



Universitat de Lleida

Estudi del proteasoma i altres dianes terapèutiques en el melanoma i el carcinoma d'endometri

Anabel Sorolla Bardají

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

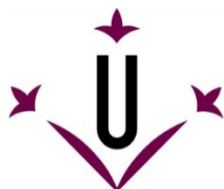
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE LLEIDA
DEPARTAMENT DE MEDICINA

INSTITUT DE RECERCA
BIOMÈDICA DE LLEIDA

IRBLLEIDA



ESTUDI DEL PROTEASOMA I ALTRES DIANES TERAPÈUTIQUES EN EL MELANOMA I EL CARCINOMA D'ENDOMETRI

Anabel Sorolla Bardají

Directors:

Dra. Rosa Maria Martí Laborda

Dr. Xavier Matias-Guiu Guia

Lleida, juny de 2012

Als meus pares

Als meus germans

Resum

Resumen

Abstract

RESUM

La utilització de fàrmacs contra dianes terapèutiques específiques ha revolucionat el tractament del càncer. Si es compara amb els tractaments antineoplàsics tradicionals, com la quimioteràpia o la radioteràpia, la teràpia contra dianes moleculars presenta un gran avantatge per la seva especificitat, tant en la relació fàrmac-diana com diana-tumor. Això permet reduir la toxicitat indiscriminada dels tractaments anticancerosos, i addicionalment, actuar de forma dirigida contra determinats subgrups de tumors. Per altra banda, aquests nous tipus de medicaments poden actuar de forma sinèrgica entre ells o en combinació amb tractaments clàssics.

En aquest treball hem investigat els efectes dels següents tractaments contra dianes terapèutiques en línies cel·lulars de melanoma cutani primari i metastàtic: els anàlegs de la somatostatina Octreotide i SOM230, els inhibidors del proteasoma Bortezomib, MG132, ALLN i Epoxomicina, l'inhibidor de receptors amb activitat tirosina cinasa Sunitinib i el tractament combinat de Sunitinib i Bortezomib. Aquesta última combinació l'hem testat també en línies cel·lulars de carcinoma d'endometri.

S'observa que les línies cel·lulars de melanoma expressen varis receptors de la somatostatina però la inhibició de la proliferació dels anàlegs de la somatostatina no supera el 50%. Els inhibidors del proteasoma són eficients a l'hora d'induir una parada en el cicle cel·lular i mort, tant dependent de caspases com independent de caspases. Sunitinib és capaç de reduir la viabilitat, proliferació i induir apoptosi en aquelles línies cel·lulars expressores de receptors tirosina cinasa activats (PDGFR α i VEGFR2), a més d'interaccionar amb Bortezomib de forma sinèrgica mitjançant el bloqueig de la via Akt. Al carcinoma d'endometri, a diferència de l'observat al melanoma, Sunitinib no actua inhibint l'activitat tirosina cinasa de les seves dianes conegudes i l'efecte sinèrgic amb Bortezomib es deu a l'habilitat de Sunitinib de bloquejar la via NF κ B activada per Bortezomib.

Almenys en les condicions utilitzades al nostre estudi, els anàlegs de la somatostatina no semblen ser útils per al tractament del melanoma. Els inhibidors del proteasoma, i en concret, la combinació Bortezomib i Sunitinib podria ser efectiva en determinats casos de melanoma. Aquesta mateixa combinació es perfila com un possible tractament del carcinoma d'endometri actuant, paradoxalment, a través d'una via diferent.

RESUMEN

La utilización de fármacos contra dianas terapéuticas específicas ha revolucionado el tratamiento del cáncer. Si se compara con los tratamientos antineoplásicos tradicionales, como la quimioterapia o la radioterapia, la terapia contra dianas moleculares presenta una gran ventaja por su especificidad, tanto en la relación fármaco-diana como diana-tumor. Ésto permite reducir la toxicidad indiscriminada de los tratamientos anticancerosos, y adicionalmente, actuar de forma dirigida contra determinados subgrupos de tumores. Por otro lado, estos nuevos tipos de medicamentos pueden actuar de forma sinérgica entre ellos o en combinación con otros tratamientos clásicos.

En este trabajo hemos investigado los efectos de los siguientes tratamientos contra dianas terapéuticas en líneas celulares de melanoma cutáneo primario y metastático: los análogos de la somatostatina Octreotide y SOM230, los inhibidores del proteasoma Bortezomib, MG132, ALLN y Epoxomicina, el inhibidor de receptores con actividad tirosina cinasa Sunitinib y el tratamiento combinado de Sunitinib y Bortezomib. Esta última combinación la hemos testado también en líneas celulares de carcinoma de endometrio. Se observa que las líneas celulares de melanoma expresan varios receptores de la somatostatina pero la inhibición de la proliferación de los análogos de la somatostatina no supera el 50%. Los inhibidores del proteasoma son eficientes a la hora de inducir una parada en el ciclo celular y muerte, tan dependiente como independiente de caspasas. Sunitinib es capaz de reducir la viabilidad, proliferación e inducir apoptosis en aquellas líneas celulares expresoras de receptores tirosina cinasa activados (PDGFR α i VEGFR2), además de interactuar con Bortezomib de forma sinérgica mediante el bloqueo de la vía Akt. En el carcinoma de endometrio, a diferencia de lo observado en el melanoma, Sunitinib no actúa inhibiendo la actividad tirosina cinasa de sus dianas conocidas y el efecto sinérgico con Bortezomib se debe a la habilidad de Sunitinib de bloquear la vía NF κ B activada por Bortezomib.

Almenos en las condiciones utilizadas en nuestro estudio, los análogos de la somatostatina no parecen ser útiles para el tratamiento del melanoma. Los inhibidores del proteasoma y, en concreto, la combinación Bortezomib y Sunitinib podría ser efectiva en determinados casos de melanoma. Esta misma combinación se perfila como un posible tratamiento del carcinoma de endometrio actuando, paradójicamente, a través de una vía diferente.

ABSTRACT

The use of drugs against therapeutic targets has revolutionized the treatment of cancer. If it is compared with traditional neoplastic treatments such as chemotherapy or radiotherapy, targeted therapy presents more advantages due to its high specificity, either in the relationship drug-target or target-tumor. This results in a reduction of toxicity of the antitumoral treatments. In addition, these new therapies can directly target specific tumor subtypes and can interact synergistically with each other or in combination with classic treatments.

In the present work, we have investigated the effects of the following treatments against therapeutic targets in cutaneous melanoma cell lines both from primary or metastatic tumors: the somatostatin analogues Octreotide and SOM230, and the proteasome inhibitors Bortezomib, MG132, ALLN and Epoxomicin, the tyrosine kinase receptor inhibitor Sunitinib and the combined therapy of Sunitinib and Bortezomib. This latter combination has been also tested in endometrial carcinoma cell lines.

We have observed that melanoma cell lines express various somatostatin receptors but the inhibition of the cell proliferation rate after somatostatin analogues treatment is not higher than 50%. Proteasome inhibitors induce a cell cycle arrest and cell death, both caspase dependent and caspase independent. Sunitinib reduces the viability, proliferation and induces apoptosis in those cells presenting and activated tyrosine kinase receptor (PDGFR α and VEGFR2) and interacts synergistically with Bortezomib by blocking the Akt pathway. In contrast, in endometrial carcinoma, Sunitinib does not inhibit the kinase activity of the well known targets and the synergistic effect with Bortezomib is due to the ability of Sunitinib of blocking Bortezomib-induced NF κ B pathway.

Based on our experiments and conditions used in this study, somatostatin analogues do not seem to be useful for the treatment of melanoma. Proteasome inhibitors and particularly the combination of Bortezomib and Sunitinib could be effective in certain melanoma subtypes. This combination seems to be a promising treatment option for endometrial carcinoma, acting, paradoxically, through to a different pathway.

Agraïments

Agradecimientos

Acknowledgements

Agraïments/Agradecimientos/Aknowledgements

En aquesta part de la tesi m'agradaria agrair a tots aquells que m'han encaminat i m'han ajudat a que la realització d'aquest treball fos possible.

La meua primera aproximació cap a la recerca es remunta molts anys enrere, quan estava a segon de Batxillerat i a tots ens manaven fer el "el treball de recerca". Ja des de llavors, vaig sentir la curiositat pròpia del científic. Amb el títol "Quina és la substància orgànica que acumulen les fulles durant la fotosíntesi?" les meues professores de Biologia, la Remei Castelló i l'Ana Jiménez, que van ser tutores del meu treball de recerca, em van encomanar la seva passió per la Biologia. Recordaré a la Remei dient: "no pretengueu fer una tesi doctoral!". Ja llavors, em va semblar que això de la tesi era una cosa molt i molt seriosa... Moltes gràcies a totes dues! Més tard, el Jordi, el meu germà i després la meua germana es van doctorar i va marcar, a la seua manera, una mica la meua fita.

Anys més tard vaig anar a veure al Xavier i em va donar l'oportunitat de començar a treballar en el seu grup, cosa que em va omplir d'alegria, ja que pensava que amb la meua nota de la carrera, ni somiar de fer un doctorat. Moltes gràcies Xavier, així com també moltes gràcies a tu Rosa, per la confiança dipositada en mi i per la que seguiu dipositant.

Volia agrair a la Associació espanyola contra el càncer i en especial a la seva sucursal a Lleida per haver-me concedit una beca predoctoral, per la vostra important tasca i per rebre'm sempre amb tant d'afecte. Vull mostrar els meus agraïments a l'Eva Figuera, al president Manuel López i a les secretaries.

No puc deixar d'agrair a totes aquelles persones que em vaig trobar durant la meua estada breu a Brisbane. M'atreviria a dir, que només pel simple fet d'haver-hi anat, el meu doctorat ha valgut la pena. Many thanks Graeme for accepting me in your group in QIMR and permitting to learn from you. Also, for your interesting and deep conversations about everything. Thanks Herlina for your help, complicity and humility. Thanks Blake for your help, patience and for the nice weekend in Goondiwindi!!!. Many thanks Lutz, for absolutely everything. You are the clear example that good people are found everywhere. David, por nuestras Friday's parties entre *Coopers*, por tu valuosa compañía y amistad, así como también la de Tania, Miguel y la de los divertidísimos Herng and Yee. Also, I wanted to thank Glen for your lessons about xenografts, Nick's group for your help and the rest of people in G floor. Also, to you, Roxy, my most special and cute housemate (*take it easy!!*) and also to Stephanie, Kathrin for all the unforgettable moments. Also to Cally for making them possible. Also

Agraïments/Agradecimientos/Aknowledgements

to Majid, Laurent, Sara, Luis, Laurie, Pedro, Inga, Dani, Aurélie, Clémentine and Lissy for your great companion and the lovely *barbies*. Thank you all for making that time, **AWESOME!!!!!!**

Tornant al laboratori de Lleida moltes gràcies David, per ser el nostre germà gran, el meu i el de la Núria i obrir un camí a seguir. Gràcies per la teua ajuda i per les bones estones passades al laboratori. Moltes gràcies Andrée per donar un gir al meu doctorat, per la teva ajuda i per contagiar-me la teva passió per la ciència.

A la Núria Eritja per impregnar el laboratori del teu sentit de l'humor, a l'Anna Macià per la teva frescura, a la Laura per la teva dolçor i a la Cristina Mirantes per la teva empatia, i és clar, per les discussions sobre ciència i la vostra ajuda. Al Xavier Dolcet i al Mario per la vostra ajuda i opinions. També, a tí Mónica por ser una técnico tan mona y eficiente. I a la Virgínia, la nostra doctora preferida.

També al departament d'Anatomia Patològica per tot l'ajut proporcionat i demés: Ana, Dolors, Maria Santacana, Anna Novell i Azahar. Moltes gràcies

A la Anita, Núria Bahí, la Esmeralda, l'Arindam, el Esteban, les nenes de Nefro: l'Anna Cardús, la Eva, la Sara, la Petya, la Milica i la Noelia; així com la Maya, la Maria Cardona, la Mireia, la Gemma Arjó, la Berta, l'Anaïs, la Berta Daussà, la Gemma Masip, la Marta, la Montse, la Vicky, la Adriana, la Charu, la Deepshika, la Cristina i la Carme per compartir tants bons esmorzars, dinars, estones fora del laboratori, etc.

Tampoc hem puc descuidar d'agrair al laboratori on va estar la meua germana, a vosaltres: Myriam, Maria José, Èlia, Anna Garcerá, Gemma Reverté, Stef, Armando y Verónica y també a Omar, Ecatherine, Hugo, Dani, al Ramiro i al "Puigvi" per tantes estones compartides, asados, calçotades, sopars, beures, alguna boda i demés. Moltíssimes gràcies. Sou un a pinya!! Si fes un segon doctorat, el faria amb vosaltres!!

A mis Durhamnianos, como no!! Que experiencia más chula, no? Qué afortunada me siento de haberla compartido con vosotros. Espero veros otra vez, al menos que sea antes de aquí a 10 años, eh!, jaja. A Pakita, a Ana, a Diego, Mari Luz, Vero, Cristóbal, Maria José, Emi, Taisir, Miguel Jacano, Maria Victoria, Miguel Ángel, Ita y a muchos que me dejo.

També volia agrair a les meues amigues de tota la vida, a vosaltres, Marta i Cris per tantes coses que hem passat juntes i les que passarem, així com també al meu estimat Gerard. Sempre seràs el meu cunyaooooo!!

També, com no a la Montse i a la Natàlia, ja que sempre serem les "tates" i així

Agraïments/Agradecimientos/Aknowledgements

com també al Ruben, al Magí i al petit Gabriel. Us duc sempre amb mi.

A les biokímiques Roser i Clarita per tantes anècdotes i experiències compartides.

Al meu germà, el Jordi. D'alguna manera tu ho has fet possible. Gràcies per tot! Per saber tant de fer de germà gran, per la teua intel·ligència i la teua forma de veure la vida. A la meua germana, la M.Alba, perquè tu ho ets tot per mi. Què t'he de dir?. Només els bessons ho saben, eh!

Gracias a tí también Nico, por ser tan interesante, saber escuchar tanto y por saber tanto de psicólogo, en el que he confiado varias veces, jeje.

Als meus pares, per estar sempre amb nosaltres, amb mi i amb els meus germans. Per tot l'esforç incondicional que heu fet per nosaltres. Moltíssimes gràcies.

A tu Francesc, per estar sempre amb mi, per estimar-me tant, per tantes coses... Aquesta tesi va per tu.

Index

<i>Abreviatures</i>	1
<i>Introducció</i>	7
1. DIANES TERAPÈUTIQUES EN EL TRACTAMENT DEL CÀNCER	9
1.1 Concepte de diana terapèutica	9
1.2 Tipus de dianes terapèutiques	10
2. EL MELANOMA	18
2.1 El melanòcit	19
2.2 Incidència, epidemiologia i factors de risc en el melanoma	20
2.3 Alteracions moleculars del melanoma	22
2.3.1 Tumorigènesi i progressió tumoral del melanoma cutani. Mecanismes de transformació neoplàsica del melanoma cutani	24
2.4 Tipus clinicopatològics del melanoma cutani	26
2.5 Estadificació i pronòstic del melanoma cutani	28
2.6 Tractament del melanoma cutani	29
3. EL CARCINOMA D'ENDOMETRI	33
3.1 Alteracions moleculars del carcinoma d'endometri	34
3.2 Tractament del carcinoma d'endometri	36
4. MORT CEL·LULAR PROGRAMADA	37
4.1 Mort cel·lular dependent de caspases	38
4.1.1 Les caspases	38
4.1.2 La via extrínseca de l'apoptosi	40
4.1.3 La via intrínseca de l'apoptosi	41
4.1.4 Les proteïnes de la família de Bcl-2	44
4.1.4.1 Les proteïnes homòlogues a Bcl-2	46
4.1.4.2 Les proteïnes BH3-only	47
4.2 Mort cel·lular independent de caspases	47
4.2.1 AIF	48
5. DIANES TERAPÈUTIQUES EN EL MELANOMA	50
5.1 Situació actual	50
5.2 B-raf	50
5.2.1 Sorafenib	51
5.2.2 PLX4032	51
5.3 C-Kit	51

Índex

5.4 CTLA-4	52
6. DIANES TERAPÈUTIQUES EN EL CARCINOMA D'ENDOMETRI	53
6.1 Situació actual	53
7. ELS RECEPTORS DE LA SOMATOSTATINA COM A DIANES TERAPÈUTIQUES	55
7.1 Anàlegs de las somatostatina	56
8. EL PROTEASOMA COM A DIANA TERAPÈUTICA	58
8.1 Via de senyalització associada al proteasoma: Via NFκB	62
8.2 Els inhibidors del proteasoma	65
8.3 Els inhibidors del proteasoma en el melanoma	69
8.3 Els inhibidors del proteasoma en el carcinoma d'endometri	71
9. ELS RECEPTORS AMB ACTIVITAT TIROSINA CINASA COM A DIANES TERAPÈUTIQUES.....	72
9.1 Vies de senyalització associades als receptors amb activitat tirosina cinasa	77
9.2 Els inhibidors de receptors amb activitat tirosina cinasa.....	80
9.3 Els inhibidors de receptors amb activitat tirosina cinasa en el melanoma.....	85
9.4 Els inhibidors de receptors amb activitat tirosina cinasa en el carcinoma d'endometri	87
<i>Objectius</i>	89
<i>Resultats</i>	93
1. Expression of somatostatin receptors in human melanoma cell lines: effect of two different somatostatin analogues, Octreotide and SOM230 on cell proliferation	97
2. Effect of proteasome inhibitors on proliferation and apoptosis of human cutaneous melanoma-derived cell lines	109
3. Inhibition of activated receptor tyrosine kinase by Sunitinib induces growth arrest and sensitizes melanoma cells to Bortezomib by blocking Akt pathway.....	121
4. Blockade of NFκB activity results in an increase of cell death in Bortezomib-treated endometrial carcinoma cells	135
<i>Discussió</i>	163
1. Les línies cel·lulars de melanoma expressen varis receptors de la somatostatina i són moderadament sensibles als anàlegs de la somatostatina.....	167
2. Els inhibidors del proteasoma indueixen una reducció en la proliferació i una inducció de mort cel·lular, tant dependent com independent de caspases, en línies cel·lulars de melanoma	171
3. La inhibició de receptors amb activitat tirosina cinasa activats per part de Sunitinib indueix una reducció del creixement i sensibilitza les cèl·lules de melanoma a Bortezomib mitjançant el bloqueig de la via Akt	175

4. El bloqueig de la via NFκB resulta en un increment de la mort cel·lular en les línies cel·lulars de carcinoma d'endometri tractades amb Bortezomib..... 179

Conclusions..... 183

Annex..... 187

Apèndix..... 193

Bibliografia..... 203

Abreviatures

AIF: apoptotic inducing factor
Apaf-1: apoptotic-protease-activating factor-1
ATP: adenosin triphosphate
BAFF: B-cell activating factor
Bcl-2: B-cell lymphoma/leukemia-2
BH: Bcl-2 homology domain
CARD: caspase-activation recruitment domain
CED-3: cell-death abnormality-3
CSF-1R: colony-stimulating factor receptor-1
CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CDKs: cyclin-dependent kinases
CML: chronic myeloid leukemia
COSMIC: catalogue of somatic mutations in cancer
DED: death effector domain
DISC: death inducing signaling complex
DNA: deoxyribonucleic acid
DTIC: dacarbazine
EC: endometrial carcinoma
EEC: endometrioid endometrial carcinoma
EGFR: epidermal growth factor receptor
EIF4E: eukaryotic translation initiation factor 4E
ERK: extracellular-signal-regulated kinase
FADD: fas-associated death domain containing protein
FDA: food and drug administration
FGFR: fibroblast growth factor receptor
FLIP: FLICE-like inhibitor
GH: growth hormone
GIST: gastrointestinal stromal tumor

Abreviatures

HER-2: human epidermal growth factor receptor 2

HDAC: histone deacetylase inhibitor

IAP: inhibitor of apoptosis protein

ICE: interleukin-1 β converting enzyme

IGFR: insulin growth factor receptor

I κ B: inhibitor of κ B

IKK: I κ B kinase

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MCR: melanocortin receptor

MDa: Mili Dalton

MDM2: murine double minute 2

MI: microsatellite instability

MITF: microphthalmia-associated transcription factor

MSH: melanocyte stimulating hormone

mTOR: mammalian target of rapamycin

NEEC: non-endometrioid endometrial carcinoma

NF κ B: nuclear factor κ B

PCD: programmed cell death

PCR: polymerase chain reaction

PDGFR: platelet-derived growth factor receptor

PDK-1: PI3K-dependent kinase-1

PDK-2: PI3K-dependent kinase-2

PARP: poly ADP ribose polymerase

PTEN: phosphatase and tensin homolog

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

pRB: retinoblastoma protein

RAC1: ras related C3 botulinum toxine substrat 1

Raptor: regulatory-associated protein of mTOR

RHD: REL homology domain

RGF: radial growth phase

RNA: ribonucleic acid

RTK: receptor tyrosine kinase

RT-PCR: real time-polymerase chain reaction

SCF: stem cell factor

shRNA: short hairpin ribonucleic acid

SST: somatostatin

SSTR: somatostatin receptor

tBid: truncated Bid

TGF- β RII: transforming growth factor β receptor II

TK: tyrosine kinase

TNF: tumor necrosis factor

TRAIL: tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand

TSC1: tuberous sclerosis complex 1

TSC2: tuberous sclerosis complex 2

SST: somatostatin

SSTR: somatostatin receptors

UVR: ultraviolet radiation

UVB: ultraviolet radiation type B

VDAC: voltage-dependent anion channel

VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor

VGf: vertical growth phase

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein

4E-BP: eIF4E binding protein

Introducció

1. DIANES TERAPÈUTIQUES EN EL TRACTAMENT DEL CÀNCER

1.1 Concepte de diana terapèutica

Durant el segle passat, el tractament farmacològic del càncer es basava bàsicament en la quimioteràpia convencional, la qual pot produir efectes secundaris greus. Més tard, van sorgir els tractaments en front a dianes terapèutiques concretes, que contràriament amb la primera teràpia, presentaven una alta especificitat i menors efectes secundaris. La teràpia dirigida contra dianes terapèutiques concretes, lluny de només atacar a les cèl·lules amb més poder proliferatiu com la quimioteràpia habitual, pot atacar a una gran diversitat de processos cel·lulars diferents, responsables del canvi de fenotip que sofreixen les cèl·lules tumorals. La teràpia dirigida contra dianes terapèutiques pot interferir a processos tant dispars com la divisió cel·lular, la migració cel·lular, la mort cel·lular com l'apoptosi, l'angiogènesi i la resposta immune. El desenvolupament de teràpies dirigides requereix la identificació de bones dianes terapèutiques, fet per al que és necessari un estudi molt exhaustiu. Els tractaments en front a dianes terapèutiques actuen inhibint de forma selectiva a molècules, generalment proteïnes, la expressió o la sobreexpressió dels quals, és essencial o està alterada en el creixement de la neoplàsia problema.

De forma molt interessant, el creixement de molts càncers es pot frenar mitjançant la inactivació del producte d'un únic oncogen. Aquest fenomen rep el nom d'adició oncogènica i es refereix a la necessitat que tenen molts càncers de mantenir un únic o varis gens per al manteniment del fenotip maligne. Aquest producte gènic, tendó d'aquí-les d'un determinat càncer, pot representar ser una molt bona diana terapèutica a la qual atacar.

Un exemple de diana terapèutica coneguda i validada és Bcr-Abl en la leucèmia mieloide crònica (CML, **chronic myeloid leukemia**). La quimera Bcr-Abl és el resultat d'una translocació cromosòmica entre el cromosoma 9 i 22 (cromosoma Philadelphia) que ocorre en un alt percentatge en aquesta malaltia¹. Degut a la fusió gènica de tot dos gens, Abl està permanentment activada i aquesta activitat promou la proliferació continuada de les cèl·lules de leucèmia. Per tant, Bcr-Abl representa ser una bona diana terapèutica. D'aquí ve l'èxit del tractament amb Imatinib, un inhibidor selectiu de Bcr-Abl en la CML.

Una vegada ha estat identificada una nova diana terapèutica, el tractament o la teràpia en front a aquesta s'haurà de desenvolupar. La majoria de teràpies dirigides

Introducció

contra dianes terapèutiques solen ser petits inhibidors o anticossos monoclonals. Els petits inhibidors són capaços de difondre's en l'interior de les cèl·lules i actuar sobre les seves dianes intracel·lulars. En canvi, els anticossos monoclonals es dissenyen especialment per atacar dianes extracel·lulars com poden ser els receptors que es trobin anclats en la membrana plasmàtica, ja que no poden penetrar dins la cèl·lula. El desenvolupament dels inhibidors petits solubles utilitzats en la clínica porta molts anys de desenvolupament. El primer pas és l'escaneig farmacològic, en el qual s'identifiquen inhibidors potencials de la diana terapèutica d'entre milers de molècules diferents. El segon pas consisteix en l'adaptació dels millors candidats mitjançant la modificació i l'addició de grups químics, per tal de millorar-ne les propietats. L'objectiu final és obtenir el més efectiu i el més específic possible. En canvi, el disseny d'anticossos monoclonals requereix l'ús d'animals immunitzats, normalment ratolins. Més tard, s'aïllen els diferents anticossos produïts i es fusionen amb cèl·lules de mieloma, formant els hibridomes, per tal de poder produir-los en gran quantitat. Després, s'escolliran els anticossos que reaccionin millor amb la diana terapèutica. Per últim, aquests anticossos s'humanitzaran, mitjançant l'emplaçament de porcions humanes, per evitar el rebuig immunològic.

A pesar de l'elevada especificitat i de la disminució d'efectes secundaris que presenta la teràpia dirigida contra dianes terapèutiques en comparació amb la quimioteràpia convencional, aquesta presenta algunes limitacions. Les cèl·lules tumorals presenten resistència a aquestes amb facilitat i comporta problemes difícils de resoldre. Per exemple, les cèl·lules tumorals poden adquirir mutacions en el gen BCR-ABL després del tractament amb Imatinib, que les fa resistents aquests, degut a l'aparició d'un canvi conformacional que fa perdre afinitat per l'inhibidor. En molts casos, una altra teràpia dirigida que pugués sobrepassar aquesta resistència no s'hi troba disponible. Per aquesta raó, les teràpies dirigides funcionen millor en combinació que en solitari, ja sigui amb una altra teràpia dirigida o amb els tractaments antitumorals tradicionals.

