformin as therapy for prostate cancer within the STAMPEDE trial platform." European urology 70.6 (2016): 906-908.
109. Gimple RC, Wang X. RAS: Striking at the Core of the Oncogenic Circuitry. Front Oncol. 2019 Sep 24;9:965. doi: 10.3389/fonc.2019.00965. PMID: 31681559; PMCID: PMC6798062
110. Gonçalves BF, de Campos SGP, Fávaro WJ, Brandt JZ, Pinho CF, Justulin LA, Taboga SR, Scarano WR. Combinatorial Effect of Abiraterone Acetate and NVP-BEZ235 on Prostate Tumor Progression in Rats. Horm Cancer. 2018; 9(3):175-187.
111. Gottesman et al. (2002). Functional characterization of coding polymorphisms in the humanmdr1 gene using a vaccinia virus expression system. Molecular pharmacology, 62(1), 1-6.
112. Gottesman, M. M. et al. (2020). Reversing the direction of drug transport mediated by the human multidrug transporter P-glycoprotein. Proceedings of the National Academy of Sciences, 117(47), 29609-29617.
113. Graham, Nibbs, Robert et al. "Cloning and characterization of a novel murine β chemokine receptor, D6: comparison to three other related macrophage inflammatory protein-1α receptors, CCR-1, CCR-3, and CCR-5." Journal of Biological Chemistry 272.19 (1997): 12495-12504.

114. Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. Clin Cancer Res. 2007; 13:7003-7011.
115. Grisanzio, Chiara, e Sabina Signoretti. «P63 in Prostate Biology and Pathology». *Journal of Cellular Biochemistry* 103, n. 5 (1 aprile 2008): 1354–68. https://doi.org/10.1002/jcb.21555.
116. Gu L, Vogiatzi P, Puhr M, Dagvadorj A, Lutz J, Ryder A, Addya S, Fortina P, Cooper C, Leiby B, Dasgupta A, Hyslop T, Bubendorf L, et al. Stat5 promotes metastatic behavior of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. Endocr Relat Cancer. 2010; 17:481-493.
117. Guertin DA, Stevens DM, Saitoh M, Kinkel S, Crosby K, Sheen JH, Mullholland DJ, Magnuson MA, Wu H, Sabatini DM. mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice. Cancer Cell. 2009; 15(2):148-59
118. Gulen MF, Bulek K, Xiao H, Yu M, Gao J, Sun L, Beurel E, Kaidanovich-Beilin O, Fox PL, DiCorleto PE, Wang JA, Qin J, Wald DN, Woodgett JR, Jope RS, Carman J, Dongre A, Li X. Inactivation of the enzyme GSK3α by the kinase IKKi promotes AKT-mTOR signaling pathway that mediates interleukin-1-induced Th17 cell maintenance. Immunity. 2012;37(5):800-12
119. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell 2011;144:646–74.
120. Harnden, Patricia, Mike D. Shelley, Bernadette Coles, John Staffurth, e Malcom D. Mason. «Should the Gleason Grading System for Prostate Cancer Be Modified to Account for High-Grade Tertiary Components? A Systematic Review and Meta-Analysis». The Lancet. Oncology 8, n. 5 (2007): 411–19. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70136-5.
121. Hata, A., & Lieberman, J. (2015). Dysregulation of microRNA biogenesis and gene silencing in cancer. Science signaling, 8(368), re3-re3.
122. Hill R, Wu H. PTEN, stem cells, and cancer stem cells. J Biol Chem. 2009; 284:11755-9.
123. Hillmann P, Fabbro D. PI3K/mTOR Pathway Inhibition: Opportunities in Oncology and Rare Genetic Diseases. Int J Mol Sci. 2019;20(22). pii: E5792.
124. Hoxhaj, G., Manning, B.D. The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. Nat Rev Cancer 2020; 20:74–88.
125. Hsieh C. H., Cheng L. H., Hsu H. H., et al. Apicidin-resistant HA22T hepatocellular carcinoma cells strongly activated the Wnt/β-catenin signaling pathway and MMP-2 expression via the IGF-IR/PI3K/Akt signaling pathway enhancing cell metastatic effect. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2013;77(12):2397–2404
126. Hsieh IS, Chang KC, Tsai YT, Ke JY, Lu PJ, Lee KH, Yeh SD, Hong TM, Chen YL. MicroRNA-320 suppresses the stem cell-like characteristics of prostate cancer cells by downregulating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. Carcinogenesis. 2013; 34:530-538.
127. Hsing, Ann W., Anand P. Chokkalingam, Yu-Tang Gao, M. Patricia Madigan, Jie Deng, Gloria Gridley, e Joseph F. Fraumeni. «Allium Vegetables and Risk of Prostate Cancer: A Population-Based Study». *Journal of the* National Cancer Institute 94, n. 21 (2002): 1648–51. https://doi.org/10.1093/jnci/94.21.1648.
128. Hu B, Shi D, Lv X, Wu F, Chen S, Shao Z. Prognostic and clinicopathological significance of DEPTOR expression in cancer patients: a meta-analysis. Onco Targets Ther. 2018;11:5083-5092. Published 2018 Aug 22. doi:10.2147/OTT.S167355
129. Huang S, Guo W, Tang Y, Ren D, Zou X, Peng X. miR- 143 and miR-145 inhibit stem cell characteristics of PC-3 prostate cancer cells. Oncol Rep. 2012; 28:1831-1837.

130. Huggins, Charles, R. E. Stevens, and Clarence V. Hodges. "Studies on prostatic cancer: II. The effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland." Archives of surgery 43.2 (1941): 209-223.

131. Humphrey, P. A. «Diagnosis of Adenocarcinoma in Prostate Needle Biopsy Tissue». *Journal of Clinical Pathology* 60, n. 1 (gennaio 2007): 35–42. https://doi.org/10.1136/jcp.2005.036442.

132. Huusko, Pia, Damaris Ponciano-Jackson, Maija Wolf, Jeff A. Kiefer, David O. Azorsa, Sukru Tuzmen, Don Weaver, et al. «Nonsense-Mediated Decay Microarray Analysis Identifies Mutations of EPHB2 in Human Prostate Cancer». *Nature Genetics* 36, n. 9 (settembre 2004): 979–83. https://doi.org/10.1038/ng1408.

133. Hwang, H. W., and J. T. Mendell. "MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis." British journal of cancer 96 (2007): R40-4.

134. Ilic D, Djulbegovic M, Jung JH, Hwang EC, Zhou Q, Cleves A, Agoritsas T, Dahm P. Prostate cancer screening with prostate-specific antigen (PSA) test: a systematic review and meta-analysis. BMJ. 2018 Sep 5;362:k3519. doi: 10.1136/bmj.k3519. PMID: 30185521; PMCID: PMC6283370.

135. Iorio, Marilena V., et al. "MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer." Cancer research 65.16 (2005): 7065-7070.

136. Jack Mydlo, Ciril Godec. Prostate Cancer - Science and Clinical Practice, 2nd Edition. Academic Press, September 2015.

137. Jalava, S. (2012). The role of 8q amplification and microRNAs in prostate cancer.

138. Jamieson C., Sharma M., Henderson B. R. Targeting the β-catenin nuclear transport pathway in cancer. Seminars in Cancer Biology. 2014;27:20–29

139. Jarrard, David F., et al. "Alterations in the p16/pRb cell cycle checkpoint occur commonly in primary and metastatic human prostate cancer." Cancer letters 185.2 (2002): 191-199.

140. Jenkins, R. B., J. Qian, M. M. Lieber, e D. G. Bostwick. «Detection of C-Myc Oncogene Amplification and Chromosomal Anomalies in Metastatic Prostatic Carcinoma by Fluorescence in Situ Hybridization». *Cancer Research* 57, n. 3 (1 febbraio 1997): 524–31.

141. Jenster G. The role of the androgen receptor in the development and progression of prostate cancer. Semin Oncol. 1999 Aug;26(4):407-21

142. Jia L, Yu W, Wang P, Sanders BG, Kline K. In vivo and in vitro studies of anticancer actions of alpha-TEA for human prostate cancer cells. Prostate. 2008;68(8):849-60.

143. Jiang YG, Luo Y, He DL, Li X, Zhang LL, Peng T, Li MC, Lin YH. Role of Wnt/beta-catenin signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer induced by hypoxia-inducible factor-1alpha. Int J Urol. 2007; 14:1034-1039.

144. Jo, Mi Jeong, Byeng Wha Son, and Gun-Do Kim. "Induced Apoptosis in HeLa Human Cervical Adenocarcinoma by the Extract of the Marine Algae Symbiotic Fungus Chaetomium sp." (2011): 302-310.

145. Jung HY, Yang J. Unraveling the TWIST between EMT and cancer stemness. Cell Stem Cell. 2015; 16:1-2.

146. Kao CJ, Martiniez A, Shi XB, Yang J, Evans CP, Dobi A, deVere White RW, Kung HJ. miR-30 as a tumor suppressor connects EGF/Src signal to ERG and EMT. Oncogene. 2014; 33:2495-2503.

147. Karaayvaz M, Pal T, Song B, Zhang C, Georgakopoulos P, Mehmood S, et al. Prognostic Significance

148. Karhadkar, Sunil S., G. Steven Bova, Nadia Abdallah, Surajit Dhara, Dale Gardner, Anirban Maitra, John T. Isaacs, David M. Berman, e Philip A. Beachy. «Hedgehog Signalling in Prostate Regeneration, Neoplasia and Metastasis». *Nature* 431, n. 7009 (7 ottobre 2004): 707–12. https://doi.org/10.1038/nature02962.

149. Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. Cell 2007;129:465–72.

150. Kent, O. A., K. Fox-Talbot, and M. K. Halushka. "RREB1 repressed miR-143/145 modulates KRAS signaling through downregulation of multiple targets." Oncogene 32.20 (2013): 2576-2585.

151. Kholodenko et al., A systematic analysis of signaling reactivation and drug resistance. Cell rep. 2021.

152. Kim, Nam Hee, et al. "A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial–mesenchymal transition." Journal of Cell Biology 195.3 (2011): 417-433.

153. King JC, Xu J, Wongvipat J, Hieronymus H, Carver BS, Leung DH, Taylor BS, Sander C, Cardiff RD, Couto SS, Gerald WL, Sawyers CL. Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. Nat Genet. 2009; 41:524-526.

154. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. Nat Rev Cancer. 2008; 8(5):387-98.

155. Kofuji S, Kimura H, Nakanishi H, Nanjo H, Takasuga S, Liu H, Eguchi S, Nakamura R, Itoh R, Ueno N, Asanuma K, Huang M, Koizumi A, Habuchi T, Yamazaki M, Suzuki A, Sasaki J, Sasaki T. INPP4B Is a PtdIns(3,4,5)P3 Phosphatase That Can Act as a Tumor Suppressor. Cancer Discov. 2015;5(7):730-9.

156. Kojima S, Goto Y, Naya Y. The roles of microRNAs in the progression of castration-resistant prostate cancer. J Hum Genet. 2017; 62:25-31.2012;7:e35440.

157. Kokal, Miriam, et al. "Mechanisms of androgen receptor agonist-and antagonist-mediated cellular senescence in prostate cancer." Cancers 12.7 (2020): 1833.

158. Kolinsky MP, Rescigno P, Bianchini D, Zafeiriou Z, Mehra N, Mateo J, Michalarea V, Riisnaes R, Crespo M, Figueiredo I, Miranda S, Nava Rodrigues D, Flohr P, Tunariu N, Banerji U, Ruddle R, Sharp A, Welti J, Lambros M, Carreira S, Raynaud FI, Swales KE, Plymate S, Luo J, Tovey H, Porta N, Slade R, Leonard L, Hall E, de Bono JS. A phase I dose-escalation study of enzalutamide in combination with the AKT inhibitor AZD5363 (capivasertib) in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. Ann Oncol. 2020;pii: S0923-7534(20)36037-3.

159. Kuo, Yi-Chun, et al. "Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55α regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt." Journal of Biological Chemistry 283.4 (2008): 1882-1892.

160. Kwabi-Addo B, Giri D, Schmidt K, Podsypanina K, Parsons R, Greenberg N, Ittmann M. Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(20):11563-8.

161. Larue, L et al. (2007). Activation of NF-κB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. Oncogene, 26(53), 7445-7456.

162. Le Chang et al. "miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology." Nucleic Acids Research 48. W1 (2020): W244-W251.

163. Lee, S. K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J. et al (2003). RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Nature medicine, 9(3), 347-351.

164. Lee, Wen-Hsiang, Pearl A Campbell, e William G Nelson. «Cytidine Methylation of Regulatory Sequences near the A-Class Glutathione S-Transferase Gene Accompanies Human Prostatic Carcinogenesis». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 5.

165. Leshem O, Madar S, Kogan-Sakin I, Kamer I, Goldstein I, Brosh R, Cohen Y, Jacob-Hirsch J, Ehrlich M, Ben-Sasson S, Goldfinger N, Loewenthal R, Gazit E, et al. TMPRSS2/ ERG Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition through the ZEB1/ZEB2 Axis in a Prostate Cancer Model. PLoS One. 2011; 6:e21650.

166. Li P, Yang R, Gao WQ. Contributions of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells to the development of castration resistance of prostate cancer. Mol Cancer. 2014; 13:55.

167. Li, Yiwei, and Fazlul H. Sarkar. "Inhibition of nuclear factor κB activation in PC3 cells by genistein is mediated via Akt signaling pathway." Clinical cancer research 8.7 (2002): 2369-2377.

168. Lilja, Hans, David Ulmert, e Andrew J. Vickers. «Prostate-Specific Antigen and Prostate Cancer: Prediction, Detection and Monitoring». *Nature Reviews. Cancer* 8, n. 4 (aprile 2008): 268–78. https://doi.org/10.1038/nrc2351.

169. Lin HK, Hu YC, Lee DK, Chang C. Regulation of androgen receptor signaling by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) tumor suppressor through distinct mechanisms in prostate cancer cells. Mol Endocrinol. 2004;18(10):2409–2423

170. Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, Patrawala L, Yan H, Jeter C, Honorio S, Wiggins JF, Bader AG, Fagin R, et al. Identification of miR-34a as a potent inhibitor of prostate cancer progenitor cells and metastasis by directly repressing CD44. Nat Med. 2011; 17:211-215.

171. Liu P, Begley M, Michowski W, Inuzuka H, Ginzberg M, Gao D, Tsou P, Gan W, Papa A, Kim BM, Wan L, Singh A, Zhai B, Yuan M, Wang Z, Gygi SP, Lee TH, Lu KP, Toker A, Pandolfi PP, Asara JM, Kirschner MW, Sicinski P, Cantley L, Wei W. Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. Nature. 2014; 508(7497):541-5.