1.2 Tipus de dianes terapèutiques

La teràpia dirigida contra dianes terapèutiques pot afectar a una gran varietat de processos cel·lulars degut a la gran diversitat de dianes terapèutiques descobertes. Així trobem:

- Dianes terapèutiques involucrades en la proliferació cel·lular

Moltes de les molècules que es troben en aquest grup són receptors de factors de creixement (receptors amb activitat tirosina cinasa) o molècules que participen en vies de senyalització amb efecte proliferatiu. Sovint aquestes dianes terapèutiques es troben sobreexpressades i/o activades en càncer en el cas dels oncogenes. Aquesta desregulació porta a l'alteració de les vies de proliferació, com la via de les MAP cinases i la via Akt. Un exemple d'alteració molecular podria ser la que donaria lloc a l'activació constitutiva dels factors de creixement c-Kit i PDGFR α o EGFR en el cas dels tumors del tracte gastrointestinal (GIST, **g**astrointestinal **s**tromal **t**umors) o en el càncer de pulmó respectivament. També, es podria produir una alteració de la via de les MAP cinases degut a mutacions activadores de proteïnes involucrades en aquesta via com B-raf i proteïnes de la família Ras, com és en el cas del melanoma. Un altre exemple podria ser una activació constitutiva de la via PI3K/Akt/mTOR. L'activació d'aquest eix de senyalització pot ser deguda a mutacions, delecions i silenciaments del gen supressor tumoral PTEN o del gen implicat en el cicle cel·lular CDKN2A. Més directament, es pot donar l'activació de la subunitat catalítica de PI3K. Aquesta proteïna i d'altres activades (o sobreexpressades) en les vies anteriorment mencionades podrien resultar, en un primer moment, bones dianes terapèutiques.

Exemples de teràpies dirigides contra aquestes dianes terapèutiques són Imatinib mesylate, Sunitinib, Trastuzumab i Temsirolimus. Imatinib² és un inhibidor petit de receptors amb activitat tirosina cinasa (RTK, **r**eceptor **t**irosine **k**inase) que inhibeix amb alta eficiència Bcr-Abl i c-Kit, i que s'usa per al tractament de leucèmies i GIST, càncers que manifesten alteracions en aquestes molècules. Sunitinib és un inhibidor petit de RTK que ha resultat ser efectiu en GIST resistents a Imatinib, degut a la inhibició de c-Kit. Trastuzumab és anticòs monoclonal dissenyat específicament contra HER-2 (**h**uman **e**pidermal **g**rowth **f**actor **r**eceptor **2**), utilitzat només en els càncers de mama que el sobreexpressen³. Temsirolimus és un inhibidor petit de la serina/treonina cinasa mTOR (**m**ammalian **t**arget **o**f **r**apamycin), activada en el carcinoma renal. Apart, d'aquests es troben una gran varietat de fàrmacs que ja han estat aprovat per la FDA (**F**ood and **D**rug **A**dministration) que estan dirigits contra dianes terapèutiques concretes.

- Dianes terapèutiques que regulen la expressió gènica

L'acetilació d'histones és el mecanisme epigenètic principal de remodelatge de la cromatina que regula l'expressió gènica. Aquesta consisteix en l'addició de grups acetils en la seqüència terminal dels residus de lisina de les histones que converteix la cromatina en eucromatina. Aquesta cromatina adquireix una forma més laxa i menys

Introducció

condensada, la qual pot esdevenir activada transcripcionalment. La eliminació de grups acetils, i per tant, la inducció del silenciament gènic, la duen a terme els enzims anomenats deacetilases d'histones (HDACs, **histone deacetylases**). Basats en aquest coneixement es van dissenyar els inhibidors de HDACs. En actuar sobre l'acetilació de gens clau per a la cèl·lula, la seva inhibició d'aquests enzims condueix a múltiples alteracions cel·lulars. Així doncs, en el càncer, aquests agents inhibeixen la proliferació de les cèl·lules tumorals, promouen la diferenciació i indueixen apoptosi. Apart de mantenir l'acetilació del DNA, els inhibidors de HDACs poden acetilar factors de transcripció com el de P53, GATA-1 (factor de diferenciació d'eritròcits) i el receptor d'estrògens alfa (ERalpha).

Un altre compost que regula la expressió gènica és l'àcid retinoic, la principal forma activa de la vitamina A. Quan l'àcid retinoic s'uneix al seu receptor nuclear regula la expressió gènica d'aquells gens que controlen el creixement, la diferenciació, la supervivència i la mort cel·lular.

Exemples de teràpies dirigides contra aquest tipus de dianes terapèutiques són Vorinostat i Bexarotene. Vorinostat és un inhibidor de HDACs aprovat per la FDA l'any 2006 per al tractament del limfoma cutani de cèl·lules T⁴. Bexarotene és un anàleg de la vitamina A, que pertany a la família dels retinoids i ha estat aprovat per al tractament d'alguns casos de la mateixa neoplasia.

- Dianes terapèutiques que indueixen apoptosi

Algunes teràpies dirigides són capaces d'induir apoptosi directament mitjançant l'acció sobre certs orgànuls o processos essencials per la homeòstasi cel·lular, dels quals en depenen més les cèl·lules malignes que les normals. Exemples d'aquestes són Bortezomib i Pralatrexate. Bortezomib és un inhibidor del proteasoma que ha estat aprovat per al tractament del mieloma múltiple⁵. El proteasoma és un complex multienzimàtic encarregat de la degradació de les proteïnes d'origen intracel·lular que inclou aquelles proteïnes implicades amb diverses funcions fonamentals de la cèl·lula. S'ha vist que la inhibició del proteasoma provoca apoptosi, tant en cèl·lules normals com malignes, però d'una manera més intensa en aquestes últimes. Pralatrexate és una molècula utilitzada en el tractament de limfoma perifèric de cèl·lules T que interfereix en la síntesi de DNA de les cèl·lules en divisió, particularment en aquelles que sobreexpressen RFC-1, la subunitat del factor C de replicació⁶.

- Dianes terapèutiques que afavoreixen la pèrdua d'adhesió i la invasió

Una de les característiques de les cèl·lules tumorals és la seva capacitat de desadherir-se del seu teixit d'origen, migrar i invair altres teixits, fets que afavoriran la metàstasi. Perquè això es produeixi cal una sèrie de canvis en el patró d'expressió de determinades molècules en les cèl·lules tumorals. Per començar les cèl·lules poden sofrir un procés conegut com a transició d'epitel·li a mesènquima. Per fer-ho, hauran de perdre l'expressió de proteïnes epitel·lials d'adhesió com la E-cadherina i expressar-ne d'altres com la N-cadherina, responsable de l'adhesió a l'endotel·li vascular, integrines i metal·loproteïnases, responsables de la migració i de la degradació de matriu extracel·lular. Exemples de tractaments contra aquestes dianes terapèutiques són Etaracizumab o ADH-1. Etaracizumab és un anticòs monoclonal dissenyat contra la integrina $\alpha\beta3$, que inhibeix la proliferació, indueix apoptosi en les cèl·lules neoplàsiques i exerceix un efecte antiangiogènic^{7, 8}. ADH-1 és un inhibidor de la N-cadherina, la qual cosa impediria l'angiogènesi⁹.

- Dianes terapèutiques que regulen l'angiogènesi

Altres teràpies estan dirigides a atacar certs processos que només es donen en les cèl·lules tumorals. Un cop els tumors han arribat a una certa mida, requereixen de la irrigació sanguínia que els facilitarà l'aport de nutrients i oxigen necessari per al seu creixement. Les cèl·lules tumorals secreten factors de creixement i citoquines que atreuen i estimulen el creixement dels vasos sanguinis. Un exemple n'és el VEGF (**v**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor). Aquest s'uneix al seus receptors (VEGFR, **v**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor receptor) presents en les cèl·lules endotel·lials i aquesta unió promourà el creixement de nous vasos sanguinis.

Aquelles teràpies dirigides contra aquestes dianes terapèutiques bloquejaran el creixement de vasos sanguinis, i frenaran el creixement tumoral. Exemples de teràpies dirigides contra dianes terapèutiques que afecten l'angiogènesi són Bevacizumab, Sorafenib i Sunitinib. Bevacizumab és un anticòs monoclonal contra VEGF, aprovat per al tractament del glioblastoma, alguns casos de càncer de pulmó de cèl·lula no petita¹⁰, càncer de mama, càncer colorectal i per la metàstasi del carcinoma renal. El bloqueig de VEGF evita que interaccioni amb el seu receptor en les cèl·lules endotel·lials. Sorafenib és un inhibidor petit de proteïnes amb activitat tirosina cinasa, que ha estat aprovat per al tractament del carcinoma renal i alguns casos de carcinoma hepatocel·lular¹¹. Aquest inhibidor inhibeix B-raf però també els VEGFR. Sunitinib està

Introducció

aprovat per al tractament del carcinoma renal i els tumor pancreàtics¹². En aquests tumors, interfereix en la senyalització de VEGF-VEGFR, en inhibir aquests receptors.

- Dianes terapèutiques que regulen la resposta immune

Molts tumors desencadenen una resposta immune, amb la qual el sistema immune intenta destruir-los. No obstant, les cèl·lules tumorals disposen d'una sèrie d'estratègies per burlar aquesta resposta. Les teràpies dirigides d'aquest àmbit van encaminades a evitar l'escapament de les cèl·lules tumorals de l'acció del sistema immune o a potenciar la resposta immune. Una de les maneres de lluitar contra aquests mecanismes és inhibir un receptor del limfòcits T, anomenat CTLA-4. Aquesta molècula es troba en la superfície dels limfòcits T activats i competeix amb la molècula CD28 limfocitària per la unió a la molècula B7 de les cèl·lules presentadores d'antígens. La unió de CTLA-4 amb B7 inhibeix l'acció dels limfòcits T¹³. Si s'inhibeix CTLA-4 s'evita que això passi. Ipilimumab i Tremelimumab són dos anticossos monoclonals especialment dissenyats per inhibir CTLA-4¹⁴. La seva acció trenca la immunotolerància i estimula al sistema immune a atacar a les cèl·lules tumorals. Ipilimumab ha estat aprovat recentment per al tractament del melanoma metastàtic¹⁵.

- Inhibició de múltiples dianes terapèutiques i teràpia combinada

La primera onada de teràpies dirigides contra el càncer va anar enfocada cap a la inhibició de dianes terapèutiques com factors de creixement i proteïnes de les seves vies de senyalització "downstream". Però aviat es va fer evident que la utilització de fàrmacs en monoteràpia, encara que a vegades mostrés efectes antitumorals remarcables, no era suficient per a erradicar el tumor. Donada la heterogeneïtat genètica i la plasticitat de molts càncers, és bastant improbable que l'ús d'una única teràpia dirigida produeixi la remissió total d'un càncer. Pot ser que els tumors perdin l'adició oncogènica i apareixin les resistències. Els mecanismes de resistència s'estan estudiant detingudament i es creu que poden ser deguts a l'aparició de mutacions secundàries en la mateixa diana terapèutica o en altres proteïnes, o a altres aberracions genètiques. Per exemple, les mutacions en KIT estan associades a una menor unió de l'inhibidor al receptor en GIST, les quals disminuirien els beneficis que Imatinib tenia en un principi¹⁶. En el cas del melanoma, la resistència al fàrmac PLX4032 es creu que pot ser deguda a l'aparició de mutacions secundàries en NRAS¹⁷ o PDGFR β ¹⁸. Altres aberracions podrien activar altres vies de senyalització, com la de la PI3K, que al final no podrien superar els efectes de la teràpia dirigida¹⁹. Per tant, sembla ser que en molts càncers s'activen múltiples vies de senyalització aberrants i

redundants com a resultat de modificacions genètiques a diferents nivells. També diversos fàrmacs o agents poden activar vies indegudes de supervivència que podrien ser bloquejades mitjançant l'ús d'una segona teràpia. Aquesta realitat fa patent la necessitat d'administrar teràpies combinades per superar tota aquesta complexitat de senyalitzacions.

Les teràpies combinades han tingut èxit en nombrosos càncers, en quimioteràpia convencional com amb radioteràpia o teràpies contra dianes terapèutiques. Per exemple, el limfoma de Hodgkin s'ha pogut curar mitjançant l'administració combinada de mustargen, vincristina, procarbazona i prednisona, mentre que la utilització de cada fàrmac per separat no donava pràcticament cap resultat positiu. També s'han combinat nombrosos fàrmacs amb la radiació ionitzant amb èxit, per exemple 5-fluorouracil en el cas del càncer colorectal²⁰ o cetuximab en el cas del càncer de cap i coll²¹. També, la utilització de teràpies dirigides juntament amb citotòxics han produït respostes més favorables que els agents per si sol, com per exemple, l'ús de bevacizumab amb 5-fluorouracil, leucovorina o oxaliplatí en el càncer colorectal²². Per tant, sembla raonable, la utilització de teràpies combinades per al tractament del càncer, per tal d'incrementar l'efecte antiproliferatiu del tractament.

Quan un o més fàrmacs es combinen, i cap fàrmac influencia l'altre, es produiria un efecte additiu. En canvi, quan dos fàrmacs s'influencien, sorgiria un efecte sinèrgic o antagonístic. En un efecte sinèrgic, l'efecte final és més potent que la suma dels efectes de tots dos fàrmacs per separat. Un efecte sinèrgic entre dos fàrmacs té un significat mèdic important, ja que vol dir que per a una dosi menor de fàrmac s'està aconseguint el mateix efecte antiproliferatiu i, com a conseqüència menys efectes secundaris i adversos per al pacient. S'ha argumentat molt sobre la teràpia combinada ideal. Molts autors apunten cap a la "inhibició vertical". Un exemple podria ser la inhibició de PI3K, Akt i mTOR a la vegada. En canvi, altres autors apunten cap a la "inhibició horitzontal", on els dos fàrmacs actuen en dues vies de senyalització diferents en la que existeix una comunicació i així es potencien els seus efectes. Un exemple seria l'efecte sinèrgic que presenta la inhibició de mTOR per part de Everolimus en combinació amb un inhibidor de MEK²³, degut al bucle de regulació creuat que existeix entre dues vies de senyalització. Fins i tot, es pot inhibir la mateixa molècula mitjançant diferents mecanismes. Per exemple, s'ha trobat que la combinació d'Imatinib amb altres inhibidors de segona generació com Nilotinib o Dasatinib resulta efectiva degut a que aquests últims poden inhibir c-kit aquells tumors

Introducció

que han adquirit resistències a Imatinib²⁴. Si més no, totes tres aproximacions han donat com a resultat efectes sinèrgics esperançadors.

En el càncer, un bon exemple de teràpia combinada, extensament explotada, és la combinació d'inhibidors de RTK amb la radioteràpia i amb altres fàrmacs. Amb la utilització d'inhibidors de RTKs es pot aconseguir una normalització del flux sanguini en el tumor, ja que s'inhibeixen receptors clau en l'angiogènesi, els VEGFRs i PDGFRs. Aquest fet afavoriria la distribució homogènia d'un segon fàrmac arreu en el volum tumoral. També, s'han utilitzat els inhibidors de RTKs en combinació amb la radioteràpia per dues raons. La primera és que la normalització del flux sanguini per part dels RTKs fa desaparèixer les zones d'hipòxia, amb la qual cosa l'aport d'oxigen arriba fins i tot a les zones més allunyades i interiors del tumor, augmentant-se així l'eficàcia de la radiació ionitzant, la qual requereix de l'oxigen per generar espècies reactives d'oxigen i matar les cèl·lules. La segona és perquè se sap que la radiació ionitzant pot activar nombroses vies de supervivència, ja sigui directament, o indirectament activant o induint la síntesi de lligands de factors de creixement o dels factors de creixement en si. Amb l'administració d'un inhibidor de RTK se suprimiria aquest efecte indesitjat. També simplement, l'ús d'inhibidors de RTK's amb altres fàrmacs podria fer baixar el llindar de susceptibilitat a mort o apoptosi de les cèl·lules al fàrmac utilitzat o agent utilitzat.

En aquesta línia, són nombrosos els estudis que demostren com els inhibidors de RTK's poden alterar el flux sanguini i millorar la distribució de fàrmacs arreu en el tumor, com Imatinib²⁵⁻²⁷, Bevacizumab¹⁰ i Sorafenib²⁸. Aquest últim treball en un model *in vivo* de melanoma. També s'ha utilitzat la combinació d'inhibidors de RTKs com Sunitinib²⁹, Sorafenib³⁰ i inhibidors de EGFR (**e**pidermal **g**rowth **f**actor **r**eceptor)³¹,³² juntament amb la radioteràpia, veient-se un efecte avantatjós amb la radiació ionitzant. A més, s'ha vist que els inhibidors de RTK poden sensibilitzar a la mort per nombrosos agents quimioterapèutics i fàrmacs. Un exemple, n'és la utilització de Sorafenib en combinació amb amb oxaliplatí, cisplatí, rapamicina, l'inhibidor de Bcl-2 ABT-737 i TRAIL³³⁻³⁶.

Pel que fa referència a la utilització d'inhibidors del proteasoma amb inhibidors de RTK, hi ha nombrosos treballs en la bibliografia que descriuen un efecte sinèrgic entre aquestes dues teràpies en una gran varietat de models cel·lulars, com cèl·lules de CML, glioblastoma, carcinoma hepàtic, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma renal, càncer colorectal o càncer de mama. Per exemple, s'han utilitzat inhibidors de EGFR

com Gefitinib, Vandetanib i Cetuximab en combinació amb Bortezomib³⁷⁻³⁹. També s'ha vist un efecte sinèrgic amb la utilització de Imatinib i Bortezomib^{40, 41}, així com amb la combinació de Sorafenib i Bortezomib^{42, 43}. Moltes d'aquestes combinacions han resultat avantatjoses perquè Bortezomib, per si sol, no s'ha mostrat suficientment capaç d'inhibir Akt, però, en canvi, combinant-lo amb inhibidors de EGFR ha permès una inhibició total d'aquesta via de senyalització. D'altra banda, la combinació de Bortezomib amb Sorafenib ha donat com a resultat una activació de la via d'estrès cel·lular de les JNK (stress- related c-Jun **NH2-terminal kinase**) o una sotaregulació de la proteïna antiapoptòtica Mcl-1. En el cas d'Imatinib i Bortezomib, la combinació d'aquests dos fàrmacs dona com a resultat una sobreregulació de PP2A, un regulador negatiu de Bcr-Abl o bé una disminució de l'expressió i fosforil·lació d'aquesta quimera oncogènica. En la majoria de casos, l'efecte sinèrgic s'ha fet patent per un increment de l'apoptosi, observant-se així un increment del tall de caspases, la sortida de citocrom C o la disminució de la proteïna antiapoptòtica Bcl-2 amb la combinació de tots dos fàrmacs, la qual no s'ha observat utilitzant els fàrmacs per separat.

En conclusió, per totes aquestes evidències descrites anteriorment i donada la complexitat, la heterogeneïtat i la connexió existent entre moltíssimes vies de senyalització intracel·lulars en els tumors, és raonable anticipar que la teràpia combinada dirigida, utilitzant diferents fàrmacs i agents, serà més potent i avantatjosa que la monoteràpia. No obstant, s'ha de tenir en compte certs aspectes com la toxicitat a l'hora d'introduir les teràpies combinades. Per exemple, dos teràpies que interaccionen de forma sinèrgica també poden induir una toxicitat sinèrgica en el pacient. Així doncs, s'haurà de buscar un balanç entre la seva toxicitat i la seva potència curativa. La utilització de teràpies combinades no és més que una petita aportació al que serà el tractament del càncer en un futur, l'anomenada teràpia personalitzada

2. EL MELANOMA

El melanoma és un tipus de càncer de pell que consisteix en la transformació maligna dels melanòcits. Els melanòcits són unes cèl·lules especialitzades situades en la membrana basal de l'epidermis que s'encarreguen de produir melanina, un pigment de la pell, ulls i cabell, la funció del qual és la de bloquejar els rajos ultraviolats solars, evitant que danyin el DNA cel·lular. El melanòcit és una cèl·lula dendrítica que en el seu origen deriva de la cresta neural i migra cap a la epidermis i el fol·licle pilós durant l'embriogènesi.

La majoria dels melanomes deriven dels melanòcits de la pell (melanoma cutani). Molt més rarament, existeixen melanomes que s'originen a l'iris o a la coroides (melanoma ocular), en les mucoses anorectal, genital, oral, nasal, etc. (melanoma de musoses) i fins i tot, en òrgans interns (melanoma de glàndula suprarenal, meninges o primari ganglionar). En la pell, el melanoma sol iniciar-se en els melanòcits de la unió dermoepidèrmica. Aquest tipus de melanoma s'anomena melanoma *de novo*, el qual és esporàdic. També es poden originar a partir d'una lesió preexistent, com per exemple, un nevus congènit o un nevus displàsic. Aquest tipus de melanoma s'anomena melanoma sobre nevus.

El melanoma no és una malaltia nova. Ja se'n data de la seva existència centenars d'anys enrere. Un exemple es troba en un examen fet el 1960 en nou mòmies del Perú, amb una antiguitat al voltant dels 2400 anys. Aquestes presentaven signes evidents de melanoma: masses melàniques en metastasis cutànies i difoses als ossos. L'any 1787, John Hunter es divulga com el primer en operar el melanoma metastàtic. Malgrat no saber exactament el que era, el va descriure com una excrescència fungosa cancerosa. El tumor extirpat es conserva actualment en el Museu Hunter del Col·legi Real de Cirurgians d'Anglaterra. No va ser fins al 1968 que l'examen microscòpic de la mostra revelà que era un exemple de melanoma metastàtic. Més tard, el metge francès René Laennec fou el primer en descriure el melanoma com una entitat de la malaltia. El seu informe fou presentat inicialment durant una conferència de la Facultat de Médecine de París l'any 1804 i fou posteriorment publicat en un butlletí l'any 1806. L'any 1857, William Norris va observar que existia una predisposició familiar per al desenvolupament del melanoma, tal i com s'explica en el primer informe en idioma anglès sobre melanoma: vuit casos de melanosí amb patologia i comentaris terapèutics sobre la malaltia. El primer reconeixement formal del melanoma avançat com un tumor intractable va venir de la mà de Samuel Cooper l'any 1840. Ell va afirmar que les possibilitats de supervivència depenien considerablement

de la eliminació temprana del tumor. Un segle i mig més tard, aquesta situació és pràcticament igual.

2.1 El melanòcit

El melanòcit es caracteritza per tenir un nucli ovalat i presentar dendrites. En condicions normals els melanòcits es disposen a nivell de la capa basal epidèrmica contactant amb els queratinòcits mitjançant les seves dendrites. La densitat de melanòcits es variable depenent de la regió anatòmica, però molt constant entre els individus de diferents races, però mai superen el 10% del total de tipus cel·lulars presents en la epidermis. El color de la pell depèn de la seva activitat. La melanina pot ser de eumelanina (color marró) o feomelanina (pigment vermell groguenc). Totes dues són produïdes a partir d'una tirosina, en el reticle endoplasmàtic rugós i l'aparell de Golgi en arribar a la cèl·lula la hormona estimulante del melanòcit (MSH, **m**elanocyte **s**timulating **h**ormone) que es fixa al receptor de la membrana d'aquest (MCR). En l'ésser humà, la melanina es troba en la pell, el cabell, en el recobriment de la retina, en la medul·la adrenal, en la zona reticular de la glàndula adrenal, l'òidra interna, i en el cervell, en la *substància nigra* i el *locus ceruleus*. La melanina constitueix un factor de protecció fisiològica en front a les radiacions ultraviolades.

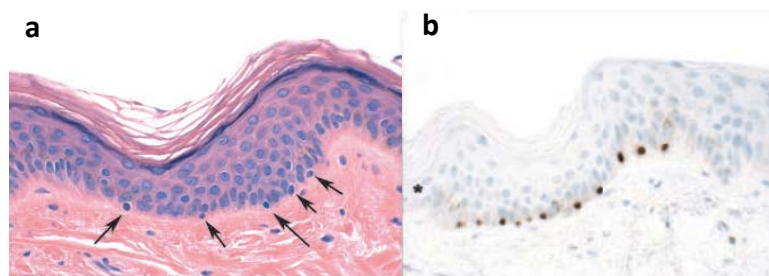


Figura 1. a. Tinció de pell humana normal amb hematoxilina i eosina. Les cèl·lules de la part superior de la secció (queratinòcits) contenen un nucli gran i blau. Els melanòcits normals tenen un nucli més petit i un citoplasma inapreciable comparat amb els queratinòcits del voltant. Els melanòcits estan localitzats típicament en la membrana basal de la epidermis, en conjunció amb la dermis. b. Anàlisi immunohistoquímica de la mateixa mostra de teixit, tenyida amb el marcador D5, que tenyeix el factor de transcripció MITF (microphthalmia-associated transcription factor) localitzat en els nuclis dels melanòcits. (Modificat de: Lin JY. et al. *Nature*, 2007, 445:843-850)⁴⁴

2.2 Incidència, epidemiologia i factors de risc en el melanoma

El melanoma és el càncer més letal de tots els tipus de càncers de pell. El melanoma només engloba el 4% de tots els càncers de pell però n'és el responsable del 80% de morts d'aquests. Només el 14% dels pacients amb melanoma metastàtic sobreviu als cinc anys⁴⁵. La incidència del melanoma està incrementant d'una manera alarmant, degut principalment a l'ús recreatiu que se'n fa de l'exposició solar. De fet, és el càncer que s'està incrementant més entre la població de pell clara arreu del món, incloent Europa i Estats Units⁴⁶. L'augment anual de les taxes d'incidència varia entre el 3 i el 7% en els diferents països de població de pell caucàsica⁴⁷.

Entre aquestes zones geogràfiques, cal destacar que Austràlia i Nova Zelanda són els països que presenten la incidència i la mortalitat de melanoma més elevades del món. Entre els anys 1980 i 1987, a Queensland, Austràlia, la taxa d'incidència era de 55,8 casos per 100.000 habitants per any, en homes, i de 42.9 en dones. Amb aquesta incidència, el melanoma a Austràlia s'ha convertit en el quart tumor més freqüent en homes i el tercer més freqüent en dones. Actualment s'estima que 1 de cada 25 homes i 1 de cada 34 dones a Austràlia desenvoluparan un melanoma al llarg de la seva vida⁴⁸. A Europa, existeix una diferència clara entre el nord i el sud. Així mateix, els països nòrdics presenten 15 casos de melanoma per 100.000 habitants i per any, i els països de la conca mediterrània 6 casos per cada 100.000 habitants i per any, entre ells Espanya⁴⁹. S'ha de dir, però, que en aquest països s'ha produït un augment important de melanomes en els últims anys.