172. Londono-Vallejo, Rajabi, Fatemeh, et al. "CPEB1 orchestrates a fine-tuning of miR-145-5p tumor-suppressive activity on TWIST1 translation in prostate cancer cells." Oncotarget 11.45 (2020): 4155.

173. Lopez, Rebecca, et al. "Hyperglycemia enhances the proliferation of non-tumorigenic and malignant mammary epithelial cells through increased leptin/IGF1R signaling and activation of AKT/mTOR." PloS one 8.11 (2013): e79708.

174. Lopez-Bergami P, Huang C, Goydos JS, Yip D, Bar-Eli M, Herlyn M, et al. Rewired ERK-JNK signaling pathways in melanoma. Cancer Cell 2007;11(5):447–60.

175. Lujambio, Amaia, et al. "Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells." Cancer research 67.4 (2007): 1424-1429.

176. Luo Y, Cui X, Zhao J, Han Y, Li M, Lin Y, Jiang Y, Lan L. Cells susceptible to epithelial-mesenchymal transition are enriched in stem-like side population cells from prostate cancer. Oncol Rep. 2014; 31:874-884.

177. Lynch JT, Polanska UM, Hancox U, Delpuech O, Maynard J, Trigwell C, Eberlein C, Lenaghan C, Polanski R, Avivar-Valderas A, Cumberbatch M, Klinowska T, Critchlow SE, Cruzalegui F, Barry ST. Combined Inhibition of PI3Kβ and mTOR Inhibits Growth of PTEN-null Tumors. Mol Cancer Ther. 2018;17(11):2309-2319.

178. Maehama T, Dixon JE, PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase, Trends in Cell Biology, Volume 9, Issue 4, 1999, Pages 125-128, ISSN 0962-8924.

179. Mahadevan D, Powis G, Mash EA, et al. Discovery of a novel class of AKT pleckstrin homology domain inhibitors. Mol Cancer Ther. 2008;7(9):2621–2632

180. Maira SM, Pecchi S, Huang A, Burger M, Knapp M, Sterker D, Schnell C, Guthy D, Nagel T, Wiesmann M, Brachmann S, Fritsch C, Dorsch M, Chène P, Shoemaker K, De Pover A, Menezes D, Martiny-Baron G, Fabbro D, Wilson CJ, Schlegel R, Hofmann F, García-Echeverría C, Sellers WR, Voliva CF. Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. Mol Cancer Ther. 2012;11(2):317-28.

181. Majumder PK, Yeh JJ, George DJ, Febbo PG, Kum J, Xue Q, Bikoff R, Ma H, Kantoff PW, Golub TR, Loda M, Sellers WR. Prostate intraepithelial neoplasia induced by prostate restricted Akt activation: the MPAKT model. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:7841-6.
182. Malik SN, Brattain M, Ghosh PM, Troyer DA, Prihoda T, Bedolla R, Kreisberg JI. Immunohistochemical demonstration of phospho-Akt in high Gleason grade prostate cancer. Clin Cancer Res. 2002;8(4):1168-71.
183. Mancinelli R, Carpino G, Petrungaro S, Mammola CL, Tomaipitinca L, Filippini A, Facchiano A, Ziparo E, Giampietri C. Multifaceted Roles of GSK-3 in Cancer and Autophagy-Related Diseases. Oxid Med Cell Longev. 2017; 2017:4629495.
184. Manin M, Baron S, Goossens K, Beaudoin C, Jean C, Veyssiere G, Verhoeven G, Morel L. Androgen receptor expression is regulated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in normal and tumoral epithelial cells. Biochem J. 2002; 366(Pt 3):729-36.
185. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. Cell. 2007;129(7):1261-74.
186. Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. Mol Cell. 2002;10:151–162
187. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. Cell. 2017;169(3):381-405.
188. Manning, Brendan D., e Alex Toker. «AKT/PKB Signaling: Navigating the Network». *Cell* 169, n. 3 (20 aprile 2017): 381–405. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001.
189. Manning, Brendan D., e Lewis C. Cantley. «AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream». *Cell* 129, n. 7 (29 giugno 2007): 1261–74. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009.
190. Marmiroli, S., Maraldi, T., Bertacchini, J., Benincasa, M., Guida, M., De Pol, A., Liotta, L. A et al. (2011). Reverse-phase protein microarrays (RPPA) as a diagnostic and therapeutic guide in multidrug resistant leukemia. International journal of oncology, 38(2), 427-435.
191. Martin, E. C., Rhodes, L. V., Segar, H. C., Miller, D. F., Buechlein, A., Rusch, D. B., Collins-Burow, B. M. (2015). Dual regulation by microRNA-200b-3p and microRNA-200b-5p in the inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer. Oncotarget, 6(18), 16638.
192. Martini M, Ciraolo E, Gulluni F, Hirsch E. Targeting PI3K in Cancer: Any Good News? Front Oncol. 2013; 3:108.
193. Massard C, Chi KN, Castellano D, de Bono J, Gravis G, Dirix L, Machiels JP, Mita A, Mellado B, Turri S, Maier J, Csonka D, Chakravartty A, Fizazi K. Phase Ib dose-finding study of abiraterone acetate plus buparlisib (BKM120) or dactolisib (BEZ235) in patients with castration-resistant prostate cancer. Eur J Cancer. 2017; 76:36–44.
194. McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, Davis NM, Abrams SL, Montalto G, D'Assoro AB, Libra M, Nicoletti F, Maestro R, Basecke J, Cocco L, Cervello M, Martelli AM. Multifaceted roles of GSK-3 and Wnt/β-catenin in hematopoiesis and leukemogenesis: opportunities for therapeutic intervention. Leukemia. 2014; 28(1):15-33.
195. McDonnell, T. J., P. Troncoso, S. M. Brisbay, C. Logothetis, L. W. Chung, J. T. Hsieh, S. M. Tu, e M. L. Campbell. «Expression of the Protooncogene Bcl-2 in the Prostate and Its Association with Emergence of Androgen-Independent Prostate Cancer». Cancer Research 52, n. 24 (15 dicembre 1992): 6940–44.
196. McNeal, J. E. «Normal Histology of the Prostate». *The American Journal of Surgical Pathology* 12, n. 8 (agosto 1988): 619–33. https://doi.org/10.1097/00000478-198808000-00003.

197. Mellinger, G. T., D. Gleason, e J. Bailar. «The Histology and Prognosis of Prostatic Cancer». *The Journal of Urology* 97, n. 2 (febbraio 1967): 331–37. https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)63039-8.
198. Mendoza, Michelle C., E. Emrah Er, and John Blenis. "The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation." Trends in biochemical sciences 36.6 (2011): 320-328.
199. Mercatelli, Neri, et al. "The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice." PloS one 3.12 (2008): e4029.
200. Michaud, Jason E., Kevin L. Billups, e Alan W. Partin. «Testosterone and Prostate Cancer: An Evidence-Based Review of Pathogenesis and Oncologic Risk». *Therapeutic Advances in Urology* 7, n. 6 (dicembre 2015): 378–87. https://doi.org/10.1177/1756287215597633.
201. Milella M, Falcone I, Conciatori F, Cesta Incani U, Del Curatolo A, Inzerilli N, Nuzzo CM, Vaccaro V, Vari S, Cognetti F, Ciuffreda L. PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. Front Oncol. 2015
202. Mitchell, Patrick S., et al. "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." Proceedings of the National Academy of Sciences 105.30 (2008): 10513-10518.
203. Miyake, Hideaki, Toshifumi Kurahashi, Atsushi Takenaka, Isao Hara, e Masato Fujisawa. «Improved Accuracy for Predicting the Gleason Score of Prostate Cancer by Increasing the Number of Transrectal Biopsy Cores». Urologia Internationalis 79, n. 4 (2007): 302–6. https://doi.org/10.1159/000109713.
204. Mohit et al., p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145 PNAS 2009
205. Mohit Sachdeva and Yin-Yuan Mo. "miR-145-mediated suppression of cell growth, invasion and metastasis." American journal of translational research 2.2 (2010): 170.
206. Mohit Sachdeva, et al. "Negative regulation of miR-145 by C/EBP-β through the Akt pathway in cancer cells." Nucleic acids research 40.14 (2012): 6683-6692.
207. Molina-Arcas M, Samani A, Downward J. Drugging the Undruggable: Advances on RAS Targeting in Cancer. Genes (Basel). 2021 Jun 10;12(6):899. doi: 10.3390/genes12060899
208. Montie JE, Pienta KJ. Review of the role of androgenic hormones in the epidemiology of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. Urology. 1994 Jun;43(6):892-9. doi: 10.1016/0090-4295(94)90163-5. PMID: 7515207.
209. Morgan, Todd M., Theodore D. Koreckij, e Eva Corey. «Targeted Therapy for Advanced Prostate Cancer: Inhibition of the PI3K/Akt/mTOR Pathway». Current cancer drug targets 9, n. 2 (2009): 237–49.
210. Mott, J. L., Kobayashi, S., Bronk, S. F., & Gores, G. J. (2007). mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. Oncogene, 26(42), 6133-6140.
211. Mukherjee R, Vanaja KG, Boyer JA, Gadal S, Solomon H, Chandarlapaty S, Levchenko A, Rosen N. Regulation of PTEN translation by PI3K signaling maintains pathway homeostasis. Mol Cell. 2021 Feb 18;81(4):708-723.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2021.01.033. PMID: 33606974; PMCID: PMC8384339
212. Mukohyama J, Shimono Y, Minami H, Kakeji Y, Suzuki A. Roles of microRNAs and RNA-Binding
213. Mulholland, David J., et al. "Pten loss and RAS/MAPK activation cooperate to promote EMT and metastasis initiated from prostate cancer stem/progenitor cells." Cancer research 72.7 (2012): 1878-1889.
214. Murali AK, Norris JS. Differential expression of epithelial and mesenchymal proteins in a panel of prostate cancer cell lines. J Urol. 2012; 188:632-638.
215. Muranen T, Selfors LM, Worster DT, Iwanicki MP, Song L, Morales FC, Gao S, Mills GB, Brugge JS. Inhibition of PI3K/mTOR leads to adaptive resistance in matrix-attached cancer cells. Cancer Cell. 2012; 21(2):227-39.

216. Nagel, Remco, et al. "Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer." Cancer research 68.14 (2008): 5795-5802.

217. Nagle, R. B., J. Hao, J. D. Knox, B. L. Dalkin, V. Clark, e A. E. Cress. «Expression of hemidesmosomal and extracellular matrix proteins by normal and malignant human prostate tissue.» The American Journal of Pathology 146, n. 6 (1995): 1498–1507.

218. Nakayama, Masashi, Mark L. Gonzalgo, Srinivasan Yegnasubramanian, Xiaohui Lin, Angelo M. De Marzo, e William G. Nelson. «GSTP1 CpG Island Hypermethylation as a Molecular Biomarker for Prostate Cancer». Journal of Cellular Biochemistry 91, n. 3 (2004): 540–52. https://doi.org/10.1002/jcb.10740.

219. Nam EH, Lee Y, Moon B, Lee JW, Kim S. Twist1 and AP-1 cooperatively upregulate integrin α5 expression to induce invasion and the epithelial-mesenchymal transition. Carcinogenesis. 2015; 36:327-337.

220. Nanta R, Kumar D, Meeker D, Rodova M, Van Veldhuizen PJ, Shankar S, Srivastava RK. NVP-LDE-225 (Erismodegib) inhibits epithelial-mesenchymal transition and human prostate cancer stem cell growth in NOD/SCID IL2Rγ null mice by regulating Bmi-1 and microRNA-128. Oncogenesis. 2013; 2:e42.

221. Nardella C, Carracedo A, Alimonti A, Hobbs RM, Clohessy JG, Chen Z, Egia A, Fornari A, Fiorentino M, Loda M, Kozma SC, Thomas G, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Differential requirement of mTOR in postmitotic tissues and tumorigenesis. Sci Signal. 2009; 2(55):ra2

222. NCT - ClinicalTrials.gov. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). All informations about Clinical Trials are available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/home. Accessed <21/12/2021>.

223. Newton AC, Trotman LC. Turning off AKT: PHLPP as a drug target. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2014;54:537-58.

224. Ni J, Liu Q, Xie S, Carlson C, Von T, Vogel K, Riddle S, Benes C, Eck M, Roberts T, Gray N, Zhao J. Functional characterization of an isoform-selective inhibitor of PI3K-p110β as a potential anticancer agent. Cancer Discov. 2012;2(5):425-33.

225. Nip, Hannah, et al. Oncogenic microRNA-4534 regulates PTEN pathway in prostate cancer. Oncotarget, 2016, 7.42: 68371.

226. Ota, Akinobu, et al. "Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma." Cancer research 64.9 (2004): 3087-3095.

227. Ozen, M., Creighton, C. J., Ozdemir, M., & Ittmann, M. (2008). Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. Oncogene, 27(12), 1788-1793.

228. Park HS, Hong SK, Oh MM, Yoon CY, Jeong SJ, Byun SS, Cheon J, Lee SE. Moon du G: Synergistic antitumor effect of NVP-BEZ235 and sunitinib on docetaxel-resistant human castration-resistant prostate cancer cells. Anticancer Res. 2014;34:3457–68.

229. Park MJ, Kim MS, Park IC, Kang HS, Yoo H, Park SH, Rhee CH, Hong SI, Lee SH. PTEN suppresses hyaluronic acid-induced matrix metalloproteinase-9 expression in U87MG glioblastoma cells through focal adhesion kinase dephosphorylation. Cancer Res. 2002; 62(21):6318-22.

230. Park S, Kim YS, Kim DY, So I, Jeon JH. PI3K pathway in prostate cancer: All resistant roads lead to PI3K. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2018;1870(2):198-206.

231. Park, Sonya Youngju, Claudia Zacharias, Caitlyn Harrison, Richard E. Fan, Christian Kunder, Negin Hatami, Frederik Giesel, et al. «Gallium 68 PSMA-11 PET/MR Imaging in Patients with Intermediate- or High-Risk Prostate Cancer». *Radiology* 288, n. 2 (2018): 495–505. https://doi.org/10.1148/radiol.2018172232.

232. Patel L, Pass I, Coxon P, Downes CP, Smith SA, Macphee CH. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN. Curr Biol. 2001; 11(10):764-8.