Aquestes evidències són especialment rellevants, tenint en compte diversos factors. És un càncer que afecta majoritàriament a gent jove i de mitjana edat, metastatitza amb facilitat i és altament resistent als tractaments antineoplàsics convencionals.

Pel que fa a la mortalitat per melanoma, aquesta ha augmentat més ràpid que en la resta de càncers, a excepció de pocs. No obstant, l'augment de la taxa de mortalitat per melanoma en la població blanca en els últims anys no ha estat tan elevada com la seva taxa d'incidència. La taxa de mortalitat anual varia de 1-3 casos per 100.000 habitants en l'hemisferi nord fins a 5-10 casos en països de l'hemisferi sud com Austràlia i Nova Zelanda.

Nombrosos estudis epidemiològics mostren que la radiació ultraviolada solar (UVR, **ultraviolet radiation**) és el principal factor de risc per a l'inici del melanoma, principalment els rajos de tipus B (UVB, **ultraviolet radiation type B**)⁵⁰. Almenys, és l'únic factor ambiental conegut. No obstant, els mecanismes a partir dels quals la UVR inicia el melanoma encara es desconeixen. Es creu que la UVR pot predisposar a la transformació tumoral mitjançant diferents mecanismes. En primer lloc, se sap que la UVR, en ser una radiació ionitzant, incrementa la producció de radicals lliures⁵¹ en l'entorn de la possible lesió, danyant diferents components cel·lulars com el DNA i les proteïnes. Especialment la pell, n'és una diana principal, degut a la seva extensa superfície. Aquest fet, seria especialment rellevant si, a part, existeix una deficiència en la reparació del dany al DNA, com per exemple, en el cas del síndrome hereditari del *xeroderma pigmentosum*, on els individus afectats presenten una alta predisposició al melanoma. En segon lloc, la UVR indueix una supressió del sistema immunitari⁵², ja sigui per la disminució de les cèl·lules de Langerhans, afectant el sistema de presentació d'antígens, com per a disminució dels limfòcits T. Ambdós fets conduiran a la invisibilitat de les cèl·lules ja tumorals per part del sistema immunitari.

A pesar de l'important paper que tenen els UVR en la gènesi *de novo* d'un melanoma, no s'ha de depreciar la empremta genètica de cada individu. En aquest sentit, s'han identificat nombroses mutacions en determinats gens que augmenten el risc de patir el melanoma. Dins dels gens d'alta penetrància trobem els gens CDKN2A (**cyclin-dependent kinase inhibitor 2A**)/INK4 i CDK4 (**cyclin-dependent kinase 4**). El gen CDKN2A codifica per dos proteïnes depenent de les formes d'*splicing*: p16 i p14^{ARF} (p14 **alternative reading frame**); també coneguda com p19. Ambdós proteïnes són reguladores negatives del cicle cel·lular. p16 és un inhibidor de CDK4, que al seu torn s'uneix a ciclina D i fosforil·la pRB (**retinoblastoma protein**), el qual allibera els factors de transcripció E2F que promouen la transició entre les fases G1 i S, afavorint la proliferació del melanòcits. D'altra banda, p14^{ARF} és un inhibidor de MDM2 (**murine double minute 2**), que al seu torn accelera la destrucció de p53. La pèrdua de p53 comporta a la cèl·lula un desajustament dels punts de control del cicle cel·lular i en la capacitat d'induir apoptosi. La seva deleció i mutació és altament prevalent en casos de melanoma familiar⁵³ (del 25 al 40%) i comporta una desregulació severa del cicle cel·lular, afavorint la proliferació dels melanòcits. Pel que fa al gen CDK4, similarment amb el que passa amb el gen CDKN2A, participa també en una via de supressió tumoral i s'ha descrit igualment com un gen de susceptibilitat al melanoma.

Introducció

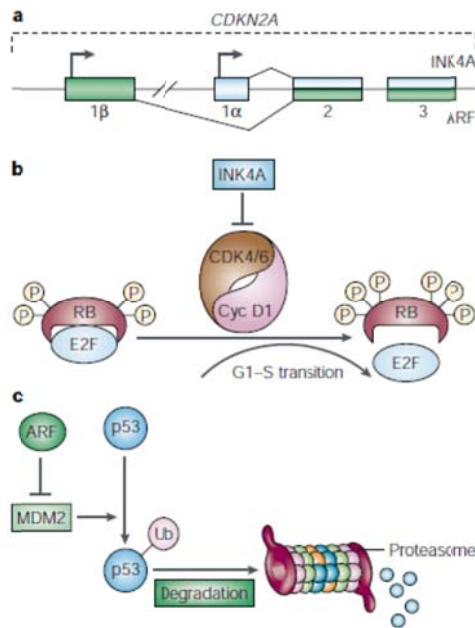


Figura 2. a. Trànscrits del gen CDKN2A: INK4A (p16) i ARF (p14^{ARF}). b. p16 controla la transició entre G1-S regulada per retinoblastoma (RB). c. p14^{ARF} actua com un potent supressor tumoral evitant la degradació de p53 mediada per MDM2. (Modificat de: Chin L. et al. *Nature Reviews Cancer*, 2003, 3:559-570)⁵⁴.

Pel que fa a gens de baixa penetrància trobem el gen MC1R (**melanocortin 1 receptor**). Aquest gen s'expressa en els melanòcits i la proteïna resultant té un paper rellevant en la síntesi de melanina. Concretament, quan la proteïna està activada indueix la síntesi de eumelanina (pigment melànic marró o negre) mentre que quan està poc activada es produeix feomelanina (pigment melànic groc o vermell). Les variants al·lèliques disfuncionals, en el gen MC1R, que produeixen poca activitat de la proteïna resultant, són relativament freqüents entre la població pèl-roja i estan associades a un increment en el risc de patir melanoma⁵⁵, ja que l'absència d'eumelanina resta protecció contra la UVR en aquests individus.

2.3 Alteracions moleculars del melanoma

L'any 2002, Davies i col·laboradors varen trobar que el 66% dels melanomes presentaven una mutació somàtica en el gen BRAF⁵⁶. B-raf és una serina/treonina cinasa, la qual és el component central de la via de les MAPKs, **mitogen-activated**

protein kinase (Ras-Raf-Mek-Erk). Aquesta via regula el creixement cel·lular, la proliferació i la diferenciació en resposta a varis factors de creixement, citoquines i hormones. Les mutacions en BRAF són més comuns en aquells melanomes que ocorren en pell que ha estat exposada al sol de forma intermitent. El 81% dels melanomes que ocorren en pell que no ha sofert una exposició crònica al sol presenta mutacions en BRAF⁵⁷. Igualment que BRAF, NRAS es troba freqüentment mutat en els melanomes que ocorren en les mateixes condicions. En canvi, la majoria d'aquells melanomes situats en zones no exposades crònicament al sol com els palmells de les mans, soles dels peus (melanoma acral) i mucoses, juntament amb aquells melanomes ocorreguts en pell exposada crònicament al sol, no presenten mutacions en BRAF ni NRAS.

De forma interessant, aquells melanomes amb BRAF i NRAS salvatge, presenten un número més elevat de còpies dels gens CDK4 i CCND1 (gen de la ciclina D1). Tots dos gens codifiquen per proteïnes que participen en la fase G1 del cicle cel·lular i que són activats per la via de les MAPKs⁵⁷.

S'han trobat mutacions en PTEN en el melanoma, però en baixa freqüència. PTEN és un gen supressor tumoral que regula negativament la via Akt, una via de proliferació i supervivència.

Recentment, s'ha trobat amplifícacions somàtiques del gen MITF (**m**icrophthalmia-associated **t**ranscription **f**actor) en el 15-20% dels melanomes metastàtics⁵⁸. MITF és un factor de transcripció que regula la diferenciació del melanòcit. L'amplificació d'aquest contribueix a un nou mecanisme carcinogènic.

Pel que fa al gen KIT, Curtin i col·laboradors⁵⁹ van trobar que el 39% dels melanomes de mucoses, el 36% dels melanomes acrals i el 28% dels melanomes sobre pell amb dany solar crònic presentaven un augment en el número de còpies del gen KIT, mentre que aquells melanomes sobre pell sense dany solar crònic no en presentaven. A més, el 79% dels tumors amb mutacions en KIT i el 53% dels tumors amb múltiples còpies de KIT van mostrar un augment en els nivells de c-Kit en la fase de creixement vertical. Aquest fet indicaria que l'increment de l'expressió de Kit és essencial per a la progressió d'aquests melanomes. Pel que fa a mutacions en KIT, aquestes s'han descrit normalment en els melanomes acrals i de mucoses.

Recentment, s'han descrit mutacions en el gen que cofifica per la subunitat alfa de la proteïna GNAQ en el 50% dels melanomes uveals (oculars)⁶⁰. GNAQ codifica per les subunitats alfa de les proteïnes G de classe q, les quals duen a terme la

Introducció

senyalització entre els receptors acoplats a proteïnes G i els seus efectors downstream, com per exemple Ras.

2.3.1 Tumorigènesi i progressió tumoral del melanoma cutani. Mecanismes de transformació neoplàsica del melanoma cutani

La progressió del melanoma cutani varia depenent si el seu origen és el d'un melanoma *de novo* o d'un melanoma sobre nevus. El 70% dels melanomes són melanomes *de novo* i el 25% restant són melanomes que ocorren sobre nevus preexistents.

En el cas dels melanomes sobre nevus, s'han establert cinc estadis per a la transformació i progressió tumoral del melanòcit, basant-se en criteris clínics, histopatològics, immunopatològics, citogenètic i propietats *in vitro*: (1) nevus melanocític benigne, sense canvis displàsics, (2) nevus displàsic estructuralment atípic, (3) melanoma primari en fase de creixement radial (**RGF**, **radial growth phase**), (4) melanoma primari en fase de creixement vertical (**VGF**, **vertical growth phase**) i (5) melanoma maligne metastàtic. Els precursors del melanoma, tant el nevus benigne com el nevus displàsic, es caracteritzen per una disrupció en la melanina epidèrmica. Aquest fet comporta un increment en el nombre de melanòcits en relació amb els queratinòcits. Aquestes lesions precursoras poden progressar en el melanoma *in situ*, el qual creix radialment i resta confinat en la epidermis. Aquesta fase es defineix com la RGF. En canvi, en la VGF, el tumor pot envair la capa més superficial de la epidermis i penetrar cap a la dermis i el teixit subcutani, travessant la membrana basal. Es creu que la transició desde la RGF fins a la VGF és un pas crucial en la evolució del melanoma que presagia l'adquisició de la capacitat de metastatitzar, la qual cosa determina un mal pronòstic. En relació amb l'esquema, en la RGF, les cèl·lules de melanoma requereixen dels factors tròfics sintetitzats pels queratinòcits per sobreviure, són incapaces de créixer independentment de substrat i són no tumorigèniques. En canvi, les cèl·lules en la VGF han aconseguit escapar del control dels queratinòcits, han establert connexions amb els fibroblasts, han adquirit la capacitat de créixer independentment de substrat tròfic i són altament tumorigèniques.

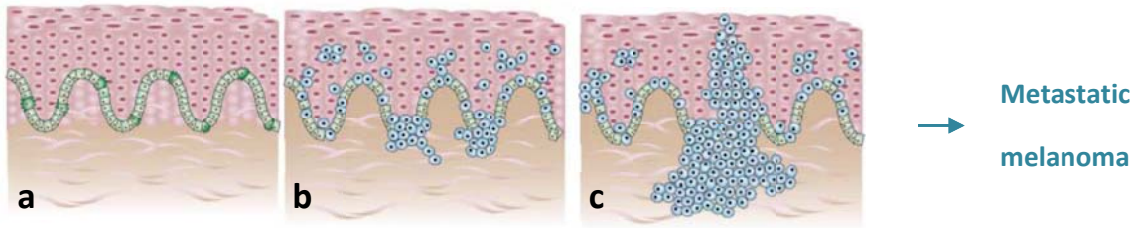


Figura 3. Esquema que mostra les diferents fases del melanoma. a. Pell normal. b. RGF. c. VGF. (Modificat de: Chin L. et al. Nature Reviews Cancer, 2003, 3:559-570)⁵⁴

Els canvis histològics que tenen lloc durant la evolució del melanoma, des del nevus benigne fins al melanoma metastàtic es poden relacionar amb les mutacions genètiques puntuals que s’ha vist que tenen lloc en els diferents estadis de progressió del melanoma. La següent figura mostra les lesions moleculars que tenen lloc durant el procés de transformació del melanòcit situat sobre un nevus preexistent.

En un primer moment, apareix la mutació en BRAF en l’estadi del nevus benigne. En ser B-raf un component “upstream” de la via de les MAPK, la seva mutació amb guany de funció activa aquesta via en un primer estadi.

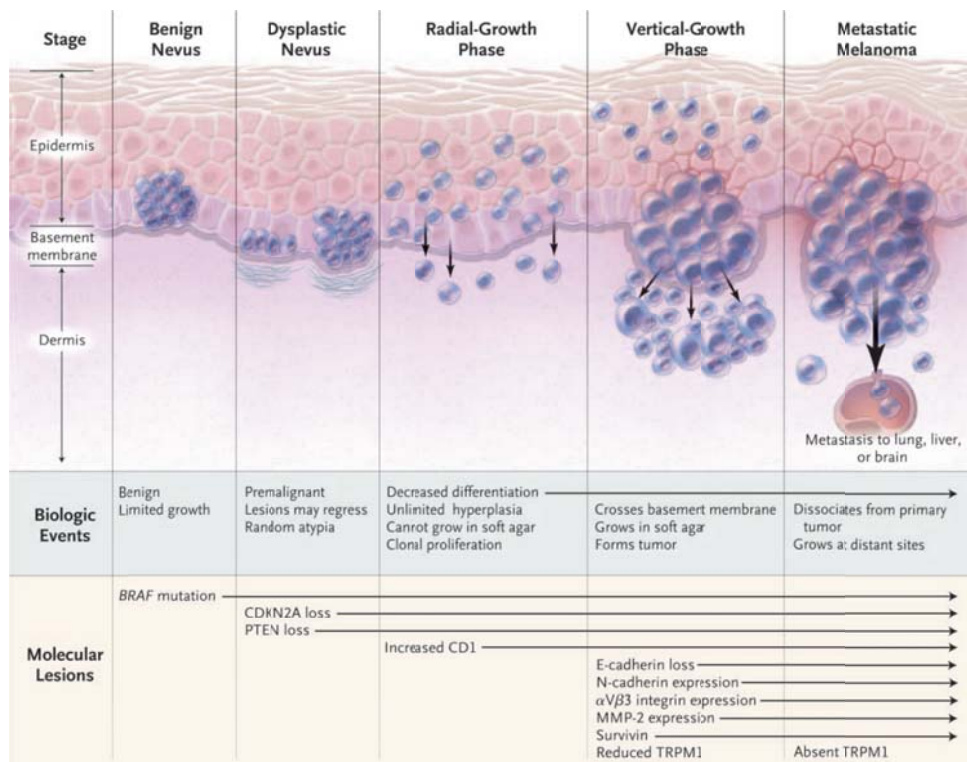


Figura 4. Canvis moleculars i biològics en la progressió del melanoma (Modificat de: Miller AJ. et al. The New England Journal of Medicine. 2006, 355:51-65)⁴⁵

Introducció

Més tard, noves mutacions o delecions en el gen CDKN2A i PTEN provocaran l'aparició d'una lesió premaligna, el nevus displàsic. La pèrdua de funció de les proteïnes codificades per aquest gens induiran proliferació i supervivència dels melanòcits. A partir d'aquí, la futura progressió cap a melanoma s'ha associat a la desdiferenciació, a la baixada en l'expressió de marcadors de melanoma regulats per MITF i a l'increment de l'expressió de ciclina D1. En la fase de creixement radial, les cèl·lules es caracteritzen per la presència de E-cadherina, una molècula d'adhesió que interacciona amb els queratinòcits i impedeix la migració de les cèl·lules des de la seva localització intraepidèrmica. La fase de creixement vertical i la de melanoma metastàtic va associada a canvis en el control de l'adhesió cel·lular i en la capacitat de migració. Així doncs, en aquesta fase veiem canvis com la pèrdua d'E-cadherina, l'expressió de N-cadherina, de l'integrina $\alpha V\beta 3$ i de MMP-2 (metalloproteïna 2). La N-cadherina és una molècula que interacciona amb els fibroblasts, macròfags i cèl·lules endotel·lials. Aquesta interacció facilitarà la intravasació de les cèl·lules malignes. A part, també veiem canvis en l'expressió de TRPM1 (gen de la metastatina), la funció del qual es desconeix però se sap que predisposa a la disseminació del melanoma. Per últim, l'expressió de survivina conferirà resistència a l'apoptosi, en inhibir la formació de l'apoptosoma.

Pel que fa referència als melanomes *de novo*, el seu procés de tumorigènesi no transcorre de igual manera que el detallat en la figura 4. Els melanomes *de novo*, no s'originen a partir d'una lesió premaligna. No apareix ni el nevus benigne ni el nevus displàsic. Aquests tipus de melanomes resulta d'una acumulació de exposició als UVR amb el corresponent danys en els melanòcits d'aquella regió de la pell (Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 7th Edition, 2008).

2.4 Tipus clinicopatològics del melanoma cutani

No tots els melanomes són iguals. Existeixen diferents tipus de melanoma dependent de la localització del tumor original. Així trobem el melanoma cutani, el melanoma de mucoses i el melanoma uveal o ocular, localitzats en la pell, mucoses i ull respectivament. Val a dir, que la majoria de melanomes diagnosticats són d'origen cutani. Així mateix, dins dels melanomes cutanis també trobem una classificació atenent a la seva localització, aparença i a l'avaluació del tumor per part del patòleg. Els diferents tipus de melanoma cutani són els següents:

Melanoma d'extensió superficial. És el més comú en la raça blanca i comprèn entre el 40 i el 70% dels casos. Pot aparèixer a qualsevol lloc del cos, incloent aquelles àrees no exposades a la UVR, tot i que sí afectades per cremades prèvies. S'assumeix que apareix a partir d'una piga ja existent. La seva mida ronda entre 1-2 cm i pot tenir un límit irregular. Pot ser que no quedi aixecat més enllà de la pell. És marró o negre i en pot presentar d'altres com el rosa i el blau. Tendeix a créixer lentament, primer en una fase de creixement radial i després de creixement vertical. Exemple de melanoma sobre nevus.



Melanoma nodular. Comprèn entre el 15% i el 30% de tots els casos de melanoma cutani. Majoritàriament, la seva localització és en el tronc. Originalment, apareix com un nòdul i el seu color és normalment blau-negre, gris o marró fosc, tot i que, de vegades pot presentar coloració rosa o de carn. Creix ràpidament i té un mal pronòstic, en presentar només fase de creixement vertical.



Melanoma sobre lentigen maligne. Ocorre en el 4-10% dels casos de melanoma cutani. Es desenvolupa molt lentament, en anys i no s'origina a partir d'una piga ja existent. Apareix normalment en aquelles àrees del cos que han patit una exposició solar molt forta, com cara i coll. Normalment és pla i amb límits irregulars. El seu color sol ser marró i negre i pot esdevenir bastant gran, de 3 a 6 cm. És un exemple de melanoma *de novo*.



Melanoma lentiginós acral. Comprèn entre el 2 i el 8% del melanomes en la població caucàsica, però és significativament més freqüent entre la població afro-americana i hispànica (35-90% dels melanomes). Sembla ser que la UVR no juga un paper important en l'aparició d'aquest melanoma. Aquest melanoma se sol presentar en els palmells de la mà, soles dels peus i sota de les ungles. És un melanoma pla, de coloració marró fosca o negra, creix molt ràpidament i té un mal pronòstic.



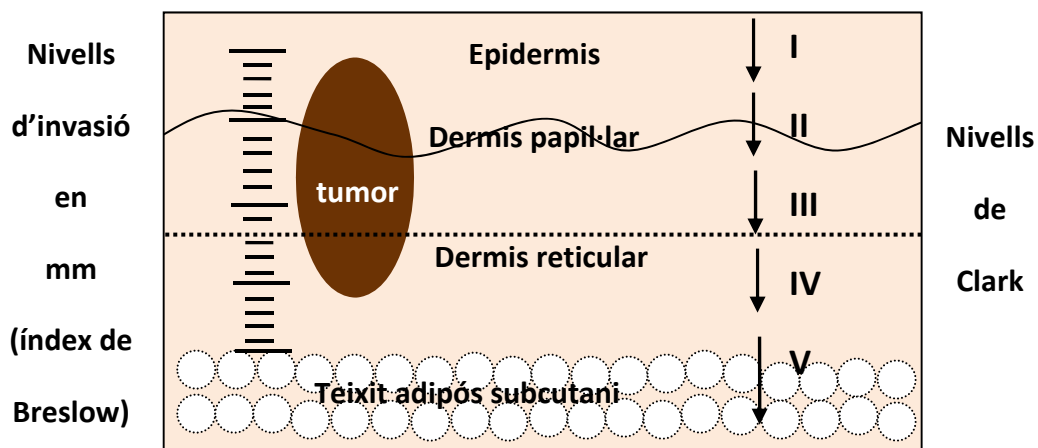
2.5 Estadificació i pronòstic del melanoma cutani

Un cop el melanoma s’ha generat, aquest passa per diferents etapes fins arribar a l’etapa final, que és la metàstasi. La *American Joint Cancer Commission* utilitza un sistema d’estadificació del melanoma (sistema TNM) mitjançant la utilització de les següents dades clíniques i histològiques: “**T**”: característiques del tumor (gruix -índex de Breslow-, presència o no d’ulceració, número de mitosi/mm²); “**N**”: malaltia locorregional (cutània, subcutània, presència i número de ganglis limfàtics afectats i les característiques d’aquests –micro o macrometàstasis-); “**M**”: presència o no de metàstasis a distància. Així, permet classificar als melanomes en els diferents estadis clínics, tal i com es mostra en la taula 1.

Estadi	Sub-estadi	Característiques
0		El melanoma solament es troba en la epidermis. Aquesta etapa també es denomina melanoma <i>in situ</i> .
I	IA	Tumor de < 1mm de gruix, sense ulceració i amb un índex mitòtic menor a 1 mitosi/mm ² .
	IB	2 opcions: Tumor de < 1mm de gruix, amb ulceració i amb un índex mitòtic d’almenys 1 mitosi/mm ² . O tumor de 1-2 mm de gruix, sense ulceració.
II	IIA	2 opcions: tumor de 1-2 mm de gruix, amb ulceració. O bé, tumor de 2-4 mm de gruix, sense ulceració.
	IIB	2 opcions: tumor de 2-4 mm de gruix, amb ulceració. O bé, tumor de > 4 mm de gruix, sense ulceració.
	IIC	Tumor de > 4 mm de gruix, amb ulceració.
III	IIIA	El tumor ha afectat a 1 gangli limfàtic regional en forma de micrometàstasi (per tumors primaris de gruix ≤ 4mm i no ulcerats)
	IIIB	3 opcions: -el tumor ha afectat a 2-3 ganglis limfàtics regionals en forma de micrometàstasi (per tumors primaris de gruix > 4mm i ulcerats). -El tumor s’acompanya de macrometàstasis limfàtiques regionals. -El tumor s’acompanya de satel·litosi o metàstasis en trànsit sense afectació ganglionar.
	IIIC	3 opcions: -el tumor ha afectat als ganglis limfàtics regionals en forma de macrometàstasi o s’acompanya de satel·litosi o metàstasis en trànsit sense afectació ganglionar (per tumors primaris de gruix > 4mm i ulcerats). -Independentment del tipus de tumor primari, el tumor afecta com a mínim a 4 ganglis, produeix un massacot ganglionar, o s’acompanya de satel·litosi o metàstasis en trànsit amb afectació ganglionar
IV		El tumor s’ha disseminat a altres òrgans o a altres ganglis limfàtics distants del tumor original

Taula 1. Classificació dels melanomes d’acord amb la American Joint Cancer Commission⁶¹, segons les dades clíniques i histològiques en relació amb les característiques del tumor.

L'índex de Breslow pot determinar el pronòstic i la supervivència dels malalts amb melanoma. Els nivells de Clark descriuen la invasió de la tumoració en els diferents nivells cutanis. El nivell I descriu els tumors que estan només localitzats en la epidermis; el nivell II indica que la tumoració travessa la unió dermo-epidèrmica amb invasió de la dermis papil·lar; el nivell III descriu les tumoracions que ocupen tota la dermis papil·lar expandint-la; el nivell IV indica que la tumoració infiltra la dermis reticular i el nivell V indica la invasió del teixit adipós subcutani. El pronòstic empitjora en augmentar el nivell, però té menys valor que el gruix determinat mitjançant l'índex de Breslow i, de fet, com es pot veure a la taula 1 ja no es considera a la darrera classificació de la AJCC del melanoma.



Esquema 1. Representació dels índexs de Breslow i de Clark

Punts de tall actuals de l'índex de Breslow: ≤ 1 , $1-2$, $2-4$, >4

2.6 Tractament del melanoma cutani

Depenent de l'estadi en què es trobi el melanoma, s'apliquen diferents tractaments.

Tractament del tumor primari

Un cop diagnosticat el melanoma (per sospita clínica, confirmada per extirpació-biòpsia completa de la lesió, que sempre s'haurà d'haver fet amb marges estrets, $< 0,5$ cm) procedim a ampliar quirúrgicament els marges de la cicatriu que ha deixat la biòpsia. La magnitud de l'ampliació de marges s'ajusta al gruix de Breslow del melanoma segons els següents criteris: Breslow 0 (melanoma *in situ*): ampliació

Introducció

bilateral de 0,5 cm, Breslow ≤ 1 mm: ampliació bilateral de 1 cm i Breslow >1 mm: ampliació bilateral de 2 cm. Y sempre arribant en fondària fins a la fàscia muscular.

Per els melanomes amb T del TNM de tipus T1b o més (Breslow ≤ 1 i ≥ 1 mitosis/mm² o amb ulceració // Breslow >1 mm), en els que cal fer la biòpsia del gangli sentinella, l'ampliació de marges es realitza de forma simultània a la biòpsia del gangli sentinella, per no modificar prèviament el drenatge limfàtic original del melanoma.

En cas de tumors primaris que ocupin grans superfícies o es localitzin en regions anatòmiques difícils, aquestes regles generals es poden ajustar a cada cas concret.