233. Patnaik A, Kung J, Loda M, Taplin ME, Lis R, Kantoff PW, Balk SP, Glenn J, Bubley. A phase Ib study of BKM120 combined with abiraterone acetate for castrate-resistant, metastatic prostate cancer. Journal of Clinical Oncology. 274. 2015

234. PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Prostate Cancer Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Updated <12/11/2021>. Available at: https://www.cancer.gov/types/prostate/patient/prostate-treatment-pdq. Accessed <03/12/2021>. [PMID: 26389353]

235. Pearson HB, Li J, Meniel VS, Fennell CM, Waring P, Montgomery KG, Rebello RJ, Macpherson AA, Koushyar S, Furic L, Cullinane C, Clarkson RW, Smalley MJ, Simpson KJ, Phesse TJ, Shepherd PR, Humbert PO, Sansom OJ, Phillips WA. Identification of Pik3ca Mutation as a Genetic Driver of Prostate Cancer That Cooperates with Pten Loss to Accelerate Progression and Castration-Resistant Growth. Cancer Discov. 2018;8(6):764-779.

236. Pearson HB, Shorning BY, Dass MS, Smalley MJ. The PI3K-AKT-mTOR Pathway and Prostate Cancer: At the Crossroads of AR, MAPK, and WNT Signaling. Int J Mol Sci. 2020 Jun 25;21(12):4507. doi: 10.3390/ijms21124507. PMID: 32630372; PMCID: PMC7350257.

237. Peehl, D. M. «Primary Cell Cultures as Models of Prostate Cancer Development». *Endocrine-Related Cancer* 12, n. 1 (marzo 2005): 19–47. https://doi.org/10.1677/erc.1.00795.

238. Petrocca, F., Croce, C. M. et al. (2008). Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. Cancer research, 68(15), 6162-6170.

239. Petrovics G, Liu A, Shaheduzzaman S, Furusato B, Sun C, Chen Y, Nau M, Ravindranath L, Chen Y, Dobi A, Srikantan V, Sesterhenn IA, McLeod DG, et al. Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. Oncogene. 2005; 24:3847-3852.

240. Pirozzi G, Tirino V, Camerlingo R, Franco R, La Rocca A, Liguori E, Martucci N, Paino F, Normanno N, Rocco G. Epithelial to Mesenchymal Transition by TGFβ-1 Induction Increases Stemness Characteristics in Primary Non Small Cell Lung Cancer Cell Line. PLoS ONE. 2011; 6:e21548.

241. Podsypanina K, Ellenson LH, Nemes A, Gu J, Tamura M, Yamada KM, Cordon-Cardo C, Catoretti G, Fisher PE, Parsons R. Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(4):1563-8.

242. Posadas EM, Gulley J, Arlen PM, Trout A, Parnes HL, Wright J, Lee MJ, Chung EJ, Trepel JB, Sparreboom A, Chen C, Jones E, Steinberg SM, Daniels A, Figg WD, Dahut WL. A phase II study of perifosine in androgen independent prostate cancer. Cancer Biol Ther. 2005; 4(10):1133-7.

243. Pruett, N., Pahwa, R., Mahajan, A. P., Schrump, D. S., Singh, A. & Hoang, C. D. (2021). MicroRNA-206 suppresses mesothelioma progression via the Ras signaling axis. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 24, 669-681.

244. Puca, Loredana, Panagiotis J. Vlachostergios, and Himisha Beltran. "Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: emerging biology, models, and therapies." Cold Spring Harbor perspectives in medicine 9.2 (2019): a030593.

245. Puhr, Martin, et al. "The glucocorticoid receptor is a key player for prostate cancer cell survival and a target for improved antiandrogen therapy." Clinical Cancer Research 24.4 (2018): 927-938.

246. Pungsrinont, Thanakorn, Julia Kallenbach, and Aria Baniahmad. "Role of PI3K-AKT-mTOR pathway as a pro-survival signaling and resistance-mediating mechanism to therapy of prostate cancer." International Journal of Molecular Sciences 22.20 (2021): 11088.
247. Ren D, Wang M, Guo W, Huang S, Wang Z, Zhao X, Du H, Song L, Peng X. Double-negative feedback loop between ZEB2 and miR-145 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in prostate cancer cells. Cell Tissue Res. 2014; 358:763-778.
248. Ren D, Wang M, Guo W, Zhao X, Tu X, Huang S, Zou X, Peng X. Wild-type p53 suppresses the epithelial-mesenchymal transition and stemness in PC-3 prostate cancer cells by modulating miR 145. Int J Oncol. 2013; 42:1473-1481.
249. Ren et al. (2013). Grape seed procyanidin reversal of p-glycoprotein associated multi-drug resistance via down-regulation of NF-κB and MAPK/ERK mediated YB-1 activity in A2780/T cells. PloS one, 8(8), e71071.
250. Ren et al. (2014). Zuo Jin Wan reverses P-gp-mediated drug-resistance by inhibiting activation of the PI3K/Akt/NF-κB pathway. BMC complementary and alternative medicine, 14(1), 1-10.
251. Restuccia DF, Hemmings BA. Cell signaling. Blocking Akt-ivity. Science. 2009;325(5944):1083-4.
252. Ritchie, Matthew E., et al. "limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies." Nucleic acids research 43.7 (2015): e47-e47.
253. Robertson H, Hayes JD, Sutherland C. A partnership with the proteasome; the destructive nature of GSK3. Biochem Pharmacol. 2018; 147:77-92.
254. Rodon J, Dienstmann R, Serra V, Tabernero J. Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. Nat Rev Clin Oncol. 2013;10(3):143–153.
255. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. Nature. 1994;370 (6490):527-32
256. Rodriguez-Viciana, Pablo, et al. "Phosphatidylinositol-3-OH kinase direct target of Ras." Nature 370.6490 (1994): 527-532.
257. Rodrik-Outmezguine V, Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M, Grbovic-Huezo O, Serra V, Majumder PK, Baselga J, Rosen N. AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. Cancer Cell. 2011; 19(1):58-71.
258. Ruscetti M, Quach B, Dadashian EL, Mulholland DJ, Wu H. Tracking and Functional Characterization of Epithelial- Mesenchymal Transition and Mesenchymal Tumor Cells During Prostate Cancer Metastasis. Cancer Res. 2015; 75:2749-2759.
259. Ruvkun, G., Fischer, S. E., Montgomery, T. A., Zhang, C., Fahlgren, N., Breen, P. C., Hwang, A. et al (2011). The ERI-6/7 helicase acts at the first stage of an siRNA amplification pathway that targets recent gene duplications. PLoS genetics, 7(11), e1002369.
260. Ruzzene M, Bertacchini J, Toker A, Marmiroli S. Cross-talk between the CK2 and AKT signaling pathways in cancer. Adv Biol Regul. 2017;64:1-8
261. Ruzzene, Maria, Jessika Bertacchini, Alex Toker, e Sandra Marmiroli. «Cross-Talk between the CK2 and AKT Signaling Pathways in Cancer». *Advances in Biological Regulation* 64 (2017): 1–8. https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.03.002.
262. Saito, Y., & Jones, P. M. (2006). Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. Cell cycle, 5(19), 2220-2222.

263. Sampson, Valerie B., et al. "MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells." Cancer research 67.20 (2007): 9762-9770.

264. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. Science. 2004; 304 (5670):554.

265. Saranyutanon, S., Srivastava, S. K., Pai, S., Singh, S., & Singh, A. P. (2019). Therapies targeted to androgen receptor signaling axis in prostate cancer: Progress, challenges, and hope. Cancers, 12(1), 51.

266. Sarker, Debashis, et al. "Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer." Clinical Cancer Research 15.15 (2009): 4799-4805.

267. Sasongko TH, Ismail NF, Zabidi-Hussin Z. Rapamycin and rapalogs for tuberous sclerosis complex. Cochrane Database Syst Rev. 2016 Jul 13;7(7):CD011272. doi: 10.1002/14651858.CD011272.pub2. PMID: 27409709; PMCID: PMC6458010.

268. Sayed, Minzhen He, Chull Hong, Shumin Gao, Shweta Rane, Zhi Yang, Maha Abdellatif. MicroRNA-21 Is a Downstream Effector of AKT That Mediates Its Antiapoptotic Effects via Suppression of Fas Ligand, Journal of Biological Chemistry, Volume 285, Issue 26, 2010.

269. Schetter, Aaron J., et al. "MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma." Jama 299.4 (2008): 425-436.

270. Schwartz S, Wongvipat J, Trigwell CB, Hancox U, Carver BS, Rodrik-Outmezguine V, Will M, Yellen P, de Stanchina E, Baselga J, Scher HI, Barry ST, Sawyers CL, Chandarlapaty S, Rosen N. Feedback suppression of PI3Kα signaling in PTEN-mutated tumors is relieved by selective inhibition of PI3Kβ. Cancer Cell. 2015;27(1):109-22.

271. Seiler D, Zheng J, Liu G, Wang S, Yamashiro J, Reiter RE, Huang J, Zeng G. Enrichment of putative prostate cancer stem cells after androgen deprivation: upregulation of pluripotency transactivators concurs with resistance to androgen deprivation in LNCaP cell lines. Prostate. 2013; 73:1378-1390.

272. Selman, Steven H. "The McNeal Prostate: A Review." Urology 78, no. 6 (December 2011): 1224–28. doi:10.1016/j.urology.2011.07.1395.

273. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer 2003;3:721–32.

274. Serra V, Scaltriti M, Prudkin L, P J A Eichhorn, Y H Ibrahim, S Chandarlapaty, B Markman, O Rodriguez, M Guzman, S Rodriguez, M Gili, M Russillo, J L Parra, S Singh, J Arribas, N Rosen, J Baselga. PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. Oncogene. 2011; 30(22):2547–2557.

275. Sha, Yongqiang, et al. "MGF E peptide pretreatment improves the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs via MEK-ERK1/2 and PI3K-Akt pathway under severe hypoxia." Life sciences 189 (2017): 52-62.

276. Shang Z, Cai Q, Zhang M, Zhu S, Ma Y, Sun L, Jiang N, Tian J, Niu X, Chen J, Sun Y, Niu Y. A switch from CD44+ cell to EMT cell drives the metastasis of prostate cancer. Oncotarget. 2015; 6:1202-1216. doi: 10.18632/oncotarget.2841.

277. Sharifi, Nima, James L. Gulley, and William L. Dahut. "Androgen deprivation therapy for prostate cancer." Jama 294.2 (2005): 238-244.

278. Shaw, Gerry, et al. "Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells." The FASEB journal 16.8 (2002): 869-871.

279. Shen, Michael M., e Cory Abate-Shen. «Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges». *Genes & Development* 24, n. 18 (2010): 1967–2000. https://doi.org/10.1101/gad.1965810.

280. Sheridan, C. Grail of RAS cancer drugs within reach. Nat Biotechnol 38, 6–8 (2020). https://doi.org/10.1038/s41587-019-0382-x

281. Shidong Jia, Xueliang Gao, Sang Hyun Lee, Sauveur-Michel Maira, Xiaoqiu Wu, Edward C. Stack, Sabina Signoretti, Massimo Loda, Jean J. Zhao and Thomas M. Roberts. Opposing Effects of Androgen Deprivation and Targeted Therapy on Prostate Cancer Prevention Cancer Discovery 2013; *3(1); 44–51.*

282. Shiota M, Itsumi M, Takeuchi A, Imada K, Yokomizo A, Kuruma H, Inokuchi J, Tatsugami K, Uchiumi T, Oda Y, Naito S. Crosstalk between epithelial-mesenchymal transition and castration resistance mediated by Twist1/AR signaling in prostate cancer. Endocr Relat Cancer. 2015; 22:889-900.

283. Shiota, Sekino, Yohei, et al. "TUBB3 reverses resistance to docetaxel and cabazitaxel in prostate cancer." International journal of molecular sciences 20.16 (2019): 3936.

284. Soares et al. Breast cancer tissue slices as a model for evaluation of response to rapamycin. Cell Tissue Res **352,** 671–684 (2013). https://doi.org/10.1007/s00441-013-1608-8

285. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012; 13(5):283-96.

286. Song, R., Liu, Q., Hutvagner, G. *et al.* Rule discovery and distance separation to detect reliable miRNA biomarkers for the diagnosis of lung squamous cell carcinoma. *BMC Genomics* 15, S16 (2014). https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-S9-S16

287. Staal, S. P. «Molecular Cloning of the Akt Oncogene and Its Human Homologues AKT1 and AKT2: Amplification of AKT1 in a Primary Human Gastric Adenocarcinoma». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84, n. 14 (1987): 5034–37. https://doi.org/10.1073/pnas.84.14.5034.

288. Stangelberger, Anton, Matthias Waldert, e Bob Djavan. «Prostate Cancer in Elderly Men». *Reviews in Urology* 10, n. 2 (2008): 111–19.

289. Steelman, Linda S., et al. "Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging." Aging (Albany NY) 3.3 (2011): 192.

290. Stephen, Ruth L., Mattias C. U. Gustafsson, Morag Jarvis, Roger Tatoud, Barry R. Marshall, Deborah Knight, Ewa Ehrenborg, Adrian L. Harris, C. Roland Wolf, e Colin N. A. Palmer. «Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ Stimulates the Proliferation of Human Breast and Prostate Cancer Cell Lines». *Cancer Research* 64, n. 9 (1 maggio 2004): 3162–70. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2760.

291. Stokoe, D.; Stephens, L.R.; Copeland, T.; Gaffney, P.R.; Reese, C.B.; Painter, G.F.; Holmes, A.B.; McCormick, F.; Hawkins, P.T. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. Science 1997, 277, 567–570

292. Sun C, Dobi A, Mohamed A, Li H, Thangapazham RL, Furusato B, Shaheduzzaman S, Tan SH, Vaidyanathan G, Whitman E, Hawksworth DJ, Chen Y, Nau M, et al. TMPRSS2-ERG fusion, a common genomic alteration in prostate cancer activates C-MYC and abrogates prostate epithelial differentiation. Oncogene. 2008; 27:5348-5353.

293. Sun et al. "Deoxycytidine kinase modulates the impact of the ABC transporter ABCG2 on clofarabine cytotoxicity." Cancer research 71.5 (2011): 1781-1791.