Tractament de la malaltia locoregional

- **Tractament de les metàstasis ganglionars.** El tractament de les metàstasis ganglionars també és bàsicament quirúrgic. Actualment, el buidatge ganglionar complet o limfadenectomia mai es realitza de forma electiva (a cegues) sinó de forma selectiva, és a dir, basant-se en l'evidència de metàstasi a aquest nivell. Aquesta evidència habitualment s'obté de l'estudi histològic del gangli sentinella, que valora l'existència de micrometàstasi. No obstant això, alguns pacients ja debuten amb macrometàstasis ganglionars clínicament palpables que precisen limfadenectomia.

Les metàstasis ganglionars que es desenvolupen durant el curs de la malaltia (no en el moment del diagnòstic), es tracten bàsicament de la mateixa manera.

- **Tractament de les satel·litis i les metàstasis en trànsit.** Aquest tipus de malaltia locoregional està recollida en els estadis IIIB i IIIC si es presenta en el moment del diagnòstic, però és més freqüent que es desenvolupi durant el seguiment dels pacients. El tractament estàndard consisteix en l'extirpació de les recurrències locals i les metàstasis satel·lits i en trànsit sempre que sigui possible. Altres possibles tractaments son 1) la perfusió regional aïllada d'extremitats amb citostàtics i citocines, 2) criocirurgia, 3) electrocoagulació, 4) làser, 5) radioteràpia, 6) injecció intralesional de BCG, DNCB, interferó- α o altres citocines, 7) imiquimod tòpic etc.

Altres tipus de malaltia locoregional inoperable, no abordables mitjançant els tractaments abans esmentats, es tracten de forma similar al melanoma disseminat

Tractaments adjuvants o complementaris

Són aquells que poden oferir-se als pacients amb un risc mitjà o alt de recidiva (habitualment alt risc, estadis IIB, IIC i III), en principi lliures de malaltia una vegada extirpat el tumor primari i / o les metàstasis ganglionars. La seva finalitat seria evitar o retardar la recidiva (locorregional i / o a distància).

- **Interferó- α** . Al nostre entorn s'utilitza la pauta d'interferó- α a dosis altes descrita per Kirkwood al 1996. Malgrat la seva alta toxicitat, és un dels pocs tractaments en que s'ha demostrat un augment del temps lliure de malaltia i, amb forces discrepàncies entre estudis, un molt discutit augment de la supervivència.

- **Radioteràpia**. Hi ha treballs que han demostrat la seva utilitat, evitant o retardant la recaiguda local després de la dissecció ganglionar terapèutica, quan existeixen múltiples ganglis afectes (núm. 3-4) o quan hi ha ruptura capsular. Si el malalt és tributari de tractament amb interferó- α , s'han d'utilitzar estratègies que evitin la toxicitat sinèrgica d'ambdós tractaments. També es considerarien aquestes indicacions en cas de recidiva ganglionar, un cop tractada quirúrgicament.

Altres tractaments adjuvants amb immunoteràpia cel·lular o teràpies enfront a molècules diana tant sols s'han d'emprar en el context d'assajos clínics.

Tractament del melanoma disseminat

Molt pocs pacients presenten metàstasi a distància en el moment del diagnòstic que els situïn en un estadi IV. La majoria de les metàstasis a distància es manifesten en els primers 2-3 anys i el 94-99% abans dels primers 10 anys. De totes maneres el maneig dels pacients en estadi IV des de l'inici o el dels que desenvolupen malaltia metastàtica amb posterioritat és superposable. També es poden utilitzar les mateixes estratègies per pacients amb malaltia locorregional irresecable i no subsidiària dels tractaments anteriorment esmentats.

El melanoma cutani, un cop disseminat, és una malaltia altament resistent als tractaments antineoplàsics convencionals com ara la quimioteràpia o la radioteràpia. Fins fa poc la Dacarbazina (DTIC) seguia sent el tractament estàndard per als malalts amb melanoma metastàtic amb una taxa de respostes objectives únicament del 10-

Introducció

20% i de respostes completes menor al 5%, de només 6-8 mesos de durada⁶². Als Estats Units, altra possibilitat per pacients joves i amb bon estat general, era la IL-2 recombinant EV i a dosis altes, força tòxica, però amb la que es poden aconseguir un percentatge molt baix però durador de remissions complertes. En conjunt, per això, el melanoma disseminat es continua considerant una malaltia mortal en la major part dels casos per el que s'estan investigant intensament noves estratègies terapèutiques.

Just en els darrers 2-3 anys, la investigació sobre dianes moleculars al melanoma sobre les quals es pugui actuar farmacològicament està començant a donar els seus primers fruits. De tots els fàrmacs assajats fins ara en pacients amb melanoma disseminat, els que han aconseguit millors resultats són els inhibidors de la mutació V600E de BRAF en els melanomes portadors de la mateixa (aprovat per la FDA al agost del 2011), els inhibidors de l'activitat tirosina-cinasa de c-Kit en melanomes amb mutacions d'aquest gen i els anticossos anti-CTLA-4 (aprovat per la FDA al març del 2011 i per la EMA al juliol del 2011), inhibidors dels mecanismes de immunotolerància. No obstant això encara queden molts problemes per resoldre, com la ràpida adquisició de resistències enfront els dos primers tipus de fàrmacs o la manca de biomarcadors predictius de resposta davant de l'últim d'ells

Altres possibles tractaments son el tractament quirúrgic de les metàstasi úniques (molt recomanable i acceptat en determinades situacions), la radioteràpia pal·liativa i tractaments experimentals com la immunoteràpia cel·lular i altres, sempre dintre de protocols experimentals o assajos clínics.

3. EL CARCINOMA D'ENDOMETRI

El carcinoma d'endometri (EC, **endometrial carcinoma**) és una de les malalties més típiques del tracte genital femení. Tot i que la majoria té bon pronòstic, és el causant de la tercera part de morts relacionades amb els càncers ginecològics en els països desenvolupats⁶³. Aquest fet es deu a que un cop disseminat o recidivat presenta molt mal pronòstic.

L'any 1998, Bokhman va classificar els carcinomes d'endometri en dos tipus: tipus I i tipus II, atenent a les seves característiques clinicopatològiques⁶⁴. Els carcinomes d'endometri de tipus I, també anomenats carcinomes d'endometri endometrioides (EEC, **endometrioid endometrial carcinoma**), són tumors dependents d'estrògens, altament diferenciats, de baix grau i amb tendència a la disseminació, que ocorren en dones pre- i peri-menopàusiques. Els de tipus II, també anomenats carcinomes d'endometri no endometrioides (NEEC, **non-endometrioid endometrial carcinoma**), són tumors que no responen a la estimulació amb estrògens, poc diferenciats i d'alt grau, que ocorren en dones post-menopàusiques⁶⁵. Els de tipus I són de més bon pronòstic i més freqüents (85%) que els de tipus II (15%).

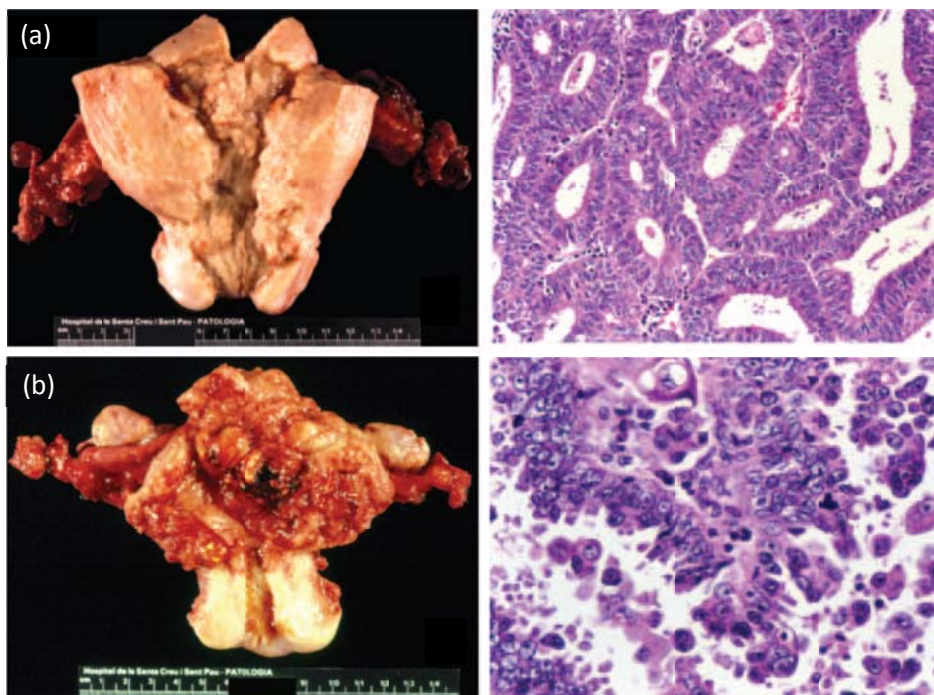


Figura 5. (a) Fotografia d'un carcinoma d'endometri endometrioides de grau I. El tall histològic mostra una citoarquitectura glandular normal, indicador de que el tumor està ben diferenciat. (b) Fotografia d'un carcinoma d'endometri no endometrioides de grau III, que ha envaït part del miometri. El tall histològic mostra una citoarquitectura atròfica, corresponent a un tumor d'alt grau i poc diferenciat.

3.1 Alteracions moleculars del carcinoma d'endometri

Com molts càncers epitelials, el EC resulta de l'acumulació de diferents alteracions genètiques i epigenètiques en oncogens, gens supressors de tumors o gens involucrats en la reparació del DNA. Aquesta acumulació és la responsable de la transició d'un endometri normal a la hiperplàsia i al carcinoma. Un cop el tumor s'ha desenvolupat, noves alteracions moleculars tindran lloc en els diferents subclons del tumor. Aquestes noves alteracions són les responsables de la heterogeneïtat, la invasió i la metàstasi tumoral.

Depenent del tipus de carcinoma d'endometri, tipus I o tipus II, es presenten unes alteracions moleculars o unes altres. Els carcinomes d'endometri de tipus I es caracteritzen perquè presenten Inestabilitat de Microsatèl·lits (MI, **M**icrosatellite **I**nstability), mutacions en PTEN, PI3KCA, KRAS i CTNNB1, mentre que els de tipus II presenten Inestabilitat Cromosòmica i mutacions de p53⁶⁶. Aquestes alteracions poden aparèixer soles o coexistir amb altres en el mateix tumor. Donat que els EEC són majoritaris, passarem a explicar les mutacions típiques d'aquests carcinomes d'endometri.

La MI juga un paper important durant la transformació del CEE en etapes inicials del tumor. Aquesta s'associa a una deficiència del gens de reparació durant la còpia del DNA. Els microsatèl·lits són regions del DNA consistents en la seqüència de dos nucleòtids repetides en tàndem i degut a la seva naturalesa de nucleòtids són especialment susceptibles a sofrir mutacions. Normalment, les mutacions ocorregudes en els microsatèl·lits no tenen cap conseqüència biològica perquè la majoria estan en zones no codificants del DNA. Però algunes vegades hi ha insercions, encara que només siguin d'un nucleòtid en zones codificants i aquestes són perilloses. L'aparició d'aquestes mutacions estan associades a la progressió dels EEC. Existeixen gens diana que queden freqüentment afectats en el EEC, que són els gens que codifiquen per TGF- β RII (**t**ransforming **g**rowth **f**actor **β** receptor **II**), IGFIIR (**i**nsulin **g**rowth **f**actor receptor **II**), hMSH3, hMSH6 i Bax. Aquests gens, curiosament, presenten varies repeticions d'algun nucleòtid. Quan es produeix un error en la còpia del DNA en aquest gens pot canviar la seva pauta de lectura, produint-se una proteïna truncada o aberrant. Aquestes proteïnes participen en l'apoptosi, la reparació del DNA i en vies de senyalització cel·lulars de proliferació. La MI apareix en un 20% dels EEC.

Els EEC també presenten mutacions de guany de funció en KRAS, en un 10-30% dels casos. Les mutacions en aquest gen ocorren normalment en els codons 12 i 13 i apareixen en estadis molt inicials del tumor. De fet, ja s'observa en les hiperplàsies.

KRAS és una proteïna que pertany a la família de les proteïnes Ras, que participen en la via de les MAP cinases.

Pel que fa a PTEN, es troba silenciada en el 30-60% dels EEC. Es creu que pot ser per mutacions somàtiques, per pèrdua d'heterozigositat o per una desmetilació del promotor. La mutació en PTEN s'ha observat ja en les hiperplàsies, cosa que suggereix que és un fenomen inicial per al desenvolupament d'un EEC. Pten (**p**hosphatase and **t**ensin homolog) és un gen supressor de tumors. Actua en sentit contrari a PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), desfosforilant els PIP₃ en PIP₂, regulant negativament així la via de senyalització de la PI3K/Akt.

El gen codificant per β -catenina (CTNNB1) és un gen que es troba mutat en el EEC, en un 30%. És una mutació que té lloc en moments més avançats del EEC. La β -catenina és un component del complex E-cadherina-catenina, el qual és essencial en la diferenciació i el manteniment d'una arquitectura tissular normal. Les mutacions de CTNNB1 provoquen una estabilització i una acumulació de β -catenina en citoplasma i nucli i participen en la transducció de senyal i l'activació transcripcional, a través de la formació de complexos de DNA-proteïnes unidores de DNA. Quan β -catenina està hiperactivada augmenta la expressió de metal·loproteïnasa 7 i de ciclina D1. Aquests dos fenòmens podrien jugar un paper important en l'establiment d'un microentorn necessari per la iniciació i manteniment del creixement del tumor i la seva metàstasi.

Finalment, la freqüent alteració de la via PI3K/Akt en el EEC, pot ser tant deguda a les alteracions observades en PTEN, com a mutacions de guany de funció de PI3K, induint la seva activació constitutiva. Les mutacions en PI3K són presents en el CEE en un 30% dels casos.

Així doncs, sembla ser que per la transformació dels EC sigui necessària una acumulació de diferents mutacions, les quals tenen lloc en moments ben definits durant la evolució del tumor.

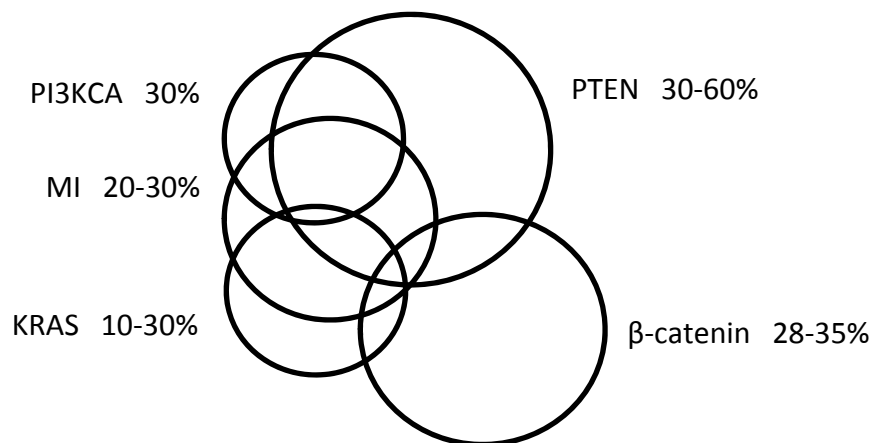


Figura 6. Principals alteracions moleculars dels carcinomes d'endometri endometrioides. Inestabilitat de Microsatèl·lits (MI), mutacions en PTEN, β-catenina i KRAS. (Modificat de: Matias-Guiu X. et al. *Human Pathology*, 2001, 32:569-77)⁶⁶.

3.2 Tractament del carcinoma d'endometri

La histerectomia abdominal (l'extirpació quirúrgica de l'úter) i l'ooforectomia bilateral (l'extirpació dels dos ovaris) és l'aproximació terapèutica més comuna del carcinoma d'endometri. Aquest és el tractament primari. Els carcinomes en estadi I que tenen un alt risc de recurrència i aquells en estadi II s'operen quirúrgicament i s'administra radioteràpia de manera conjunta. La quimioteràpia se sol considerar en alguns casos dels estadis III i IV. Els carcinomes d'endometri que es troben confinats en l'úter (estadi I) presenten al voltant d'un 80% de supervivència⁶³. En canvi, quan el carcinoma d'endometri es troba en estadi avançat té un pronòstic molt pobre.

El tractament quimioterapèutic del carcinoma d'endometri continua sent el mateix des de fa anys, sense variació depenent del tipus de carcinoma (tipus I i tipus II). Aquest consisteix en l'administració de progesterona⁶⁷ o del tractament combinat amb doxorubicina i cisplati⁶⁸, els quals no presenten un alt percentatge de respostes. En general, els resultats dels tractament no han millorat des de fa 30 anys⁶⁹. Per aquesta raó, la cerca de noves dianes terapèutiques en el carcinoma d'endometri és essencial i conforma un dels eixos principals d'investigació.

4. MORT CEL·LULAR PROGRAMADA

El cos humà d'una persona adulta genera al voltant de 60 bilions de cèl·lules cada dia i a la vegada un nombre similar moriran cada dia per assegurar l'homeòstasi tissular mitjançant un procés altament regulat conegut com a mort cel·lular programada (PCD, **programmed cell death**). Aquest procés es coneix avui dia com a **apoptosi**. A més, la PCD juga un paper clau durant el desenvolupament embrionari, en processos proliferatius i permet el correcte funcionament del sistema immune. No és d'estranyar, doncs, que la seva desregulació estigui implicada en processos patològics com les malalties autoimmunes, el càncer i la neurodegeneració.

La primera descripció morfològica de la mort cel·lular que anomenem apoptosi va venir de la mà de Walther Flemming l'any 1885, el qual va descriure els trets típics d'aquesta mort: encongiment cel·lular, fragmentació nuclear i formació de cossos apoptòtics. Més tard, en els anys 60, el patòleg John Kerr juntament amb el Alister Currier, van anomenar per primera vegada apoptosi a la mort cel·lular inusual vista durant el dany isquèmic hepàtic en rates⁷⁰. En els anys 80, Horvitz va ser el primer en desvelar els aspectes més fonamentals de la biologia de l'apoptosi, utilitzant com a model el nematode *Caenorhabditis elegans*⁷¹.

Avui en dia, gràcies als experiments inicials de Kerr i altres autors, se sap que els canvis morfològics que caracteritzen l'apoptosi són l'encongiment cel·lular (picnosi), la condensació de la cromatina, la fragmentació cel·lular en cossos apoptòtics, la pèrdua del potencial de la membrana mitocondrial, la lobulació de la membrana plasmàtica (*blebbing*) i el manteniment dels orgànuls intactes. Més tard, es van observar altres trets bioquímics com el trencament del DNA internucleosomalment i la externalització del lípid de membrana plasmàtica fosfatidilserina, el qual funciona com un senyal que és reconegut per les cèl·lules fagocítiques per tal de fagocitar cèl·lules apoptòtiques.

Una cèl·lula pot sofrir apoptosi a través de diferents mecanismes. Les vies clàssiques de mort apoptòtica són aquelles que transcorren a través de la via extrínseca o dels receptors de mort i a través de la via intrínseca o via mitocondrial. En aquestes dues vies hi participen unes proteïnes anomenades caspases. Hi ha també una altra via menys coneguda anomenada mort cel·lular independent de caspases. Com el seu nom indica és una via que transcorre sense la participació de les caspases, sinó que requereix l'activació d'altres proteïnes.

4.1 Mort cel·lular dependent de caspases

En la mort cel·lular dependent de caspases hi participen principalment unes proteases pertanyents a la família de les caspases (**C**ystein **A**spartae proteases). Aquestes proteïnes presenten una elevada homologia entre elles i estan altament conservades evolutivament des dels nematodes, hidres i insectes fins als humans⁷². Les caspases tenen en el centre actiu el residu cisteïna i són sintetitzades en la seva forma inactiva, com a zimògens. Durant el transcurs de l'apoptosi seran activades per talls proteolítics i seran responsables de molts canvis morfològics i bioquímics de l'apoptosi⁷³. Les caspases a la vegada tallaran altres substrats, sempre després d'un residu aspàrtic.

4.1.1 Les caspases

La importància de les caspases en l'apoptosi va ser descoberta per Horvitz, gràcies al seu treball amb *Caenorhabditis elegans*, on es va veure que el gen CED-3 (**cell-death abnormality-3**) codificava per una cisteïna proteasa i era indispensable per aquella mort apoptòtica descrita en un primer moment. Més tard, es va veure que aquest gen tenia una altra similitud amb al gen ICE (**i**nterleukin-1 β **c**onverting **e**nzyme), que es va trobar en humans i que codificava per la caspasa-1^{74, 75}. La caspasa-1 va ser la primera caspasa que es va identificar. Des de llavors s'han identificat catorze caspases més, onze de les quals es troben en humans.

Les caspases i els seus homòlegs han estat descrits en múltiples espècies, que inclouen el nematode, la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*⁷⁶, la mosca de la fruita *Spodoptera frugiperda*⁷⁷ i el llevat *Saccharomyces cerevisiae*⁷⁸.

Les caspases es poden dividir atenent a la seva estructura o a la seva funció. Segons la seva estructura trobem caspases amb prodomini N-terminal curt (3, 6, 7 i 14) o caspases amb prodomini N-terminal llarg (1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 i 12). Les caspases que tenen prodominis llargs poden contenir dominis d'interacció proteïna-proteïna que juguen un paper important en la seva activació, com el domini CARD (**c**aspase-**a**ctivation **r**ecruitment **d**omain) en les caspases 1, 2, 4, 5, 9, 11 i 12 o el domini DED (**d**eath **e**ffector **d**omain) en les caspases 8 i 10. Les caspases amb domini DED s'autoactiven per proximitat en grans complexos proteics que recluten els prodominis llargs de les caspases, com són l'apoptosoma, el DISC (**d**eath **i**nducing **s**ignaling **c**omplex), el PIDDosoma i els inflamosomes que contenen caspasa-1⁷⁹. Les caspases de

prodomini curt no poden autoactivar-se, per la qual cosa requereixen d'altres caspases de prodomini llarg o altres proteases.

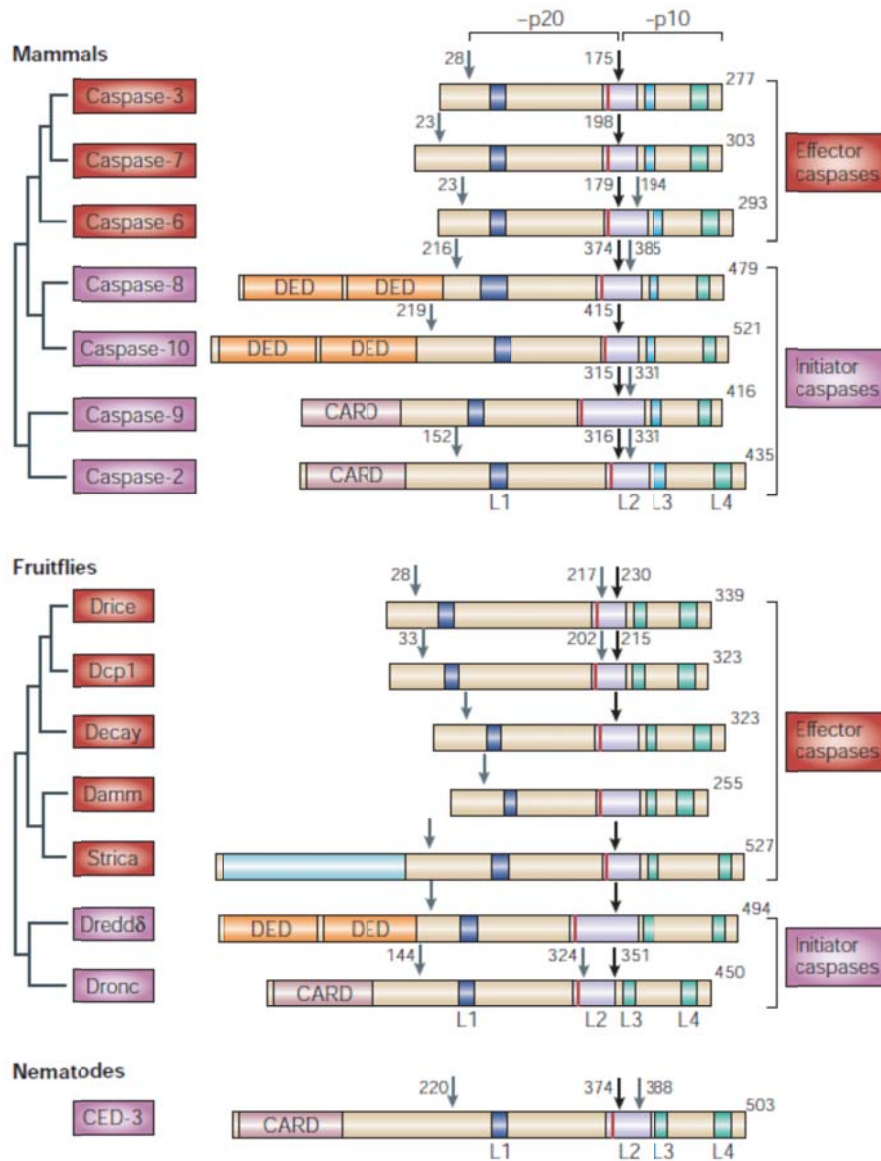


Figura 7. Caspases apoptòtiques en mamífers, mosques de la fruita i nematodes . En aquesta figura es poden veure els prodominis de les caspases i els seus dominis CARD i DED. La posició del primer tall dins de la cadena està marcat amb una fletxa. Els altres llocs de tall estan marcats amb fletxes grises. Els quatre bucles indicats com L1, L2, L3 i L4 formen el centre actiu de la caspasa i el residu de cisteïna està marcat com una línia vermella al principi del segon bucle. (Riedl S.J. et al. Nature Reviews, 2004, 5:897-907)⁸⁰.

Introducció

Segons la seva funció, trobem caspases que intervenen en l'apoptosi o caspases que no hi intervenen i que poden participar en altres funcions com la resposta inflamatòria. Set de les catorze caspases conegudes en mamífers participen en l'apoptosi. Dins d'aquestes trobem les caspases iniciadores (2, 8, 9 i 10) i les caspases executores (3, 6 i 7). Les caspases iniciadores es caracteritzen per tenir un prodomini més llarg i ser les que inicien el procés apoptòtic i les caspases executores tenen un prodomini curt i són les responsables de tallar múltiples molècules implicades en la mort cel·lular⁸⁰.

Les caspases poden actuar tant en la via extrínseca com en la via intrínseca de l'apoptosi. Hi ha unes caspases que específicament participen en una via i d'altres que participen en l'altra via. Depenent dels senyals cel·lulars, s'activarà una via o l'altra. Totes dues vies estan interconnectades.

4.1.2 La via extrínseca de l'apoptosi

La via extrínseca de l'apoptosi, també coneguda com la via dels receptors de mort és la responsable de l'eliminació de cèl·lules durant el desenvolupament embrionari, de la regulació del sistema immune pel que fa a la seva maduració i a la eliminació de les cèl·lules tumorals. Aquesta via causa apoptosi com a resposta de la unió dels receptors de mort als seus lligands i és executada pels receptors de la superfamília del TNF (**tumor necrosis factor**).

Després de la descoberta del TNF als anys 60, es van identificar dues famílies de gens que codificaven per 18 lligands i 28 receptors. Tots aquests receptors formen part de la família del TNF. Els més coneguts són TNFR-1 (**tumor necrosis factor receptor-1**), el receptor FAS o CD95, FASL o CD95L (els seu lligand) i els receptors 1 i 2 de TRAIL (**TNF-related apoptosis inducing ligand**)⁸¹, DR4 i DR5.

Després de la unió dels lligands als seus receptors es recluta la proteïna FADD (**Fas-associated death domain containing protein**) a l'extrem citosòlic del receptor per un mecanisme complex que implica unió entre diferents dominis de mort (DD, **death domains**). A la vegada FADD, recluta i activa caspasa 8 i/o caspasa 10. Depenent dels lligands i els receptors que facin l'interacció s'activaran diferents complexes. Per exemple, la unió de FASL al receptor FAS reclutaria el complex anomenat DISC, format per FADD i caspasa 8. Amb el tall de la caspasa 8 i/o 10 s'activaria l'apoptosi⁸¹.

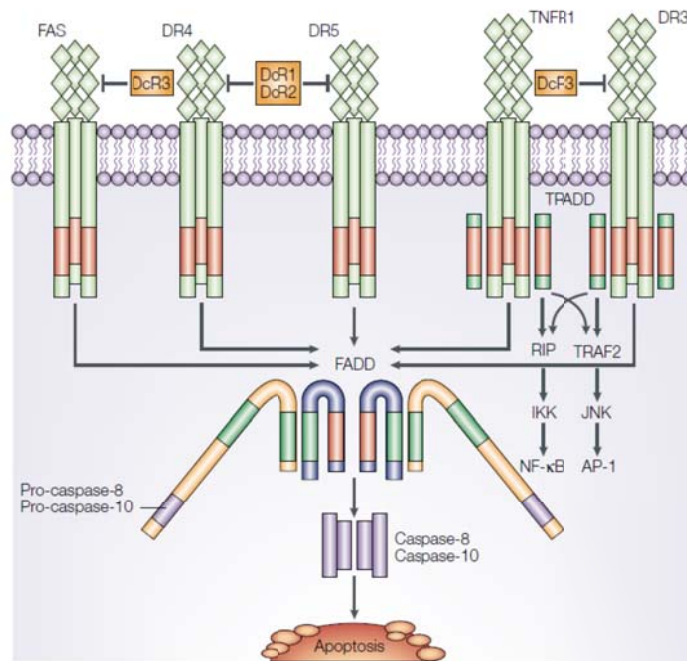


Figura 8. Vies de senyalització induïdes per diferents receptors i lligands de la superfamília del TNF. Els receptors FAS, DR4 i DR5, un cop activats, recluten FADD, mentre que TNFR1 i DR3 recluten TRADD (TNFR-associated death domain) (Ashkenazi A. et al. *Nature Reviews*, 2002, 2:420-430)⁸¹.

Un important regulador negatiu de la via extrínseca de l'apoptosi és FLIP_L (FLICE-like inhibidor). FLIP_L és una proteïna homòloga a caspasa 8, però li manca la cisteïna del domini catalític, la qual cosa fa que FLIP_L no tingui activitat proteolítica⁸². Els nivells d'aquesta proteïna poden tenir dos efectes oposats, proapoptòtic o antiapoptòtic. Sembla ser que nivells baixos de FLIP_L puguin induir apoptosi, activant la caspasa 8 i que nivells alts de FLIP_L puguin inhibir l'activació de caspasa 8, degut a la competició de caspasa 8 en el DISC⁸³. Apart, també hi ha l'evidència de que FLIP_L pot formar heterodímers amb caspasa 8 amb activitat catalítica, activant-la per dimerització⁸⁴.

4.1.3 La via intrínseca de l'apoptosi

La major part d'apoptosi vista en cèl·lules de vertebrats transcorre a través de la via intrínseca⁸⁵. En aquesta via, el mitocondri hi juga un paper fonamental. Aquesta via pot ésser activada per una gran varietat d'estímuls, com per exemple, els fàrmacs quimioterapèutics, radiació ultraviolada, hipòxia o estrès oxidatiu.

Introducció

Una vegada la cèl·lula ha rebut el senyal per morir, s'activaran una sèrie de proteïnes i el mitocondri patirà una sèrie de canvis que donaran lloc a la mort cel·lular. Durant aquest procés es produeix un fet clau en el mitocondri que és la permeabilització de la membrana mitocondrial externa degut a un canvi del potencial de membrana, la qual cosa farà que varies proteïnes com citocrom c, AIF (**a**poptotic inducing factor) i Smac/Diablo s'alliberin a al citosol i es pugui induir la mort apoptòtica. En aquesta via hi participen la caspases 3, 6, 9 i 7.

Durant la via extrínseca hi té lloc l'assemblatge de l'**apoptosoma**. L'apoptosoma és un complex multiproteic heptamèric d'aproximadament 1,4 MDa (**M**ili **D**alton). L'inici de la formació de l'apoptosoma comença amb la unió del citocrom c a l'ATP. Aquesta unió produeix la oligomerització del cofactor Apaf-1 (**a**poptotic-**p**rotease-**a**ctivating factor-1), que recluta molècules de procaspasa 9. Un cop totes aquestes molècules han quedat reclutades totes juntes, el complex format en resulta ser l'apoptosoma^{86, 87}.

Apaf-1, el component principal de l'apoptosoma, va ser originalment identificat com un homòleg de CED4 de *Caenorhabditis elegans*. Aquesta proteïna es va veure que actuava com a cofactor per l'activació de caspasa 3 dependent d'ATP⁸⁶. Apaf-1 té tres dominis diferents, un domini CARD a l'extrem N-terminal, un gran domini d'unió a nucleòtid i dos dominis WD40 a l'extrem C-terminal. El domini CARD és necessari per al reclutament i l'activació de caspasa 9⁸⁸ i el domini WD40 servirà per unir el citocrom c que ha estat alliberat al citosol⁸⁹. Un cop unit al citocrom c, Apaf-1 multimeritzarà i s'associarà amb la procaspasa 9, formant l'apoptosoma i aquest resultarà en l'activació de les caspases executores 3, 6 i 7⁸⁷. L'apoptosoma és una roda de set braços, amb un nucli central que conté el domini de reclutament de procaspasa 9, que està unit al domini CARD de Apaf-1 i amb una molècula de citocrom c a cada braç. Es creu que l'activació de la caspasa 9 és anàloga a l'activació de la caspasa 8, es a dir, a través de una transició de monòmer a dímer.

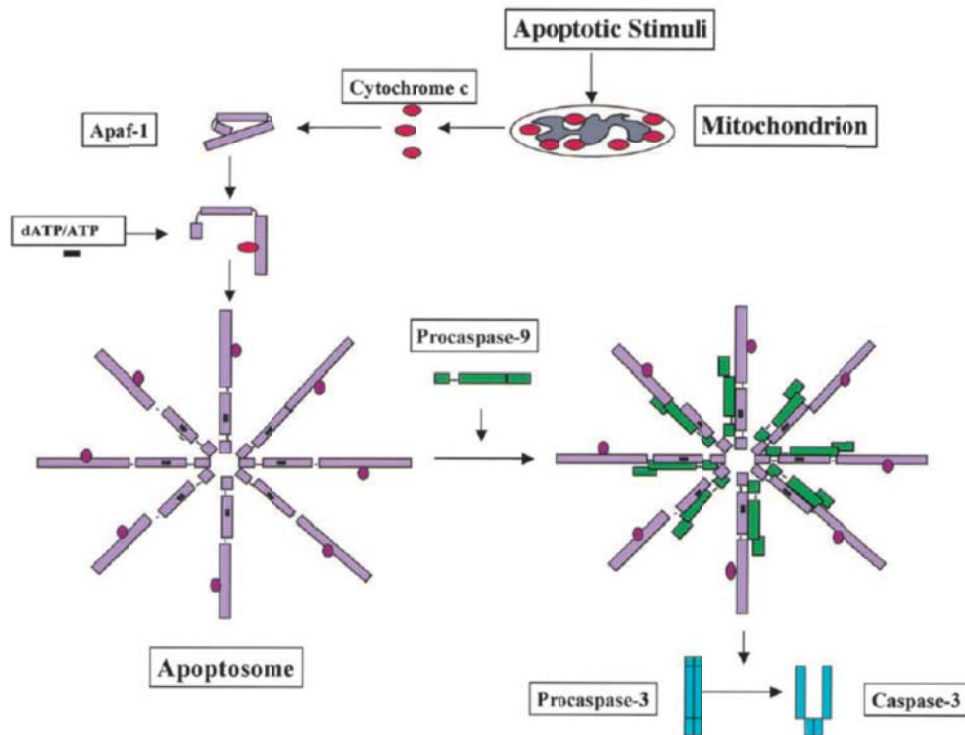


Figura 9. Activació de la via mitocondrial gràcies a la formació de l'apoptosoma. L'estímul apoptòtic provoca l'alliberament de citocrom c. A la vegada, el citocrom c s'uneix a l'Apaf-1. La unió de citocrom c indueix un canvi conformacional en Apaf-1, permetent la unió de l'ATP. Aquest fet causa la seva oligomerització formant l'apoptosoma, el qual recluta la procaspasa-9. Més tard s'activaran les caspases executores com la caspasa 3. (Wang X. *et al. Genes & Development*, 2001, 15:2922-33)⁸⁷.

Les vies extrínseca i intrínseca de l'apoptosi no són independents sinó que convergeixen a nivell de les caspases 3 i 7. La caspasa 9 de l'apoptosoma de la via intrínseca queda inhibida per les proteïnes de la família de les IAPs (inhibitor of apoptosis protein), la més important de les quals és XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein). Alhora, aquestes proteïnes inhibidores estan inhibides per la proteïna Smac/DIABLO que és alliberada juntament amb citocrom c⁹⁰.

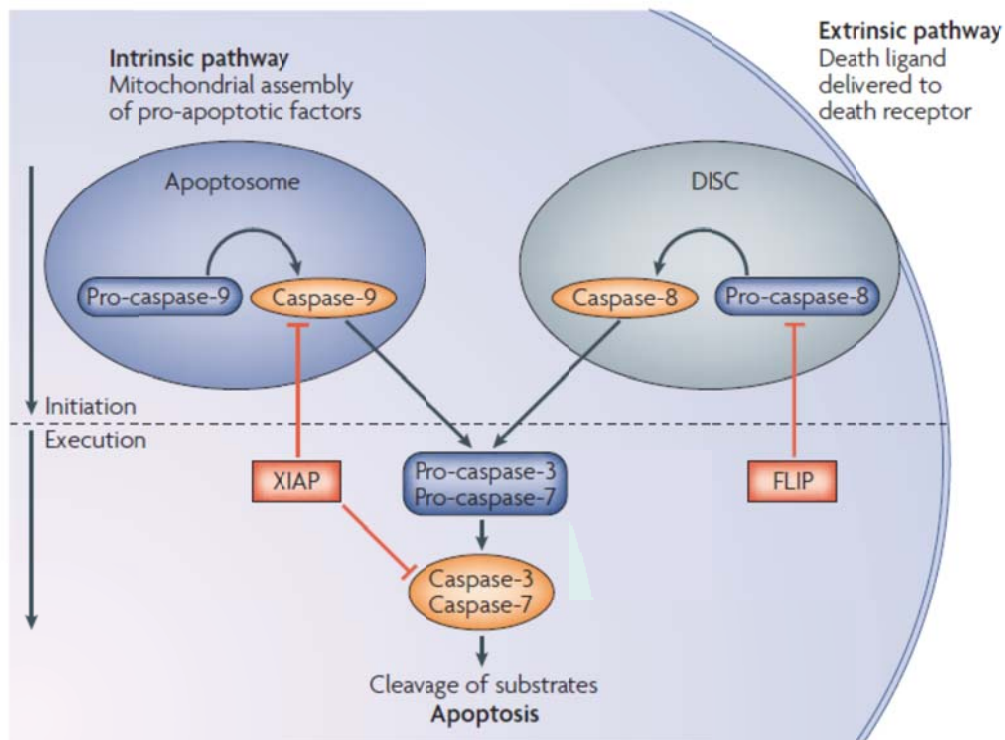


Figura 10. La cascada proteolítica de les caspases en la iniciació i l'execució de l'apoptosi. Tant la via extrínseca com la via intrínseca de l'apoptosi utilitzen principis relacionats per a detectar les senyals apoptòtiques i executar l'apoptosi. En la via intrínseca es forma l'apoptosoma, el qual activa la caspasa 9, mentre que en la via extrínseca és forma el DISC, el qual activa la caspasa 8. Un cop activades les caspases 9 i 8, aquestes activen les caspases 3 i 7 per tall. En totes dues vies existeixen inhibidors de l'apoptosi. Per una banda FLIP bloqueja l'activació de la caspasa 8 en el DISC, XIAP pot bloquejar la fase iniciadora (caspasa 9) i la fase executora (caspases 3 i 7). (Riedl S.J. et al. *Nature Reviews*, 2007, 8:405-13)⁹⁰.

4.1.4 Les proteïnes de la família de Bcl-2

El gen BCL-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2) va ser descobert en el limfoma fol·licular, el qual apareixia translocat des del cromosoma 18 al cromosoma 14. Aquest fet provoca una activació de la transcripció d'aquest gen ja que queda regulat baix el promotor de la cadena pesant de la immunoglobulina^{91, 92}. Es va veure que la sobreexpressió de Bcl-2 no promovia la proliferació cel·lular dels limfòcits B immadurs, com la majoria d'oncogens descrits fins al moment, sinó que inhibia la mort cel·lular⁹³. Aquest fet va suggerir que Bcl-2 era capaç de bloquejar la mort apoptòtica.

En mamífers hi ha una vintena de proteïnes de la família Bcl-2, incloent la proteïna Bcl-2 i altres proteïnes que tenen una estructura tridimensional similar o bé una estructura secundària predita, que és similar a Bcl-2. Aquestes proteïnes s'anomenen homòlogues de Bcl-2 i presenten un gran ventall d'activitats com la inhibició o la promoció de l'apoptosi, interaccionant entre elles⁹⁴. Aquest grup tenen

en comú que els seus membres contenen dominis BH1, BH2, BH3 i BH4 (**BH**, Bcl-2 homology domain 1, 2, 3 i 4). Apart, també existeixen unes proteïnes de la família Bcl-2, anomenades BH3-only, que només presenten el motiu BH3. Les proteïnes d'aquesta subfamília, excepte Bid, presenten una estructura que no sembla estar relacionada evolutivament amb els membres de la família Bcl-2, però totes les proteïnes BH3 interaccionen i regulen les proteïnes de la família Bcl-2 per promoure l'apoptosi. D'entre les proteïnes antiapoptòtiques de la família de Bcl-2 troben Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-W, A1 i Mcl1, Bcl-RAMBO, Boo i Bcl-G. En canvi, Bax, Bak i Bok, són proteïnes proapoptòtiques d'aquesta família. També tenen un paper proapoptòtic les proteïnes de la subfamília BH3-only: Bid, Bim, Bad, Bmf, Noxa, Hrk, Puma, Bik i Mule.

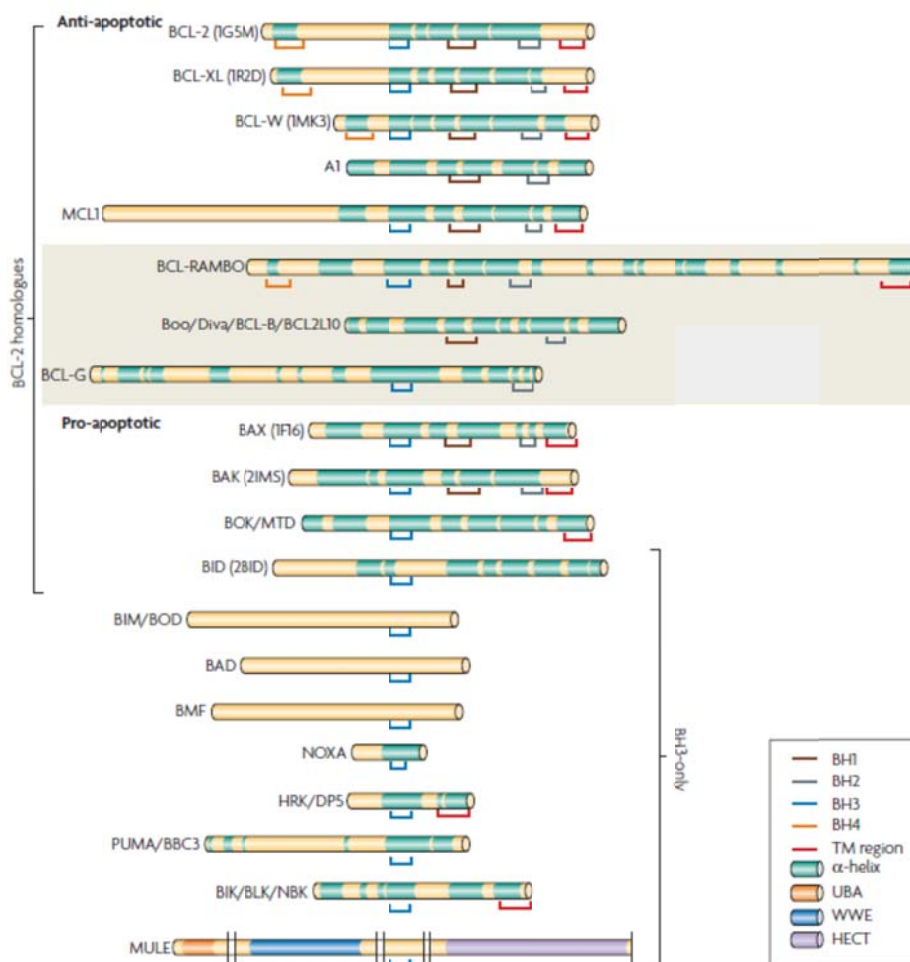


Figura 11. Alineament de les seqüències de les proteïnes de la família de Bcl-2 i de BH3-only. Els segments en verd representen hèlixs α i les línies vermelles representen els segments transmembrana predits (TM). També es mostren els dominis BH1, BH2, BH3 i BH4. En diferents colors. UBA=ubiquitin-associated domain, WWE=Trp-Trp-Glu interaction module, HECT=ubiquitin ligase domain. (Youle, R.J. et al. *Nature Reviews*, 2008, 9:47-59)⁹⁴.

Introducció

4.1.4.1 Les proteïnes homòlogues a Bcl-2

Les proteïnes homòlogues de Bcl-2 tenen efectes oposats. Mentres Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, A1, Mcl1, Bcl-RAMBO, Boo i Bcl-G inhibeixen l'apoptosi, Bax, Bak i Bok promouen l'apoptosi.

Bcl-2, Bcl-X_L i Bcl-W inhibeixen potentment l'apoptosi en resposta a molts insults citotòxics com, per exemple, la irradiació gamma o ultraviolada, fàrmacs quimioterapèutics o la privació de factors tròfics⁹⁵.

Sembla ser que Bax i Bak són crucials per induir la permeabilització de la membrana externa mitocondrial. D'aquesta manera poden alliberar-se molècules apoptogèniques (com el citocrom c i SMAC/DIABLO, les quals conduiran a l'activació de caspases. Els membres antiapoptòtics, com Bcl-2 i Bcl-X_L, inhibeixen Bax i Bak. A més a més, s'ha vist que aquestes proteïnes poden quedar inhibides per membres de la família BH3-only, ja sigui mitjançant la unió directa amb Bcl-2 o amb altres proteïnes antiapoptòtiques⁹⁶. En canvi, un altre model proposa que Bax i Bak poden activar-se directament gràcies a algunes proteïnes BH3-only, com Bim, tBid (**t**runcated **B**id) i Puma⁹⁷.

Bax i Bak poden promoure l'activació de caspases mitjançant els seus efectes en el mitocontri. Ja sigui directament o indirectament, aquestes dues proteïnes proapoptòtiques indueixen l'alliberament de proteïnes des de l'espai intermembranal al citosol⁹⁸. Aquesta permeabilització de la membrana externa mitocondrial provoca l'alliberament de citocrom c i altres proteïnes solubles. Està àmpliament acceptat que Bax i Bak poden formar porus en la membrana mitocondrial gràcies a la seva oligomerització, procés que es pot veure afavorit pel paper que poden jugar altres membres BH3-only com Bad o Noxa, les quals interaccionen amb proteïnes antiapoptòtiques com Bcl-2 i Bcl-X_L⁹⁹. No obstant, la naturalesa bioquímica d'aquests porus i com les proteïnes antiapoptòtiques poden regular-los encara és un fenomen poc conegut¹⁰⁰. Es creu que Bax podria interaccionar amb components del PTP (**P**orus **t**ransitori de **p**ermeabilitat) com per exemple la proteïna VDAC (**V**oltage-**d**ependent **a**nion **c**hannel) per crear un canal més gran i poder provocar així la total permeabilització de la membrana externa mitocondrial^{101, 102}.

4.1.4.2 Les proteïnes BH3-only

Les proteïnes BH3-*only* tenen un paper proapoptòtic i funcionen com a sensors d'estímuls apoptòtics, els quals provenen de diferents processos cel·lulars.

Una característica interessant d'aquestes proteïnes és que no poden desencadenar mort apoptòtica en absència de Bax i Bak i, per tant, la seva funció l'hem de situar dalt de la via de senyalització.

L'expressió de proteïnes BH3-*only* poden ser induïdes per factors de transcripció. Per exemple, Noxa i Puma són induïts per p53, com a resposta al dany en el DNA¹⁰³⁻¹⁰⁵. Bim pot ser induït per FOXO3A com a resposta a la privació de factors tròfics¹⁰⁶ i pel factor de transcripció CEBP α o CHOP, com a resposta a l'estrès en reticle endoplasmàtic¹⁰⁷.

Les proteïnes BH3-*only* també poden ser activades post-transcripcionalment. Per exemple, s'ha vist que Bad pot ser activada per una pèrdua de fosforil·lació deguda a la privació de factors tròfics¹⁰⁸. Bid pot ser activat per proteòlisi gràcies a la caspasa 8, convertint-se en tBid^{109, 110}. Bim activa-se gràcies a l'alliberament del complex motor de la dineïna¹¹¹ o degut a la pèrdua de fosforil·lació per part de les ERK. Aquest fet fa que Bim sigui ubiquitinitzat i degradat via proteasoma, cosa que ocorre en cèl·lules sanes^{112, 113}. Bmf s'activa per l'alliberament dels complexos motors actina-miosina¹¹⁴. Per últim, Bik s'activa per un mecanisme no molt conegut, com a resposta a la inhibició de la síntesi proteica¹¹⁵. El fet que Bim i Bmf tinguin aquesta forma tan peculiar d'activació es deu a que aquestes proteïnes es troben associades als microtúbuls i citoesquelet d'actina respectivament^{111, 114}.

Les proteïnes BH3-*only* indueixen la mort a través de la seva unió al domini receptor d'altres membres de la família Bcl-2. Aquests els poden inhibir si són membres antiapoptòtics o al contrari, activar-los, si són membres proapoptòtics.

4.2 Mort cel·lular independent de caspases

La mort cel·lular independent de caspases és aquell tipus de mort que transcorre sense l'activació de les caspases. El principal executor d'aquesta mort és AIF, tot i que també Endonucleasa G/Endo G és capaç d'induir-la.

Introducció

4.2.1 AIF

Recentment, s'ha vist que el mitocondri, apart d'alliberar factors apoptogènics com citocrom c, també és capaç de permetre la sortida de factors involucrats en l'apoptosi independent de caspases, com AIF i endonucleasa G¹¹⁶⁻¹¹⁸.

AIF és una flavoproteïna de la membrana mitocondrial externa que juga un paper clau en la regulació de l'apoptosi independent de caspases¹¹⁹⁻¹²¹. Aquesta proteïna va ser identificada i caracteritzada en el laboratori del Dr Guido Kroemer mentre s'estaven examinant processos apoptòtics en diferents sistemes cel·lulars. En aquests experiments, els sobrenedants provinents d'extractes mitocondrials, en la qual la permeabilització va estar induïda, es va veure que podien dur a terme una condensació de la cromatina en nuclis de cèl·lules HeLa¹²². Aquest factor soluble, responsable d'aquesta activitat, va ser identificat com a una proteïna mitocondrial que podia translocar als nuclis després d'un estímul apoptòtic per a induir la condensació de la cromatina de manera caspasa-independent¹¹⁶. AIF va obrir la porta cap al coneixement d'una nova mort cel·lular que podria executar apoptosi en absència de les caspases.

AIF nativa és una proteïna de 67 KDa i té una seqüència de localització mitocondrial, la qual es talla un cop la proteïna entra a l'espai intermembranar, deixant-la en la seva forma madura de 62 KDa i quedant-se ancorada a la membrana mitocondrial interna¹¹⁶. L'arribada d'un estímul de mort al mitocondri fa que AIF es talli novament, donant una nova forma d'AIF de 57 KDa, que és soluble i pot sortir al citosol¹²³. En cèl·lules sanes, AIF es troba retinguda al mitocondri on es creu que pot dur a terme una activitat oxidoreductasa degut a la presència d'un domini unidor de FAD en l'extrem N-terminal i a la seva activitat oxidoreductasa¹²⁴. S'ha vist que els ratolins Harlequin (ratolins *knock in* per AIF, que presenten una reducció del 80% d'expressió d'AIF degut a la inserció proviral dins del gen d'AIF) presenten un alt estrès oxidatiu i una degeneració cerebel·lar al cap de set mesos d'edat¹²⁵, suggerint que AIF té un paper fisiològic important en la regulació de l'estrès oxidatiu¹²⁶. Apart, AIF, un cop alliberat del mitocondri és un executor actiu de la mort cel·lular. Per tant, AIF, igualment que citocrom c, té un paper bifuncional fisiològicament (figura 12). La troballa de que el domini unidor de FAD d'AIF fos indispensable per a l'activitat proapoptòtica¹²⁷ ¹²⁴ reforça la teoria de la bifuncionalitat d'AIF. Per tant, AIF podria contribuir a la mort cel·lular independent de caspases afectant la funció mitocondrial.