294. Sundaresan NR, Pillai VB, Wolfgeher D, Samant S, Vasudevan P, Parekh V, Raghuraman H, Cunningham JM, Gupta M, Gupta MP. The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy. Sci Signal. 2011;4(182):ra46
295. Sundaresan, Nagalingam R., et al. "The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy." Science signaling 4.182 (2011): ra46-ra46.
296. Sundaresan, Nagalingam R., Vinodkumar B. Pillai, Don Wolfgeher, Sadhana Samant, Prabhakaran Vasudevan, Vishwas Parekh, Hariharasundaram Raghuraman, John M. Cunningham, Madhu Gupta, e Mahesh P. Gupta. «The Deacetylase SIRT1 Promotes Membrane Localization and Activation of Akt and PDK1 during Tumorigenesis and Cardiac Hypertrophy». *Science Signaling* 4, n. 182 (19 luglio 2011): ra46. https://doi.org/10.1126/scisignal.2001465.
297. Sutherland, Sarah IM, et al. "Expression of phosphorylated-mTOR during the development of prostate cancer." The Prostate 74.12 (2014): 1231-1239.
298. T. Bohnacker, A.E. Prota, F. Beaufils, J.E. Burke, A. Melone, A.J. Inglis, et al., Deconvolution of Buparlisib's mechanism of action defines specific PI3K and tubulin inhibitors for therapeutic intervention, Nat. Commun. 8, 2017, 14683
299. Tai, Sheng, et al. "PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma." The Prostate 71.15 (2011): 1668-1679.
300. Takaoka, Yuji, et al. "Forced expression of miR-143 represses ERK5/c-Myc and p68/p72 signaling in concert with miR-145 in gut tumors of ApcMin mice." (2012): e42137.
301. Tang, Q. et al. (2020). The multidrug resistance can be reversed for the decrease of P-gp and LRP by inhibiting PI3K/Akt/NF-κB signal pathway in nasopharynx carcinoma. Bioscience Reports, 40(5).
302. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B, Antipin Y, Mitsiades N, Landers T, Dolgalev I, Major JE, Wilson M, Socci ND, Lash AE, Heguy A, Eastham JA, Scher HI, Reuter VE, Scardino PT, Sander C, Sawyers CL, Gerald WL. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. Cancer Cell. 2010;18(1):11-22.
303. Teply, Benjamin A., et al. "Bipolar androgen therapy in men with metastatic castration-resistant prostate cancer after progression on enzalutamide: an open-label, phase 2, multicohort study." The Lancet Oncology 19.1 (2018): 76-86.
304. Thang, V. H., Skoog, L., Duc, N. B., Van, T. T., & Tani, E. (2015). Cell proliferation measured by Ki67 staining and correlation to clinicopathological parameters in operable breast carcinomas from Vietnamese and Swedish patients. Journal of Analytical Oncology, 4(2), 58-68.
305. Thomas C, Lamoureux F, Crafter C, Davies BR, Beraldi E, Fazli L, Kim S, Thaper D, Gleave ME, Zoubeidi A. Synergistic targeting of PI3K/AKT pathway and androgen receptor axis significantly delays castration-resistant prostate cancer progression in vivo. Mol Cancer Ther. 2013; 12(11):2342-55.
306. Timms, Barry G. «Prostate Development: A Historical Perspective». Differentiation; Research in Biological Diversity 76, n. 6 (luglio 2008): 565–77. https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2008.00278.x.
307. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, Cao X, Yu J, Helgeson BE, Cao Q, Prensner JR, Rubin MA, Shah RB, Mehra R, Chinnaiyan AM. Role of the TMPRSS2-ERG Gene Fusion in Prostate Cancer. Neoplasia. 2008; 10:177- 188.

308. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. Science. 2005; 310:644-648.

309. Tomlins, Scott A., Rohit Mehra, Daniel R. Rhodes, Xuhong Cao, Lei Wang, Saravana M. Dhanasekaran, Shanker Kalyana-Sundaram, et al. «Integrative Molecular Concept Modeling of Prostate Cancer Progression». *Nature Genetics* 39, n. 1 (2007): 41–51. https://doi.org/10.1038/ng1935.

310. Toren, Paul, and Amina Zoubeidi. "Targeting the PI3K/Akt pathway in prostate cancer: challenges and opportunities." International journal of oncology 45.5 (2014): 1793-1801.

311. Trotman, Lloyd C, Masaru Niki, Zohar A Dotan, Jason A Koutcher, Antonio Di Cristofano, Andrew Xiao, Alan S Khoo, et al. «Pten Dose Dictates Cancer Progression in the Prostate». *PLoS Biology* 1, n. 3 (dicembre 2003): e59. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000059.

312. Tsuji, T.; Sapinoso, L.M.; Tran, T.; Gaffney, B.; Wong, L.; Sankar, S.; Raymon, H.K.; Mortensen, D.S.; Xu, S. CC-115, a dual inhibitor of mTOR kinase and DNA-PK, blocks DNA damage repair pathways and selectively inhibits ATM-deficient cell growth in vitro. Oncotarget 2017, 8, 74688–74702

313. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. The UniProt Consortium. Nucleic Acids Res. 49:D1 (2021). Accessed <17/12/2021>.

314. Valeria Marigo, Vincenzo Zappavigna. Cellule e segnali. Vie di trasduzione del segnale nella proliferazione cellulare e nella morfogenesi. Liguori, 2013.

315. van der Vos, K. E. & Coffer, P. J. The Extending Network of FOXO Transcriptional Target Genes. Antioxid. Redox Signal. 2011;14, 579–592

316. Van Rooij, E., & Olson, E. N. (2007). MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. The Journal of clinical investigation, 117(9), 2369-2376.

317. Vanacore D., Boccellino M., Rossetti S., Cavaliere C., D'Aniello C., Di Franco R., Jacopo Romano F., Montanari M., La Mantia E., Piscitelli R., Nocerino F., Cappuccio F., Grimaldi G., et al Micrornas in prostate cancer: an overview. Oncotarget. 2017; 8: 50240-50251.

318. Vanhaesebroeck B, Martin, V., Guillermet-Guibert, J., Chicanne, G., Cabou, C., Jandrot-Perrus, M., Plantavid, M. & Gratacap, M. P. (2010). Deletion of the p110β isoform of phosphoinositide 3-kinase in platelets reveals its central role in Akt activation and thrombus formation in vitro and in vivo. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 115(10), 2008-2013.

319. Vanhaesebroeck, Bart, Peter K. Vogt, e Christian Rommel. «PI3K – From the Bench to the Clinic and Back». *Current topics in microbiology and immunology* 347 (2011): 1–19. https://doi.org/10.1007/82_2010_65.

320. Varambally, Sooryanarayana, Saravana M. Dhanasekaran, Ming Zhou, Terrence R. Barrette, Chandan Kumar-Sinha, Martin G. Sanda, Debashis Ghosh, et al. «The Polycomb Group Protein EZH2 Is Involved in Progression of Prostate Cancer». *Nature* 419, n. 6907 (2002): 624–29. https://doi.org/10.1038/nature01075.

321. Vasioukhin, V., C. Bauer, L. Degenstein, B. Wise, e E. Fuchs. «Hyperproliferation and Defects in Epithelial Polarity upon Conditional Ablation of Alpha-Catenin in Skin». *Cell* 104, n. 4 (2004): 605–17. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00246-x.

322. Viollet, B., Mounier, R., Lantier, L., Leclerc, J., Sotiropoulos, A., Foretz, M. (2011). Antagonistic control of muscle cell size by AMPK and mTORC1. Cell Cycle, 10(16), 2640-2646.

323. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer. 2002;2(7):489-501.

324. Volinia, Stefano, et al. "A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets." Proceedings of the National Academy of Sciences 103.7 (2006): 2257-2261.