D'altra banda, AIF pot anar al nucli cel·lular i provocar la mort cel·lular, induint la condensació de la cromatina. De fet s'ha demostrat que la incubació d'AIF

recombinant en nuclis de HeLa produeix una condensació perifèrica de la cromatina i una fragmentació del DNA d'alt pes molecular (50 Kilobases), però no una fragmentació internucleosomal com la descrita en l'apoptosi des d'un començament¹¹⁶. Aquest fet, conduiria irreversiblement a la mort cel·lular.

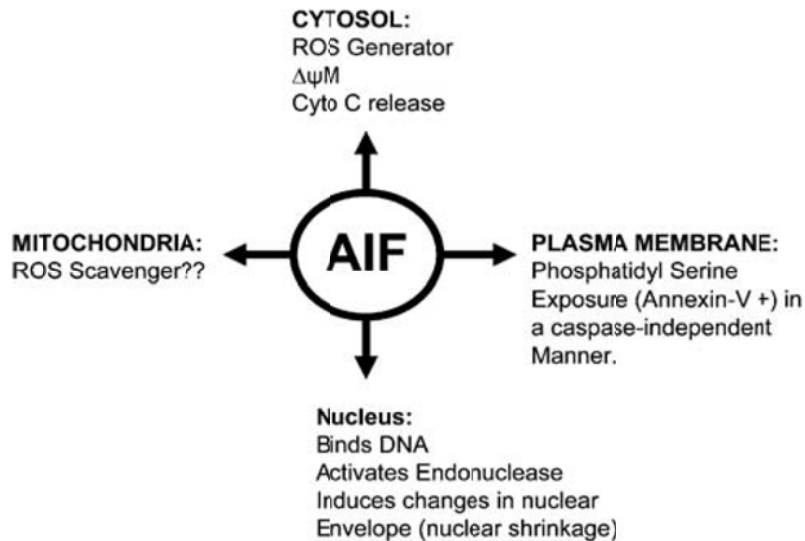


Figura 12. Les funcions d'AIF. (Cregan S.P. et al. *Oncogene*, 2004, 23:2785-2796)¹²⁶.

5. DIANES TERAPÈUTIQUES EN EL MELANOMA

5.1 Situació actual

El melanoma metastàtic, un cop disseminat, es mostra altament resistent als tractaments antineoplàstics convencionals com la quimioteràpia i la radioteràpia. Per aquesta raó, és necessària la investigació destinada a la cerca de noves dianes terapèutiques per al melanoma que s'adeqüessin a futurs tractaments, i poder millorar així la pronòstic dels pacients.

Una estratègia a seguir per atorgar a una molècula el paper de diana terapèutica és examinant si el creixement de la neoplàsia problema depèn en gran mesura de la desregulació de la molècula o si la seva presència varia significativament entre el teixit cancerós i el teixit sa.

Hi ha diverses vies de senyalització que juguen un paper important en el desenvolupament i progressió del melanoma. Alguns d'aquests estan activats com a resultat de mutacions activadores com BRAF, NRAS i KIT mentre que altres presenten una sobreexpressió dels seus membres, com Bcl-2, NF-kB, c-Kit i ciclina D1. Una característica adicional del melanoma és que és capaç d'evadir la resposta immune a través de CTLA4. Avui en dia, les dianes terapèutiques més estudiades i validades del melanoma són B-raf, c-Kit i CTLA4. No obstant, és necessària la búsqueda de noves dianes terapèutiques, ja que amb les presents no s'ha aconseguit curar el melanoma. Avui en dia, s'està investigant amb inhibidors de RTK i teràpies dirigides combinades.

5.2 B-raf

No es pot parlar de dianes terapèutiques en el melanoma sense mencionar B-raf. Tal com hem vist, la mutació en B-raf és un pas crític per la transformació del melanòcit. B-raf és una proteïna que pertany a la família Raf, juntament amb A-raf i C-raf, i participa en la via de senyalització de les MAP cinases, la qual regula la divisió cel·lular, la diferenciació i la supervivència. S'ha vist que un 30-70% dels melanomes comparteixen la mateixa mutació puntual (V600E) en l'exó 15 de B-RAF, que consisteix en la substitució d'una valina per un àcid glutàmic en la posició 599 de la seqüència aminoacídica, facilitant la unió de B-raf a l'ATP¹²⁸, provocant que la via de les MAP cinases estigui constitutivament activada. Sobretot apareix en melanomes cutanis no crònicament exposats al sol⁵⁷. Les mutacions en B-RAF tenen en lloc en una freqüència

similar en el nevus benigne, melanoma primari i melanoma metastàtic¹²⁹. Aquest fet dóna a pensar que altres mutacions addicionals serien necessàries per la transformació del melanòcit, com mutacions en el gen de p53¹³⁰ o en CDKN2A/INK4A¹³¹. INK4A s'ha vist que limita el creixement hiperplàsic provocat per la mutació de B-raf i que aquesta mutació indueix senescència en el melanòcits humans, incrementant l'expressió de INK4A¹³¹. No obstant, INK4A es troba mutada en el melanoma i juntament amb la mutació de B-raf contribuirien a la transformació.

5.2.1 Sorafenib

Un inhibidor de B-raf utilitzat en la pràctica clínica és el **Sorafenib**, principalment en el cas del carcinoma renal. Sorafenib és un inhibidor de la família dels receptors amb activitat tirosin cinasa i té afinitat per B-raf salvatge i B-raf mutat, alhora que també per VEGFR (**v**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor **r**eceptor), PDGFR (**p**latelet **d**erived **g**rowth **f**actor **r**eceptor), c-kit i Ret¹¹. Malgrat que nombrosos estudis preclínic en demostren la seva eficàcia¹³², quan s'ha traslladat als estudis clínics no ha donat resultats esperançadors per al tractament del melanoma metastàtic^{133, 134}.

5.2.2 PLX4032

Un altre inhibidor de B-raf és el **PLX4032**, el qual inhibeix de forma selectiva el B-raf mutat. Aquest ha demostrat resultats prometedors sense precedents en estudis clínics molt recents^{135, 136}, on el 80% dels pacients amb melanoma disseminat van experimentar una resposta completa. No obstant, les resistències al tractament no van trigar a aparèixer. Aquestes es creu que són degudes a una reactivació de la via de les MAP cinases a causa de l'aparició de noves mutacions en NRAS¹⁷ o PDGFR β (**p**latelet **d**erived **g**rowth **f**actor **β** ¹⁸. Per aquesta raó, ara s'està estudiant l'aplicació del PLX4032 juntament amb algun inhibidor d'aquestes molècules.

5.3 C-Kit

C-Kit es un receptor amb activitat tirosina cinasa que es troba en la membrana plasmàtica, codificat pel gen KIT. C-Kit s'activa per la unió al seu lligand (SCF, **s**tem **c**ell **f**actor), la qual desencadena la proliferació cel·lular a través de la via de les MAPK¹³⁷. El receptor es considera essencial per la proliferació, migració, desenvolupament i supervivència dels melanòcits normals, tan durant la embriogènesi com en l'individu

Introducció

adult. S'ha trobat que c-kit és un oncogen important en el melanoma que ocorre sobre pell amb dany solar crònic, en el melanoma acral i en el melanoma de mucoses⁵⁷. Les mutacions més freqüents de KIT estan en el domini juxtamembranal, exó 11, el qual promou la seva dimerització en absència de SCF, donant lloc a l'activació constitutiva o impredint que c-Kit mantingui la seva conformació autoinhibitòria. Altres mutacions en el gen de KIT són en l'exó 9, el qual codifica per la porció extracel·lular, i els exons 13 i 17, que codifiquen pel domini juxtamembranal intracel·lular⁵⁷. Diferents estudis demostren la eficàcia d'inhibidors de c-Kit en aquells melanomes que el presenten mutat o el presenten sobreexpressat¹³⁸⁻¹⁴⁰.

5.4 CTLA-4

CTLA-4 és una molècula de superfície dels limfòcits T. Aquesta té més alta afinitat per B7, una molècula que es troba en la superfície de les cèl·lules presentadores d'antígens que per CD28. La unió de CTL-4 amb B7 indueix anergia en els limfòcits T i inhibeix la secreció d'interleukina 2¹⁴¹. En canvi, CD28, és un coestimulador de la proliferació de limfòcits T i de la producció d'interleukina 2. La idea d'estimular el sistema immune per destruir els tumors no és nova i s'ha pensat que la interacció entre CTLA-4 i CD28 podria representar una bona diana terapèutica. La inhibició de CTLA-4 podria permetre que CD28 funcionés a ple rendiment i pugués decantar el balanç cap a la estimulació del sistema immune i cap al trencament de la immunotolerància. Com que el melanoma és un tumor altament immunogènic, s'havia pensat en la utilització d'inhibidors de CTLA-4. S'estan duent varis assajos clínics en fase II i fase II per al melanoma, emprant anticossos monoclonals. Actualment hi ha dos anticossos monoclonals que inhibeixen CTLA-4: Ipilimumab i Tremelimumab. Tots dos anticossos han estat capaços de reduir els tumors de melanoma^{142, 143}. A més, Ipilimumab ha induït respostes duraderes en el melanoma en estadi II i IV en un assaig molt recent en fase III¹⁴⁴.

6. DIANES TERAPÈUTIQUES EN EL CARCINOMA D'ENDOMETRI

6.1 Situació actual

El carcinoma d'endometri es detecta normalment en un estadi primerenc. Per aquesta raó la supervivència global és al voltant del 80%. No obstant, aquells casos de carcinoma d'endometri avançat que requereixen de quimioteràpia presenten un pronòstic molt pobre, de menys del 20% (en l'estadi IV). Per aquesta raó, la recerca encaminada a la cerca de noves dianes terapèutiques és essencial per millorar el pronòstic del carcinoma d'endometri.

En el carcinoma d'endometri, hi ha nombroses desregulacions en diferents vies de senyalització. Així doncs, s'han descrit mutacions de PI3KCA en el 30% dels carcinomes d'endometri, les quals contribuirien a la freqüent alteració de la via PI3K/Akt. Juntament amb les mutacions amb PTEN que presenta, no és estrany pensar que la via PI3K pot ser una bona diana terapèutica. En aquest sentit, s'han utilitzat inhibidors de PI3K com Wortmannina i derivats i s'ha vist que inhibeix la fosforil·lació d'Akt i incrementen l'apoptosi en cèl·lules de carcinoma d'endometri amb PTEN mutat¹⁴⁵.

Un efector "downstream" d'Akt que té un interès especial en el carcinoma d'endometri és mTOR. Les proteïnes de la família TOR tenen funcions pleiotròpiques i participen en la regulació de l'inici de la transcripció i en la traducció proteica en resposta a la concentració intracel·lular d'aminoàcids i altres nutrients essencials. També en la organització del citoesquelet d'actina, la senyalització de la via PKC i la biogènesi ribosòmica. La via mTOR pot activar-se per Akt, per receptors tirosina cinasa (EGFR1-4, PDGFR, KIT i IGFR), per Ras i per la pèrdua de funció de p53. S'han desenvolupat varis inhibidors de mTOR, com la Rapamicina i derivats. De forma interessant, els carcinomes d'endometri associats amb la inactivació de PTEN són particularment susceptibles al efectes terapèutics dels inhibidors de mTOR. Actualment, s'estan utilitzant diferents inhibidors de mTOR en assajos clínics com la Rapamicina, Temsirolimus, Everolimus i AP23573. Temsirolimus i Everolimus s'han utilitzat en assajos clínics en fase II, en carcinomes d'endometri recurrents¹⁴⁶.

Introducció

Els RTK també són una bona diana terapèutica en el carcinoma d'endometri. La família dels receptors d'EGF i els seus lligands juguen un paper clau en el creixement cel·lular i la diferenciació. Aquesta família engloba EGFR o ErbB1, HER-2/neu o ErbB2, HER-3 o ErbB3 i HER-4 o ErbB4. EGFR i HER-2/neu es troben altament expressats en l'endometri normal i sobreexpressats en el carcinoma d'endometri, els quals s'han associat a un mal pronòstic^{147, 148}. Existeixen diferents inhibidors de EGFR com Iressa, Trastuzumab i Lapatinib. S'ha evaluat l'efecte d'Iressa en cèl·lules de carcinoma d'endometri endometrioides i no endometrioides i es veu que tots dos models responen a la inhibició de EGFR, però la resposta dels no endometrioides pot estar limitada per una activació constitutiva d'altres vies de senyalització. S'han realitzat assajos clínics utilitzant tant Iressa com Lapatinib en carcinoma d'endometri avançat, veient-se resultats positius.

Altres dianes terapèutiques que podrien ser interessants en el carcinoma d'endometri podrien ser membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2, per exemple, Bax. Bax es troba mutat en aquells carcinomes d'endometri endometrioides amb inestabilitat de microsatèl·lits, i podria tenir un paper en la resistència a l'apoptosi¹⁴⁹.

Molt recentment estan emergent noves dianes terapèutiques a considerar per al tractament del carcinoma d'endometri com la PARP (**p**oly **A**DP **r**ibose **p**olymerase). Aquest enzim correspon a una família de proteïnes involucrades en la reparació de DNA després del dany i en l'apoptosi. S'ha vist que la pèrdua de PTEN provoca una recombinació homòloga aberrant després d'un trencament de DNA de doble cadena i que els carcinomes d'endometri de tipus I que tenen inactivació de PTEN són sensibles al inhibidors de la PARP¹⁵⁰. En aquest moment, s'està estudiant l'inhibidor de la PARP BSI-201 en combinació amb quimioteràpia estàndard en un assaig clínic en fase II.

Una altra d'aquestes dianes terapèutiques és el FGFR2. Al voltant del 12% dels carcinomes d'endometri presenten mutacions en FGFR2, les quals s'ha vist que són oncogèniques³⁴⁴. La inhibició de FGFR2, tant utilitzant un shRNA com l'inhibidor d'ampli espectre PD173074 resulta en una alta letalitat d'aquelles línies portadores de la mutació en FGFR2^{344,345}.

7. ELS RECEPTORS DE LA SOMATOSTATINA COM A DIANES TERAPÈUTIQUES

La **somatostatina** (SST, somatostatin) és una hormona peptídica de 14 aminoàcids secretada per les cèl·lules δ -pancreàtiques, que intervé en el control de la glucèmia, inhibint la secreció d'insulina i glucagó. Apart, també és secretada per l'hipotàlem i altres zones del sistema nerviós central, on intervé inhibint la síntesi i secreció de la hormona del creixement (GH, **g**rowth **h**ormone) per part de l'adenohipòfisi, a part de moltes més altres hormones. També s'ha trobat actuant en altres teixits com en el tracte gastrointestinal. De forma general, s'ha caracteritzat per ser un interruptor endocrí d'apagada¹⁵¹ i s'ha utilitzat per tractar els pacients amb acromegàlia.

La utilització de la somatostatina i alguns anàlegs com a agents antineoplàstics va començar amb el tractament de tumors neuroendocrins, donat que la somatostatina podia inhibir l'alliberament de varies hormones i així revertir els símptomes de la malaltia¹⁵². La somatostatina media els seus efectes a través de cinc receptors diferents, SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4 i SSTR5 (**s**omatostatin **r**eceptor **1**, **2**, **3**, **4** i **5**). Tots cinc receptors són idèntics en un 42-60% en la seqüència aminoacídica i pertanyen a la superfamília de receptors amb 7 dominis transmembrana¹⁵¹. Més tard es va trobar l'expressió d'aquests receptors en nombrosos teixits normals i neoplàsics¹⁵³, fet que va fer preguntar-se sobre la utilització de la SST per al tractament d'altres tipus de càncer. Tots cinc receptors estan acoblats a proteïnes G i a l'adenilat ciclasa. Apart d'inhibir l'activitat adenilat ciclasa, els diferents subtipus també poden modular altres enzims o proteïnes com les fosfotirosina fosfatases, STAT5, via de les MAP cinases, inhibir l'influx de Ca^{2+} o activar la fosfolipasa A i C¹⁵¹. S'ha vist que cada receptor està involucrat específicament en diferents processos. Per exemple, el SSTR2 i el SSTR5, en l'alliberament de la hormona de creixement (GH). El SSTR5, en el control de la insulina i glucagó. El SSTR2 i el SSTR3 poden induir apoptosi^{151, 154, 155}. El SSTR1 i el SSTR5 tenen un efecte inhibitori sobre el cicle cel·lular. El SSTR1 està involucrat en angiogènesi i la funció del SSTR4 no se sap¹⁵¹. De forma interessant, El SSTR2 és el receptor més abundant en la majoria de càncers¹⁵⁶.

Introducció

7.1 Anàlegs de las somatostatina

L'ús de la SST en la pràctica clínica no ha tingut una llarga trajectòria, ja que té com a diana nombrosos òrgans, la seva vida mitja en circulació és extremadament curta i n'és necessària l'administració per via intravenosa. Per aquesta raó, l'any 1974, dos anys més tard del descobriment de la SST, les companyies farmacèutiques es van posar a sintetitzar anàlegs d'aquesta hormona, amb el propòsit d'allargar la seva vida mitja i augmentar-ne la especificitat. Un dels primer anàlegs de la SST sintetitzats va ser **Octreotide**¹⁵⁷. També anomenat SMS 201-995 o H-[D]-Phe-Cys-Phe-[D]-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(OL). Aquest inhibeix la secreció de GH, de glucagó i insulina 45, 11 i 1.3 vegades més respectivament que la SST nativa i té alta afinitat pel SSTR2 i el SSTR5. Anys més tard es va sintetitzar **SOM230**, el qual va resultar ser més novedós i tenir alta afinitat per més receptors, concretament SSTR1, SSTR2, SSTR3 i SSTR5¹⁵⁸. De forma interessant, s'ha vist que SOM230 inhibeix de forma potent i dosi-depenent IGF-I (insuline-like growth factor-I), posant en relleu la seva utilitat per al tractament de nombrosos càncers sòlids que requereixen d'aquest factor de creixement.

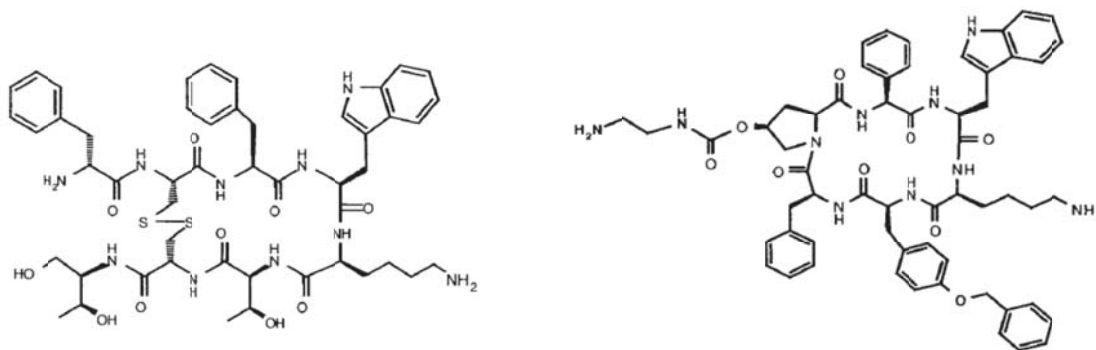


Figura 13. Estructura molecular de (a) Octreotide i (b) SOM230. (Modificat de: Bruns C. et al. *European Journal of Endocrinology*, 2002, 146:707-716)¹⁵⁸.

El fet que tant el SSTR2 com el SSTR3 puguin induir apoptosi i es trobin expressats en nombrosos teixits, va donar a pensar que aquests receptors podrien suposar una bona diana terapèutica per a determinats càncers, com és el cas del càncer de pàncrees. El 90% dels càncers de pàncrees presenten una pèrdua de

SSTR2¹⁵⁹ i s'ha vist que la seva reintroducció sensibilitza les cèl·lules tumorals pancreàtiques a l'apoptosi induïda per TNF, TRAIL i CD95L¹⁶⁰. Apart és capaç de sensibilitzar els fibroblasts normals a l'apoptosi induïda per TNF¹⁶¹. També, alhora, s'ha vist que SSTR2 interacciona amb la subunitat reguladora de PI3K, p85, activant la via PI3K, induint supervivència i creixement tumoral, i la unió de la somatostatina a SSTR2 inhibeix aquesta interacció en el càncer de pàncrees¹⁶². Octreotide i SOM230 s'han utilitzat en models *in vivo* del càncer pancreàtic, demostrant una inhibició del potencial metastàtic d'aquest càncer^{69, 163-165}. En el cas del melanoma, el SSTR2 s'ha trobat expressat en els melanomes cutanis i uveals¹⁶⁶⁻¹⁷⁰ i s'ha investigat l'efecte d'Octreotide en el melanoma¹⁶⁹. D'altra banda, s'ha estudiat extensivament l'efecte antitumoral de l'anàleg de la somatostatina TT-232. Així, s'ha descrit la seva eficàcia *in vitro*, en cèl·lules de melanoma^{169, 171} i *in vivo*, en el model de *xenograft* de cèl·lules D-10 de melanoma¹⁷¹, de cèl·lules HT-18^{172, 173} i de cèl·lules B16¹⁷⁴⁻¹⁷⁶, mostrant resultats prometedors. També s'han utilitzat Vapreotide, Lanreotide i RC-121.

8. EL PROTEASOMA COM A DIANA TERAPÈUTICA

Les cèl·lules utilitzen diversos mecanismes per regular l'estabilitat i la degradació de les proteïnes cel·lulars. Tot i que hi pot haver altres mecanismes de degradació de proteïnes citosòliques que encara no s'han caracteritzat, de moment s'assumeix que hi ha dos mecanismes principals: els lisosomes i els proteasomes¹⁷⁷. La diferència recau en que els lisosomes degraden majoritàriament proteïnes extracel·lulars i transmembrana i els proteasomes degraden la gran majoria de proteïnes intracel·lulars (80-90%). Els lisosomes són vesícules citosòliques envoltades de membrana que contenen en el seu interior enzims hidrolítics. La funció de la membrana és la d'embolcallar per evitar la degradació de components cel·lulars de manera incontrolada. En canvi, el 26S proteasoma és un complex multienzimàtic ATP-dependent d'aproximadament 2,4 MDa que es troba tant en el citosol com en el nucli de les cèl·lules eucariotes¹⁷⁷.

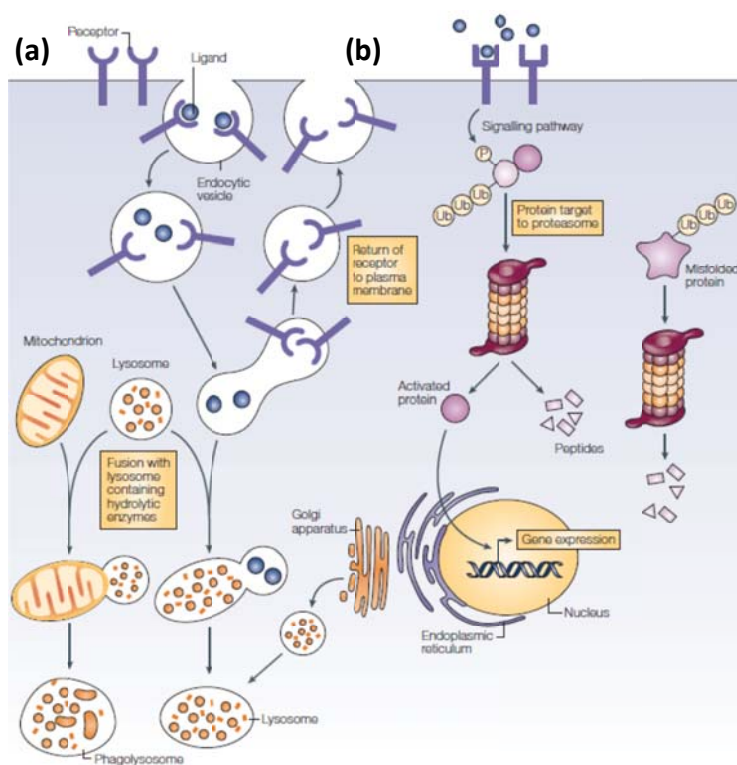


Figura 14. Degradació proteica eucariota. Els dos mecanismes principals de degradació de proteïnes són els lisosomes i els proteasomes. **(a)** Els lisosomes són citoplasmàtics, degraden proteïnes extracel·lulars i transmembranals que han estat endocitades i duen a terme autofagocitosis mitjançant els fagolisosomes. **(b)** Els proteasomes degraden majoritàriament proteïnes intracel·lulars, les quals són reconegudes per la seva fosforil·lació i activació de vies de senyalització o bé reconegudes per estar mal plegades. Les proteïnes a degradar són marcades amb ubiquitina. (Adams J. et al. *Nature Reviews*, 2004, 4: 349-360)¹⁶⁸.

El proteasoma, també anomenat proteasoma 26S, és una partícula cilíndrica que consisteix en almenys 33 subunitats. El proteasoma consta de la partícula nucli 20S i dues partícules reguladores 19S, situades en cada extrem^{178, 179}. Per al seu assemblatge és necessari l'ATP. La partícula 20S està compost per 4 anells heptamèrics, els quals formen una estructura cilíndrica. Els anells dels extrems estan

format per subunitats α i els anells interiors per subunitats β . Els anells interiors alberguen una cavitat que conté els llocs actius proteolítics^{177, 180}.

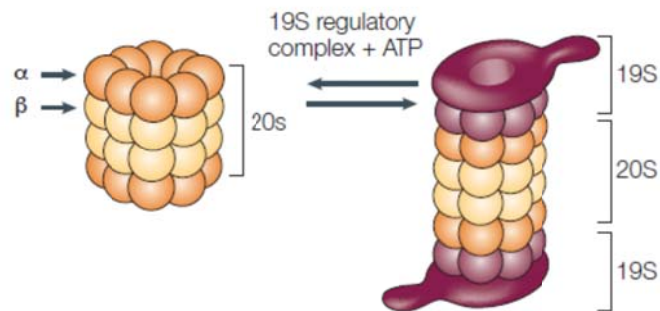


Figura 15. Estructura del proteasome. Estructura tridimensional del complex multienzimàtic del proteasoma. Aquest està compost per la partícula nuclear 20S, la qual està formada per subunitats α i β , i les dues partícules reguladores 19S. La molècula d'ATP en permet l'ensamblatge. (Adams J. et al. *Nature Reviews*, 2004, 4:349-360)¹⁷⁷.

Tota proteïna que hagi de ser degradada via proteasoma necessita ser marcada amb ubiquitina. La ubiquitina és una proteïna de 76 residus, altament conservada en eucariotes, però absent en procarïotes. En eucariotes, diversos gens codifiquen per la ubiquitina. L'activació de la ubiquitina requereix d'enzims desubiquitinants¹⁸¹. Les proteïnes que han de ser degradades via proteasoma s'uneixen unides covalentment a una cadena de poliubiquitines mitjançant tres passos, utilitzant els tres enzims següents: **E1**, l'enzim activador d'ubiquitina, **E2**, l'enzim traspassador d'ubiquitina, i **E3**, l'enzim ubiquitina-proteïna lligasa. Els substrats ubiquitinats són reconeguts pel proteasoma 26S i ràpidament són degradats en pèptids petits. Una funció important de la partícula reguladora 19S és la de reconèixer proteïnes ubiquitinades i altres substrats potencials del proteasoma. Una segona funció és la d'obrir un orifici en l'anell format per subunitats α que permetrà la entrada del substrat dins de la cambra proteolítica. Aquest procés requereix d'ATP.

Introducció

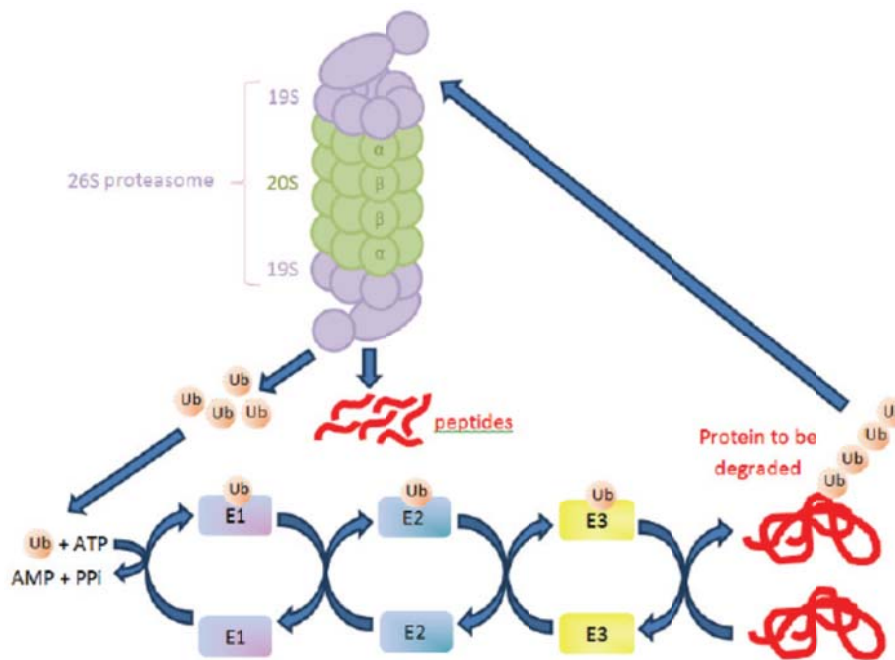


Figura 16. La via ubiquitina-proteasoma. L'esquema mostra els principals passos de la via ubiquitina-proteasoma. Primer, es necessita d'una molècula d'ATP per la unió de la ubiquitina (Ub) amb l'enzim activador d'ubiquitina (E1). Després, l'enzim traspassador d'ubiquitina (E2) agafa la molècula d'ubiquitina de l'E1. A continuació, la molècula d'ubiquitina és transferida a l'enzim ubiquitina-proteïna lligasa (E3). Per últim, la proteïna queda unida a 4 molècules d'ubiquitina i és degradada per la partícula catalítica 20S, alliberant ubiquitina lliure i pèptids digerits.

Com es veu, el proteasoma assegura un control de qualitat de les proteïnes cel·lulars. La via ubiquitina-proteasoma facilita importants funcions cel·lulars com el control del cicle cel·lular, la proliferació, la diferenciació i l'angiogènesi¹⁷⁷. L'alteració de l'activitat del proteasoma podria contribuir a diferents estats patològics com la inflamació, la neurodegeneració i el càncer. De forma interessant, moltes de les molècules que són degradades via proteasoma són molècules involucrades en la proliferació cel·lular i l'apoptosi, com les ciclines, les cinases dependents de ciclines (**CDKs**, **cyclin-dependent kinases**), la proteïna proapoptòtica p53, membres de la família Bcl-2 i el regulador negatiu de la via NFκB, IκBα (inhibidor of **κB**)^{177, 182}, etc. En la figura 17 es descriuen els mecanismes i les conseqüències de la degradació via proteasoma d'algunes d'aquestes proteïnes.

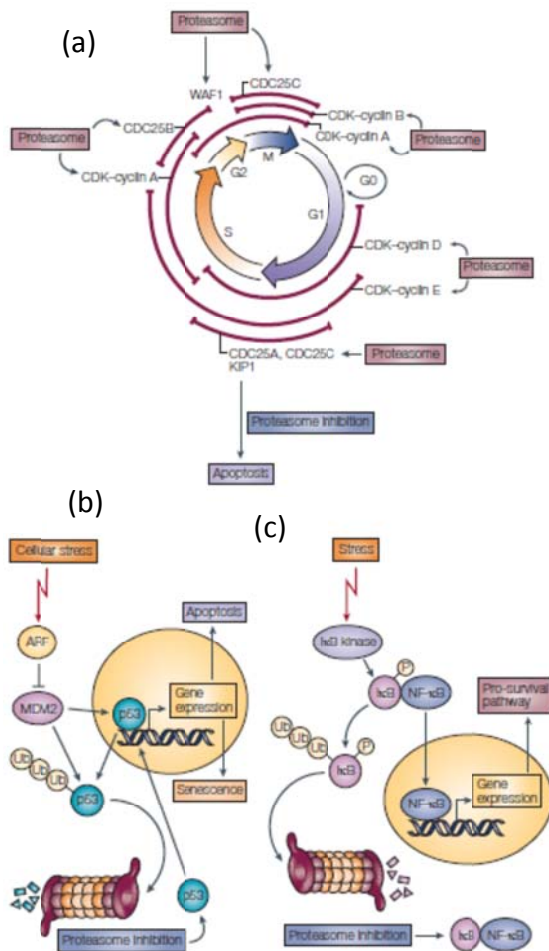


Figura 17. Vies de senyalització cel·lular associades al proteasoma. (a) Les ciclines regulen el cicle cel·lular, juntament amb els inhibidors de CDKs, WAF1 (o p21) i KIP1 (o p27) i són degradades via proteasoma de forma molt controlada. Amb la inhibició del proteasoma es desestabilitzen els complexos i fa que la cèl·lula sigui més susceptible a l'apoptosi. (b) La proteïna supressora de tumors p53 s'acumula en situacions d'estrès cel·lular, dany al DNA, activació oncogènica i hipòxia. MDM2 inhibeix l'activitat de p53, exportant-la al citoplasma on pot ser degradada via proteasoma o bé actuant com una ubiquitin lligasa. p53 esdevé activada després de la inhibició del proteasoma, la qual iniciaria l'activitat supressora tumoral, induint apoptosi o senescència. (c) En resposta a estrès, s'expressa el factor nuclear de κB (NF-κB) i promou supervivència. La inhibició del proteasoma impediria l'activació de NF-κB, ja que IκBα no pot degradar-se, i incrementaria la susceptibilitat de la cèl·lula al dany citotòxic. (Adams J. et al. *Nature Reviews*, 2004, 4:349-360)¹⁶⁸.

Apart, lligant amb l'apoptosi, el proteasoma regula el balanç entre les proteïnes pro- i anti-apoptòtiques. La inhibició del proteasoma s'ha vist que decanta el balanç cap a la senyalització proapoptòtica. Com hem vist, l'execució de l'apoptosi està extensament governada per proteïnes proapoptòtiques (Bax, Bak, Bik, Bim, Bad, Bid, HRK, NOXA, PUMA i BNIP3) i antiapoptòtiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1 i Mcl-1)¹⁸³⁻¹⁸⁶, tots membres de la família Bcl-2. Aquestes proteïnes regulen la permeabilitat de la membrana mitocondrial, de citocrom C, la generació d'espècies reactives d'oxigen i l'activació en cascada de les caspases. La inhibició del proteasoma activa la transcripció de PUMA, promou el trencament de Mcl-1, sobre regula aquestes proteïnes proapoptòtiques^{185, 187-190} i sotaregula les proteïnes antiapoptòtiques^{60, 62-64}. A més, també sota regula la expressió d'una classe de proteïnes conegudes com a inhibidors de l'apoptosi, com cIAP-1, XIAP i survivina^{186, 191, 192}.

8.1 Via de senyalització associada al proteasoma: Via NFκB

Ja hem vist que IκBα, una proteïna inhibidora de la via NFκB, pot ser degradada via proteasoma. Així doncs, no és d'estranyar que una alteració del proteasoma tingui un efecte directe sobre la via NFκB.

El factor nuclear de κB (NFκB, **nuclear factor κB**) és un factor de transcripció que s'ha vist involucrat en processos inflamatoris i en la resposta immune innata¹⁹³. Més tard, es va veure que també jugava un paper clau en el desenvolupament tumoral, en identificar-se molecularment la subunitat p50 de la família REL (reticuloendotheliosis) i v-REL com una oncoproteïna del retrovirus REL¹⁹⁴.

NFκB no és una sola proteïna sinó que es compon de varis dímers de proteïnes que s'uneixen a uns motius específics del DNA coneguts com a caixa κB¹⁹⁵. En mamífers, hi ha cinc proteïnes REL/NFκB, les quals es poden classificar en dos grups atenent al seu mode de síntesi i a la seva habilitat de transactivació. El primer grup consta de RELA/p65, c-REL i RELB i el segon grup consta de NFκB1/p105 i NFκB2/p100. Les proteïnes del primer grup són sintetitzades en la seva forma madura i contenen el domini RHD en l'extrem N-terminal (**REL homology domain**), el qual és necessari per la seva dimerització i per la seva unió al DNA. A més contenen dominis transactivadors en el seu extrem C-terminal. El segon grup se sintetitzen com a precursors, els quals contenen el domini RHD i repeticions d'ankirina en l'extrem C-terminal. Aquests precursors sofreixen una proteòlisi dependent d'ubiquitina en la regió C-terminal, donant lloc a les proteïnes madures p50 i p52, les quals presenten el domini RHD però no el domini transactivador. p50 és el producte de p105 i p52 el producte de p100¹⁹⁵.

En la via NFκB hi participen les proteïnes NFκB/REL, les proteïnes IκB (figura 18) i el complex cinasa de IκBα (IKK, **IκB kinase**). Les proteïnes IκB són proteïnes inhibidores de la via NFκB i presenten un domini regulador N-terminal seguit per repeticions d'ankirina.

Dins de les proteïnes IκB trobem IκBα, IκBβ, IκBε i BCL3 (figura 18). Les tres primeres atrapen els dímers NFκB en el citoplasma i BCL3 actua com a un coactivador transcripcional de p50 i p52. Dins del complex cinasa IKK trobem IKKα, IKKβ i IKKγ. IKKα i IKKβ són subunitats catalítiques del complex, mentre que IKKγ és reguladora.

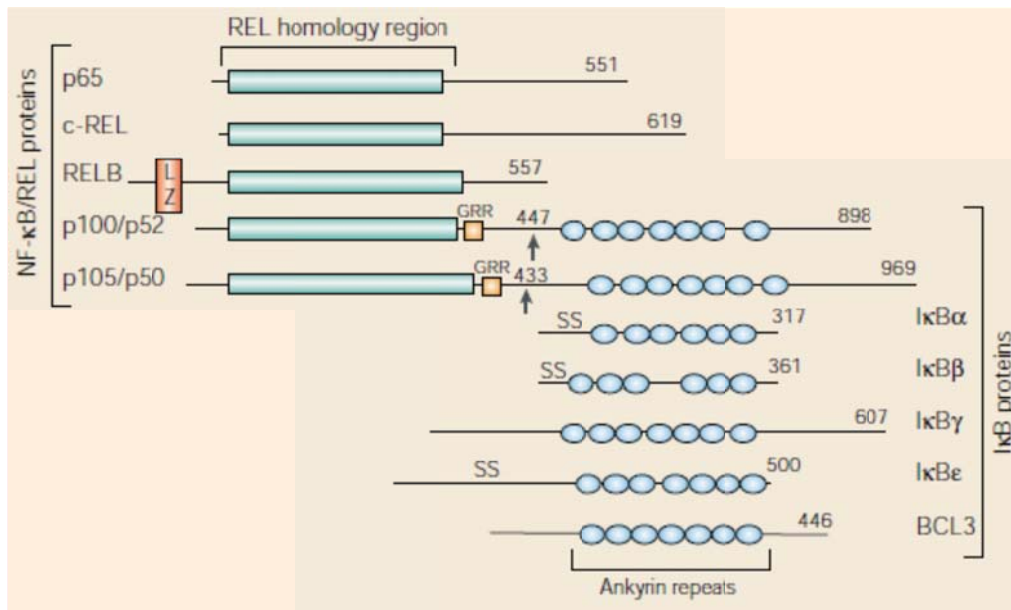


Figura 18. Esquema de les proteïnes NFκB/REL i les proteïnes IκBα de la via NFκB. LZ=leucine zipper, GRR=glycine-rich region (Karin M. et al. Nature Reviews, 2002, 2:301-10)¹⁹³.

La via NFκB transcorre a través de dues vies diferents: la via canònica i la via alternativa¹⁹⁶. Cada via utilitza diferents proteïnes NFκB/REL i proteïnes IκB. Com ja s'ha comentat, les proteïnes NFκB/REL formen dímers.

En la via canònica, aquests dímers estan compostos per RELA/p65, c-REL i p50, sent el dímer REL-p50 el majoritari. Aquesta via pot activar-se per diferents estímuls, per exemple, un infecció microbiana o viral o per la exposició a citoquines proinflamatòries. La exposició a aquests estímuls fa activar el complex IKK. Aquest complex cinasa fosforil·la IκBα en dues serines altament conservades, la 32 i 36, cosa que en provoca la seva degradació via proteasoma. Sense la existència d'IκBα, els dímers NFκB que estaven reprimits en el citoplasma poden translocar lliurement a nucli, activant la transcripció de diferents gens. La fosforil·lació d'IκB depèn majoritàriament d'IKKβ¹⁹⁷.

En la via alternativa hi participen els dímers compostos per NFκB2 i REL majoritàriament¹⁹⁸. Aquesta via pot activar-se per membres de la família del TNF com limfotoxina B o BAFF (**B**-cell activating factor), els quals activarien la cinasa IKKα del complex IKK o NIK. Aquestes cinases fosforil·len el domini IκB situat a l'extrem terminal de NFκB2, proteolitzant la proteïna en aquesta regió i obtenint-se així p52. Conseqüentment els dímers formats per RELB i p52 translocaran a nucli, on activaran la transcripció de gens diana¹⁹⁹.

Introducció

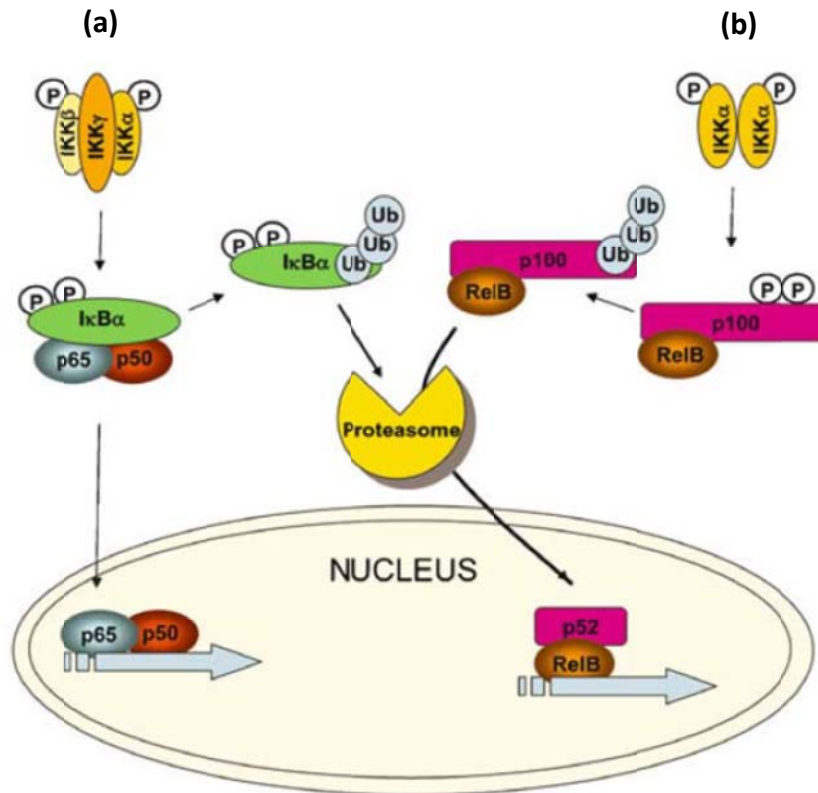


Figura 19. Model d'activació de la via NFκB. (a) via canònica. (b) via alternativa. (Dolcet X. et al. *Virchows Archiv*, 2005, 446:475-482)¹⁹⁶.

Un cop els dímers NFκB han translocat a nucli activen la transcripció de variis gens. Entre ells, gens antiapoptòtics, gens que regulen de forma positiva la proliferació cel·lular, gens reguladors de la via NFκB, i gens inflamatoris. Tots aquest gens contribuiran a la progressió tumoral. Els factors antiapoptòtics que s'indueixen per NFκB inclouen IAPs, FLIP, A1 i Bcl-X_L. A la vegada, NFκB també afavoreix la proliferació cel·lular, ja que augmenta l'expressió de les ciclines de G1, com la ciclina D1. Apart, també promou la transcripció de gens inflamatoris com els d'interleukines. Aquest fet, té especial interès donat la relació directa que s'ha observat entre aquells lloc que han sofert una inflamació crònica i el càncer.

8.2 Els inhibidors del proteasoma

A més de proporcionar un control de qualitat per les proteïnes cel·lulars, la via ubiquitina-proteasoma també facilita funcions essencials com la presentació d'antígens el control del cicle cel·lular, la proliferació, la diferenciació, l'angiogènesi i l'apoptosi¹⁷⁷. Per tant, una alteració de l'activitat del proteasoma podria contribuir a estats patològics com la inflamació, la neurodegeneració i el càncer. Tot això, a més de la expressió ubiqüa de la partícula proteolítica 20S del proteasoma, suggereix que la inhibició del proteasoma es podria utilitzar per diferents patologies com la inflamació, les malalties autoimmunes i el càncer¹⁹¹.

El fet que el proteasoma sigui crucial per molts processos cel·lulars feia pensar erròniament que no podia ser una bona diana terapèutica. No obstant, ha quedat patent que les cèl·lules malignes, les quals proliferen més ràpid, mostren més sensibilitat a la inhibició del proteasoma que les cèl·lules no malignes, com demostren nombrosos treballs. Així, per exemple, s'ha trobat que les cèl·lules de leucèmia limfocítica crònica són més sensibles que els limfòcits normals²⁰⁰. Les cèl·lules derivades d'un carcinoma escamós cel·lular també són més sensibles que les cèl·lules epitelials o els fibroblasts normals²⁰¹. També les cèl·lules de mieloma múltiple són més susceptibles a la inhibició del proteasoma que les cèl·lules normals mono nucleades²⁰². Apart, les cèl·lules mare de leucèmia són més sensibles que les cèl·lules mare hematopoètiques. També, les cèl·lules de melanoma són més sensibles que els melanòcits¹⁸⁹.

Hi ha cinc principals tipus d'inhibidors del proteasoma que s'uneixen tan reversiblement com irreversiblement als llocs actius enzimàtics de la partícula 20S, i per tant, inhibint la seva funció proteolítica. Aquests són els **pèptids aldehids**, els **pèptids vinil-sulfones**, els **pèptids boronats**, els **pèptids epoxicetones** i els **β -lactones**. Només uns quants d'aquests compostos han progressat cap al desenvolupament clínic, mentre que d'altres no han tingut aquesta sort degut a la seva falta d'estabilitat i d'especificitat²⁰³. Per exemple, els pèptids aldehids s'uneixen covalentment de manera irreversible al proteasoma i inhibeixen altres proteases com calpaïnes i catepsines^{177, 204}. Els pèptids aldehids van ser els primer inhibidors del proteasoma a ser desenvolupats^{205, 206}. Un exemple n'és **MG132** (veure figura 20) i **l'ALLN** o inhibidor de calpaïnes I. Dins del grup dels pèptids epoxicetones cal destacar la **Epoxomicina**²⁰⁷ (veure figura 21), sintetitzat pel bacteri *Actinomicetes*, la qual ha demostrat tenir una elevada especificitat pel proteasoma.

Introducció

Dins de la família dels pèptids boronats trobem Bortezomib. Bortezomib és un àcid dipeptidil borònic, en el qual s'ha substituït el grup aldehid pel grup boronat, cosa que fa que s'uneixi reversiblement al lloc quimiotríptic del proteasoma (subunitat $\beta 5$) de forma més específica¹⁷⁷, tot i que també té afinitat per les subunitats $\beta 1$ i $\beta 2$.

Bortezomib és l'únic inhibidor de primera generació que ha arribat a utilitzar-se en assajos clínics amb humans. No obstant, altres inhibidors del proteasoma, anomenats de primera classe, com MG132, ALLN, Lactacistina (β -lactona) i epoxomicina, etc. han estat extensivament utilitzats experimentalment per entendre millor la via ubiquitina-proteasoma. En la taula 2 es mostren els diferents inhibidors del proteasoma existents.

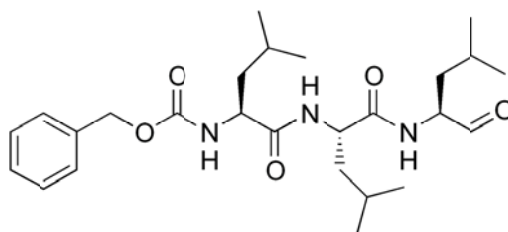


Figura 20. Estructura del pèptid aldehid MG132. (Ong D. et al. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6:424-432)¹⁹⁷.

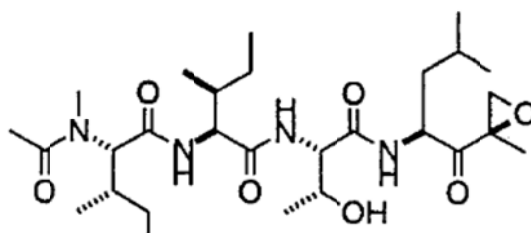


Figura 21. Estructura de la epoxicetona epoxomicina (Modificat de: Meng L. et al. *PNAS*, 1999, 96:10403-10408)¹⁹⁸.

Taula 2. Els inhibidors del proteasoma. Aquí es mostra un llistat d'inhibidors del proteasoma. Tots aquests compostos tenen en comú que mostren activitat quimioteràutica. (FDA=Food and Drug Administration). (Adams J. et al. *Nature Reviews*, 2004, 4:349-360)¹⁷⁷.

Agents	Origin	Phase	Comments	References
Aclacinomycin A	Natural	Preclinical	Laboratory use	87
Benzamide (CVT-634)	Synthetic	Preclinical	Laboratory use	88,89
Bortezomib (PS-341)	Synthetic	Clinical, for lymphoma	Approved by the FDA in 2003 for the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma	97
Calpain inhibitors I and II	Synthetic	Preclinical	Laboratory use	90,91
Eponemycin	Natural	Preclinical	Laboratory use	92
Epoxomycin	Natural	Preclinical	Laboratory use	93
Lactacystin	Natural metabolite of <i>Streptomyces</i>	Preclinical	Specific, but weak, inhibitor that blocks proteasome activity by targeting the catalytic β -subunit; also inhibits cathepsin A; no effect on serine or cysteine proteases	86
MG132	Synthetic	Preclinical	Targets calpains and cathepsins	95-97
NLVS	Synthetic	Preclinical	Vinyl sulphonate tripeptides that also inhibit cathepsins	94
MLN-519 (a lactacystin derivative)	Synthetic	Clinical, Phase I	Safety and tolerability recently evaluated in a placebo-controlled Phase I study in 39 healthy volunteers	98
Ritonavir	Synthetic	FDA-approved for HIV	HIV1 protease inhibitor that also selectively inhibits the proteasome	99

Bortezomib també és conegut per PS-341, rep el nom comercial de Velcade® i és comercialitzat per l'empresa farmacèutica Millennium Pharmaceuticals. Bortezomib es dissocia lentament del proteasoma, induint una inhibició del proteasoma estable i reversible²⁰⁸. Actualment, Bortezomib s'utilitza per al tractament del mieloma múltiple i limfoma no Hodgkin²⁰⁹. Encara que la eficàcia del Bortezomib en càncers sòlids és més limitada, hi ha nombrosos estudis preclínic que en demostren el seu poder antitumoral, com és el cas del càncer de mama^{210, 211}, càncer colorectal^{212, 213}, càncer d'ovari^{214, 215}, càncer de pàncrees²¹⁶, càncer de pròstata^{217, 218}, càncer cel·lular escamós^{219, 220} i melanoma¹⁸⁹.

Malgrat l'èxit de Bortezomib en malalts afectats amb mieloma múltiple, s'ha vist també que aquest presenta efectes adversos en el 10% dels casos. Així, s'han descrit quadres d'anèmia, anorèxia, deshidratació, diarrea, fatiga, nàusees i altres més greus com trombocitopènia i neuropatia^{177, 221}. Per aquesta raó, més tard, la recerca ha anat encaminada a la cerca d'altres inhibidors del proteasoma diferents a Bortezomib que poguessin oferir més avantatges i menys efectes secundaris. Actualment estan en desenvolupament varis agents de segona generació (veure estructura i propietats en la figura 23 i en la taula 3). Així doncs, dins de les noves molècules trobaríem MLN9708^{203, 222} i CEP-18770^{203, 223} (figura 23), que entrarien dins del grup del pèptids

Introducció

boronats. MLN9708 s'hidrolitza immediatament en plasma en MLN2238 i inhibeix de forma reversible majoritàriament l'activitat quimiotríptica de la partícula 20S del proteasoma (subunitat $\beta 5$), presentant una vida mitja de dissociació substancialment més curta que el Bortezomib. CEP-18770 també és un inhibidor reversible de l'activitat quimiotríptica del proteasoma (subunitat $\beta 5$). Tots dos compostos també tenen afinitat per les subunitats $\beta 1$ i $\beta 2$. Dins del grup dels pèptids epoxicetona s'estan desenvolupant Carfilzomib (PR-171)^{203, 224, 225} i PR-047^{203, 226} (veure figura 23). Calfilzomib és un inhibidor irreversible de l'activitat quimiotríptica del proteasoma (subunitat $\beta 5$) i PR-047 és un anàleg de Carfilzomib que actua inhibint irreversiblement també la subunitat $\beta 5$ del proteasoma. Apart d'aquests, hi ha altres molècules que també han estat identificats com a inhibidors del proteasoma, com NPI-0052 (Marizomib o Salinosporamida A)^{224, 227-229} (veure figura 22). NPI-0052 és un inhibidor irreversible de l'activitat quimiotríptica de la subunitat $\beta 5$ i l'activitat tríptica de la subunitat $\beta 2$ del proteasoma, del grup dels β -lactones, aïllat del bacteri marí *Salinospira tropica*. En alguns casos, estudis preclínic d'aquests compostos han demostrat que són capaços de superar la resistència a Bortezomib, així com ser més potents que Bortezomib. Les estructures d'aquests complexos catalítics del proteasoma es mostren en la figura 22. També en la taula 3 es mostren les activitats inhibidores de cada inhibidor del proteasoma.