325. Wade, Cameron A., e Natasha Kyprianou. «Profiling Prostate Cancer Therapeutic Resistance». International Journal of Molecular Sciences 19, n. 3 (2018): E904. https://doi.org/10.3390/ijms19030904.

326. Walter, B. A., Valera, V. A., Pinto, P. A., & Merino, M. J. (2013). Comprehensive microRNA profiling of prostate cancer. Journal of Cancer, 4(5), 350.

327. Wang M, Ren D, Guo W, Huang S, Wang Z, Li Q, Du H, Song L, Peng X. N-cadherin promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like traits via ErbB signaling in prostate cancer cells. Int J Oncol. 2016; 48:595-606.

328. Wang S, Gao J, Lei Q, Rozengurt N, Pritchard C, Jiao J, Thomas GV, Li G, Roy-Burman P, Nelson PS, Liu X, Wu H. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. Cancer Cell. 2003; 4(3):209-21

329. Wang Y, Kreisberg JI, Ghosh PM. Cross-talk between the androgen receptor and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in prostate cancer. Curr Cancer Drug Targets. 2007; 7(6):591-604.

330. Wang Y, Romigh T, He X, Tan MH, Orloff MS, Silverman RH, Heston WD, Eng C. Differential regulation of PTEN expression by androgen receptor in prostate and breast cancers. Oncogene. 2011; 30(42):4327-38.

331. Wang, R. Y., Chen, X. W., Zhang, W. W., Jiang, F., Liu, M. Q., & Shen, X. B. (2020). CYP2E1 changes the biological function of gastric cancer cells via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Molecular Medicine Reports, 21(2), 842-850.

332. Wang, Ying, Eric J. Jacobs, Susan M. Gapstur, Maret L. Maliniak, Ted Gansler, Marjorie L. McCullough, Victoria L. Stevens, e Alpa V. Patel. «Recreational Physical Activity in Relation to Prostate Cancer-Specific Mortality Among Men with Nonmetastatic Prostate Cancer». European Urology 72, n. 6 (2017): 931–39. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.06.037.

333. Wani R, Bharathi NS, Field J, Tsang AW, Furdui CM. Oxidation of Akt2 kinase promotes cell migration and regulates G1-S transition in the cell cycle. Cell Cycle. 2011;10:3263-8.

334. Watton, Sandra J., and Julian Downward. "Akt/PKB localisation and 3′ phosphoinositide generation at sites of epithelial cell–matrix and cell–cell interaction." Current Biology 9.8 (1999): 433-436.

335. Wee S, Wiederschain D, Maira SM, Loo A, Miller C, deBeaumont R, Stegmeier F, Yao YM, Lengauer C. PTEN-deficient cancers depend on PIK3CB. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(35):13057-62.

336. Wei XX, Hsieh AC, Kim W, Friedlander T, Lin AM, Louttit M, Ryan CJ. A Phase I Study of Abiraterone Acetate Combined with BEZ235, a Dual PI3K/mTOR Inhibitor, in Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer. Oncologist. 2017;22(5):503-e43

337. Wei, Jingchao, et al. "Integrative analysis of MicroRNA and gene interactions for revealing candidate signatures in prostate cancer." Frontiers in Genetics 11 (2020): 176.

338. Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, et al. The EMT-activator ZEB1

339. Wen, Feng, et al. "Machine learning glove using self-powered conductive superhydrophobic triboelectric textile for gesture recognition in VR/AR applications." Advanced science 7.14 (2020): 2000261.

340. WHO. International Agency for Research on Cancer. Italy. Globocan 2020. https://gco.iarc.fr/today/home Accessed <10/12/2021>.

341. Wong KK, Engelman JA, Cantley LC. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. Curr Opin Genet Dev. 2010; 20(1):87-90

342. Wong, Kwok-Kin, Jeffrey A. Engelman, e Lewis C. Cantley. «Targeting the PI3K Signaling Pathway in Cancer». Current Opinion in Genetics & Development 20, n. 1 (2010): 87–90. https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.11.002.
343. Wu P, Gao W, Su M, Nice EC, Zhang W, Lin J, Xie N. Adaptive Mechanisms of Tumor Therapy Resistance Driven by Tumor Microenvironment. Front Cell Dev Biol. 2021 Mar 1;9:641469
344. Wu Z, He B, He J, Mao X. Upregulation of miR-153 promotes cell proliferation via downregulation of the PTEN tumor suppressor gene in human prostate cancer. Prostate. 2013; 73(6):596-604.
345. Wu, Q., Ma, J., Wei, J., Meng, W., Wang, Y., & Shi, M. (2020). FOXD1-AS1 regulates FOXD1 translation and promotes gastric cancer progression and chemoresistance by activating the PI3K/AKT/mTOR pathway. Molecular Oncology, 15(1), 299-316
346. Xia, F., Xiong, Y., & Li, Q. (2017). Interaction of lincRNA ROR and p53/miR-145 correlates with lung cancer stem cell signatures. Journal of cellular biochemistry.
347. Xu H, Tian Y, Yuan X, Wu H, Liu Q, Pestell RG, Wu K. The role of CD44 in epithelial–mesenchymal transition and cancer development. Onco Targets Ther. 2015; 8:3783- 3792.
348. Xu, J., Li, L., Wang, T., Li, S., Chen, Z., Wu, J., Cao, W. (2021). TDO2 promotes the EMT of hepatocellular carcinoma through Kyn-AhR pathway. Frontiers in oncology, 10, 3008.
349. Yan Y, Serra V, Prudkin L, Scaltriti M, Murli S, Rodríguez O, Guzman M, Sampath D, Nannini M, Xiao Y, Wagle MC, Wu JQ, Wongchenko M, Hampton G, Ramakrishnan V, Lackner MR, Saura C, Roda D, Cervantes A, Tabernero J, Patel P, Baselga J. Evaluation and clinical analyses of downstream targets of the Akt inhibitor GDC-0068. Clin Cancer Res. 2013; 19(24):6976-86.
350. Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ, James DE. A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. Cell Rep. 2015;12(6):937-43.
351. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. Cell. 2004; 117:927-939.
352. Yang, Lin, Han C. Dan, Mei Sun, Qiyuan Liu, Xia-meng Sun, Richard I. Feldman, Andrew D. Hamilton, et al. «Akt/Protein Kinase B Signaling Inhibitor-2, a Selective Small Molecule Inhibitor of Akt Signaling with Antitumor Activity in Cancer Cells Overexpressing Akt». *Cancer Research* 64, n. 13 (2004): 4394–99. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0343.
353. Zhang, Hai-Liang, et al. "An elevated serum miR-141 level in patients with bone-metastatic prostate cancer is correlated with more bone lesions." Asian journal of andrology 15.2 (2013): 231.
354. Zhang, J. et al. (2014). Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. Breast cancer research and treatment, 147(2), 423-431.
355. Zhao et al., 2007. Development of potent, allosteric dual Akt1 and Akt2 inhibitors with improved physical properties and cell activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18 (2008) 49–53
356. Zhifang M, Liang W, Wei Z, Bin H, Rui T, Nan W, Shuhai Z. The androgen receptor plays a suppressive role in epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer stem progenitor cells. BMC Biochem. 2015; 16:13.
357. Zuo, Jianwei, et al. "Inhibitory action of pristimerin on hypoxia-mediated metastasis involves stem cell characteristics and EMT in PC-3 prostate cancer cells." Oncology reports 33.3 (2015): 1388-1394.