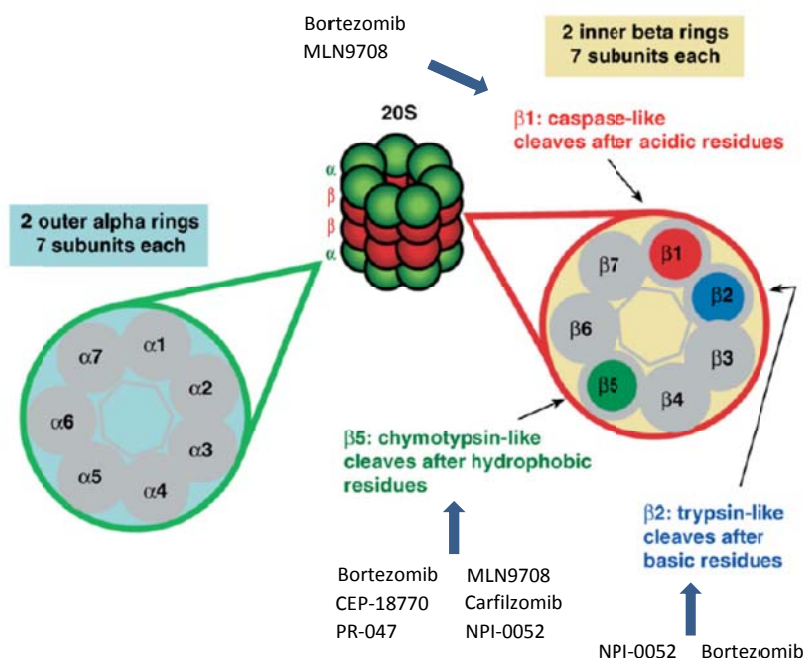


Figura 22. Estructura del proteasoma 26S i el lloc d'actuació dels inhibidors del proteasoma. El proteasoma està format per la partícula nucli 20S i les partícules 19S, situades una a cada extrem de la partícula nucli. La partícula 20S conté els centres actius enzimàtics: l'activitat quimiotríptica ($\beta 5$), l'activitat tríptica ($\beta 2$) i l'activitat pèptid post-glutamil hidrolasa ($\beta 1$). (Modificat de Dick L.R. et al. *Drug Discovery Today*, 2010, 15:243-9)²⁰³.

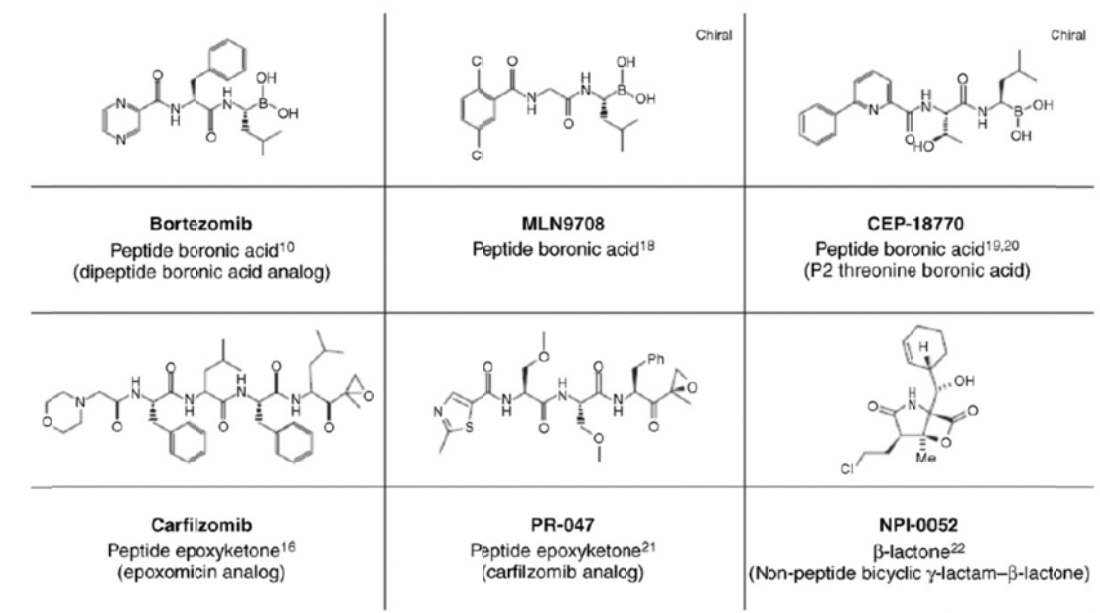


Figura 23. Estructura química de Bortezomib i dels inhibidors del proteasoma de segona generació (Dick L.R. et al. *Drug Discovery Today*, 2010, 15:243-9)²⁰³.

Proteasome inhibitor	IC ₅₀ β 5/ β 2/ β 1 (nM)	IC ₅₀ NF- κ B (nM)	Dissociation t _{1/2} (min)	Stage of clinical development	Route of administration
Bortezomib	2.4–7.9/590–4200/24–74 [16,18,25]	36–40 [18,25,39]	110 [18]	Approved for MM and MCL	IV (SC also studied) [63]
MLN9708 [18]	3.4/3500/31	62	18	Phase I	IV (Oral dosing efficacious <i>in vivo</i>)
CEP-18770 [19,20]	3.8/>100/<100	NR	NR—slowly reversible	Phase I	IV
Carfilzomib [16]	6/3600/2400	NR	Irreversible	Phase I	IV
PR-047 [21]	36/NR/NR	NR	Irreversible	Preclinical	Orally bioavailable
NPI-0052	3.5/28/430 [25]	13–20 [25,39]	Irreversible	Phase I	IV

Taula 3. Propietats de Bortezomib i inhibidors del proteasoma de segona generació. (NR=non-reactive, MM=multiple myeloma, MCL=mieloid chronic leukemia, SC=subcutaneously) (Dick L.R. et al. *Drug Discovery Today*, 2010, 15:243-9)²⁰³.

8.3 Els inhibidors del proteasoma en el melanoma

D'entre els mecanismes que condueixen a una major comportament agressiu del melanoma se'n poden destacar els següents:

Introducció

- La sobreexpressió de la proteïna antiapoptòtica Bcl-2²³⁰⁻²³², que pot ser per conseqüència d'una activació de la senyalització de la via de les MAP cinases o per mutacions en B-RAF o RAS²³³
- La desregulació de proteïnes involucrades en el cicle cel·lular, per deleció, silenciament i mutació, com CDKN2A/CDK4⁵³
- La pèrdua de la funció transcripcional de p53²³⁴
- L'activació constitutiva de la via NFκB^{235, 236}

Teòricament, qualsevol de les molècules implicades en la regulació d'aquests mecanismes podrien ser una bona diana terapèutica en el melanoma. Com hem vist, Bcl-2, proteïnes implicades en la regulació del cicle cel·lular, p53 i IκBα són degradades via proteasoma, la qual cosa va fer pensar que la utilització dels inhibidors del proteasoma podria resultar en un bon tractament per al melanoma. En aquest sentit, s'ha demostrat que els inhibidors del proteasoma són capaços d'induir apoptosi i inhibir el creixement cel·lular en models experimentals *in vitro* o *in vivo* de melanoma^{189, 237}. No obstant, el primer assaig clínic en pacients amb melanoma disseminat, en el que es va utilitzar Bortezomib en monoteràpia, no va donar resultats satisfactoris²³⁸.

Pels resultats obtinguts fins al moment, sembla difícil que enfocant el tractament del melanoma metastàtic cap a una única diana se sigui capaç d'aconseguir una remissió estable de la malaltia. Una explicació de l'aparició de resistències als tractaments utilitzats és que les cèl·lules de melanoma desenvolupen respostes compensatòries o que existeixen ja prèviament vies de senyalització redundants que s'activen quan algunes d'aquestes vies s'interrompen. Per tant, una estratègia per evitar o combatre aquests fenòmens consistiria en utilitzar simultàniament fàrmacs que ataquessin més d'una diana al mateix temps. En aquest sentit els inhibidors del proteasoma ja s'han utilitzat en combinació amb altres fàrmacs *in vitro* per sensibilitzar les cèl·lules de melanoma a diferents quimioterapèutics com Temozolomida²³⁹ i els inhibidors de calpaina²⁴⁰ i citostàtics²⁴¹. Particularment, l'ús de Temozolomida juntament amb Bortezomib ha inspirat un recent assaig clínic amb pacients²⁴². També s'ha vist que els inhibidors del proteasoma poden sensibilitzar les cèl·lules tumorals a la immunoteràpia amb interferó α^{243, 244} o a la radiació ionitzant²⁴⁵. Molts d'aquests mecanismes de sensibilització, es creu que estan mediat per la capacitat que tenen els inhibidors del proteasoma d'inhibir la via NFκB, ja que l'activació d'aquesta via s'ha descrit com a responsable de la resistència a fàrmacs o com a conseqüència de l'aplicació de radiació ionitzant.

8.4 Els inhibidors del proteasoma en el carcinoma d'endometri

El carcinoma d'endometri, com molts altres tipus de tumors, tenen la via NFκB constitutivament activada²⁴⁶, i s'ha vist que juga un paper clau en la transformació neoplàsica.^{193, 196} Per aquest motiu, es va creure que els inhibidors del proteasoma podrien funcionar bé com a agents terapèutics. En la bibliografia, els treballs referits a l'ús dels inhibidors del proteasoma per al tractament del carcinoma d'endometri són escassos. No, obstant cal destacar un treball *in vitro* on s'han estudiat els efectes de quatre inhibidors del proteasoma estructuralment diferents (Bortezomib, MG132, ALLN i Epoxomicina) en unes línies cel·lulars de carcinoma d'endometri²⁴⁷. Els autors van observar que els inhibidors del proteasoma eren capaços d'induir apoptosi en les línies cel·lulars, però que paradoxalment també incrementaven l'activitat de la via NFκB. Aquest fet va suggerir dues coses. Primer, que la mort cel·lular observada amb la utilització dels inhibidors del proteasoma en el carcinoma d'endometri no era deguda a un bloqueig de la via NFκB, com sempre s'ha postulat. Segon, que la utilització dels inhibidors del proteasoma en el carcinoma d'endometri en monoteràpia no és una bona idea, degut al seu efecte advers d'activació de la via NFκB

9. ELS RECEPTORS AMB ACTIVITAT TIROSINA CINASA COM A DIANES TERAPÈUTIQUES

D'ençà de la descoberta del primer receptor amb activitat tirosina cinasa fa més de 25 anys, varis membres d'aquesta família han esdevingut reguladors clau de processos cel·lulars crítics, com la proliferació, la diferenciació, la supervivència, el metabolisme, la migració cel·lular, la invasió i el control del cicle cel·lular²⁴⁸⁻²⁵⁰. L'ésser humà té 58 RTKs (receptor **tyrosine kinases**) coneguts, els quals es divideixen en 22 subfamílies (veure figura 24). L'IGFR (insuline **g**rowth **f**actor receptor) és un dels receptors més estudiats. Tots els RTKs tenen una arquitectura molecular similar, que consisteix en una regió d'unió al lligand, una regió intracel·lular, una regió hèlix transmembrana i una regió citoplasmàtica. La regió citoplasmàtica està formada pel domini TK (**tyrosine kinase**), pel grup carboxi terminal i per dos subunitats reguladores juxtamembranals. La morfologia general dels RTKs està altament conservada, des de el nematode *Caenorhabditis elegans* fins als humans, cosa que no és d'estranyar, donat el paper que tenen sobre els crítics processos cel·lulars anteriorment mencionats.

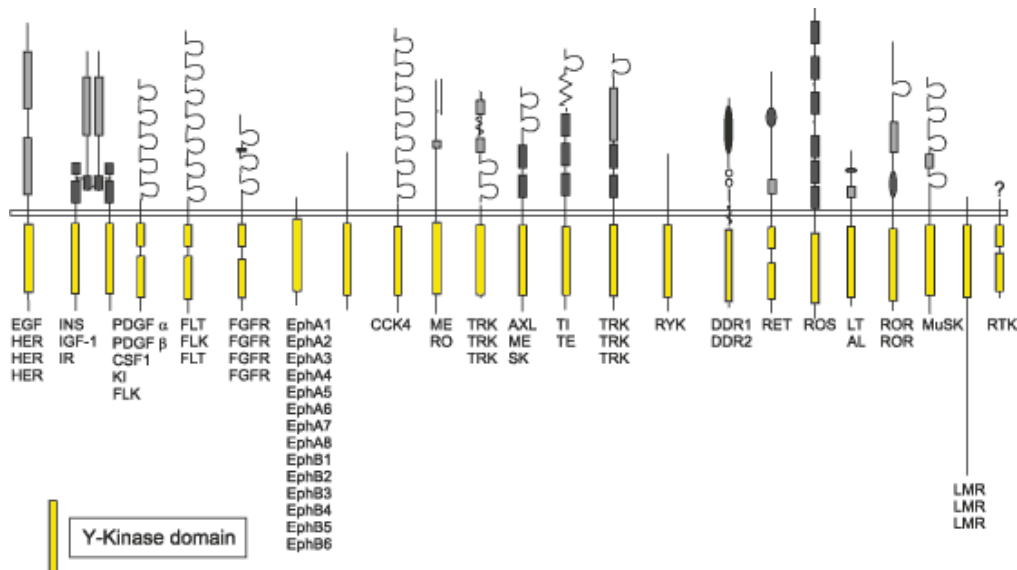


Figura 24. Representació esquemàtica dels RTKs en humans. Cada figura correspon a cada subfamília, en total 22. Sota de cada subfamília en queden anotats els receptors que hi formen part. Els dominis intracel·lulars queden representats en forma de rectangle groc. (Lemmon M.A. et al. *Cell*, 2010, 141:1117-1134)²⁵⁰.

De forma general, quan els lligands s'uneixen als receptors activen els RTKs mitjançant la inducció de la seva dimerització²⁴⁹. També, existeixen receptors que formen oligòmers, inclús amb l'absència del seu lligand, com és el cas de l'IGFR²⁵¹ i l'EGFR²⁵². Estudis estructurals han permès saber com es produeix la dimerització. S'ha vist que una regió de l'hèlix n'és la responsable. Un cop dimeritzats o oligomeritzats, un receptor del dímer o de l'oligòmer fosforil·la una o més tirosines veïnes i llavors el receptor fosforil·lat serveix com a lloc d'assemblatge (i d'activació) de proteïnes de senyalització intracel·lulars²⁴⁹. El primer substrat a fosforil·lar per part dels RTKs són els propis receptors.

L'autofosforil·lació en el domini cinasa juga un paper regulador molt important en la majoria de RTKs. Per exemple, en el cas de l'IGFR, la fosforil·lació en el seu bucle d'activació incrementa la seva eficiència catalítica de 50 a 200 vegades més²⁵³. Després d'aquesta primera autofosforil·lació, altres tirosines seran fosforil·lades en altres parts de la regió citoplasmàtica dels RTKs. Les fosfotirosines resultants serviran de lloc específics d'unió i reclutament d'altres molècules activades com a resposta a la estimulació al factor de creixement o lligand. Cada RTK té el seu mecanisme peculiar d'activació un cop s'ha unit al lligand. Les molècules que són activades i recrutades als llocs que han estat autofosforil·lats contenen dominis SH2 (**S**rc **h**omology **2**) i PTB (**P**hospho**t**irosine **b**inding) que específicament s'uneixen a la fosfotirosina^{254, 255}. Un exemple és Grb2. Aquestes molècules poden ser reclutades directament a les fosfotirosines en el receptor o indirectament mitjançant la unió amb altres proteïnes que han estat fosforil·lades pels RTK, amb les quals s'associen. Aquestes proteïnes poden ser FRS2, IRS1 (insulin receptor substrate-1) i Gab1 (the **G**rb2-associated **b**inder **1**)²⁵⁶. Aquestes proteïnes són fosforil·lades, la qual cosa correspon a la segona ronda de fosforil·lació. A la vegada, també contenen fosfotirosines que serviran de llocs d'unió d'un ampli repertori de proteïnes.

Finalment, les successives rondes de fosforil·lació comportaran l'activació de diferents cascades intracel·lulars com la via de les MAPK/ERK, PI3K/Akt/mTOR, fosfolipasa Cy, proteïna kinasa C, petites GTPases com Ras, Rho i RAC1 (**R**as-related **C**3 botulinum toxin substrate **1**)²⁵⁷. L'activació de totes aquestes vies induiran en últim lloc un augment de la proliferació i la supervivència cel·lulars.

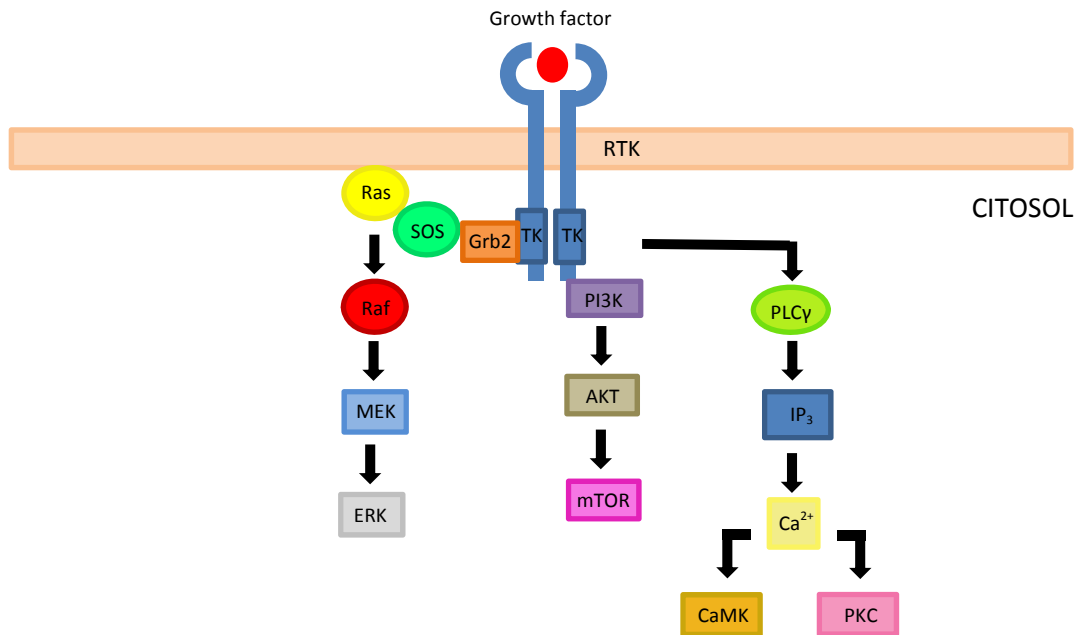


Figura 25. Esquema que representa les diferents vies de senyalització que són activades després de l'autofosforil·lació en residus de tirosina dels RTKs un cop s'hi ha unit el lligand.

Les mutacions en els RTKs així com la seva activació de forma aberrant s'ha relacionat amb el càncer, la diabetis, la inflamació, els desordres ossis severs, l'arteriosclerosi i l'angiogènesi^{250, 254}. Aquest fet ha donat una empenta al desenvolupament d'una nova generació de fàrmacs capaços de bloquejar o atenuar l'activitat dels RTKs.

La relació entre les mutacions en RTKs i el càncer no és nova. La primera evidència va aparèixer als anys 60 quan es va observar que les cèl·lules transformades víricament requerien de menys factors tròfics externs per proliferar que les mateixes cèl·lules sense transformar²⁵⁸. Aquella observació va suggerir que un mal funcionament de la via de senyalització dels factors tròfics o de creixement podrien jugar un paper important en la transformació cel·lular. Gairebé dues dècades més tard, altres estudis van demostrar que l'oncogen *v-sis* del virus del sarcoma en simis, originat per transducció del gen PDGF (**p**latelet-**d**erived **g**rowth **f**actor), i que el seu producte proteic (p28^{S/S}) promovia la transformació cel·lular mitjançant l'activació de PDGFR (**p**latelet-**d**erived **g**rowth **f**actor **r**eceptor) de manera autocrina^{259, 260}. A més a més, el producte de l'oncogen *v-erbB* del virus aviar de l'eritroblastosi es va trobar que corresponia a una forma truncada i constitutivament activada de EGFR²⁶¹. Més tard, el gen codificant per EGFR es va trobar amplificat i mutat en tumors primaris cerebrals²⁶²,

provocant la sobreexpressió i l'activació constitutiva de l'activitat tirosina cinasa de EGFR en mostres de teixit tumoral.

Des de llavors, s'ha anat acumulant moltíssima informació sobre la relació existent entre la desregulació i l'alteració de la funció de varis RTKs i diverses malalties. L'activació aberrant dels RTKs en els càncers humans es deu bàsicament a quatre mecanismes diferents: a una activació autocrina, a translocacions cromosòmiques, a la sobreexpressió de RTKs i a mutacions causants de guany de funció d'aquests. Recentment, nombrosos esforços de seqüenciació en varis tumors han donat com a resultat la identificació de mutacions de nombrosos RTKs. Aquestes s'estan col·leccionant en la base de dades del COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer)²⁶³.

Pel que fa al receptor **c-Kit** s'ha trobat expressat en varis tipus cel·lulars com les cèl·lules mare hematopoètiques i els melanòcits, on tindria un paper important en l'homeòstasi de les cèl·lules mare i en la migració dels melanòcits. El receptor c-Kit s'ha trobat mutat en varis càncers com el GIST, la leucèmia mieloide crònica, la leucèmia mastocitària i el melanoma. donant lloc a un guany de funció del receptor. Les mutacions s'han trobat en l'exó 17 (domini TK), l'exó 11 (regió juxtamembranal) i en els exons 8 i 9 que codifiquen per el domini D5 corresponent a la regió d'unió del seu lligand (SCF) amb el receptor²⁶⁴. Les mutacions en aquesta regió es creu que produeixen interaccions intermoleculares que estableixen dos dominis de dos receptors c-kit diferents, la qual cosa promou la dimerització constitutiva del receptor i fa innecessària la presència del lligand per la seva activació.

Pel que fa al receptor **EGFR**, aquest i altres membres de la seva família s'han trobat expressat en la majoria de cèl·lules d'origen epidèrmic, controlant la seva divisió cel·lular. Apart, s'han trobat sobreexpressats o mutats en diversos càncers, com el càncer de mama, el glioblastoma, el càncer de pulmó de cèl·lula no petita i en el carcinoma d'endometri. Per exemple, ErbB2, un receptor orfe que no té la típica estructura extracel·lular de l'ErbB està altament sobreexpressat com a resultat d'una amplificació gènica en un 30% del càncers de mama²⁶⁵. A més, la sobreexpressió de ErbB2 s'ha relacionat amb un pronòstic pobre²⁶⁶. Tot i que l'EGFR es troba sobreexpressat en diversos càncers, la seva amplificació gènica sembla estar restringida en el glioblastoma, on ocorre en un 35% d'aquests càncers i causa tant la sobreexpressió de la variant salvatge com de la variant mutada²⁶². També, en el cas dels glioblastomes, s'han trobat mutacions en la regió extracel·lular d'aquest receptor que en promouen la seva activació²⁶⁷. A més a més, en el càncer de pulmó de cèl·lula

Introducció

no petita, s'han trobat mutacions tant en el domini TK²⁶⁸ com en la regió juxtamembranal de l'EGFR²⁶⁹. Les mutacions en aquesta regió promourien la dimerització del receptor sense necessitar la unió amb el seu lligand, l'EGF.

Els receptors de la família de **VEGFR** (vascular endothelial growth factor receptor), VEGFR1 (també conegut com a Flt-1), VEGFR2 (també conegut com a Flk1 o KDR) i VEGFR3 (també conegut com a Flt4) s'expressen bàsicament en les cèl·lules endotelials, a més de en varis tumors sòlids, i promouen una senyalització intracel·lular que condueix a l'angiogènesi tumoral²⁷⁰. Aquells tumors sòlids més irrigats presenten una alta expressió d'aquests receptors com en el cas del carcinoma renal. Una sobreexpressió d'aquests receptors està relacionada amb pronòstic pobre i a un risc incrementat de la metàstasi²⁷¹.

Els receptors **PDGFRs** s'han trobat expressats en diferents cèl·lules mesenquimals, com en el teixit connectiu i la glia²⁷², i en els citotrofo blasts placentaris²⁷³, suggerint un paper important en la migració de les cèl·lules mesenquimals i en l'embriogènesi. S'ha observat que tant els PDGFRs com el seus lligands (PGDFs) són essencials per al correcte funcionament del ronyó, del sistema cardiovascular, del cervell, dels pulmons i del teixit connectiu. En adults, els PDGFRs i PDFs són importants en la inflamació, l'angiogènesi i la transformació tumoral²⁷⁴. Hi ha dos tipus de receptors PDGFR, PDGFR α i PDGFR β . Aquests receptors s'han trobat sobreexpressats en varis tumors sòlids i també en l'estroma del voltant²⁷⁵. El PDGFR es troba sobrerregulat durant la progressió tumoral per estimular el creixement i la proliferació dels fibroblasts que envolten i suporten les cèl·lules endotelials²⁷⁶. L'activació constitutiva dels receptors PDGFR α i PDGFR β com a resultat d'una translocació cromosòmica s'ha vist en leucèmies. D'altra banda, s'ha trobat l'activació de PDGFR α com a resultat de mutacions amb guany de funció en els tumors del tracte gastrointestinal. Apart, la presència d'una senyalització autocrina com a conseqüència d'una sobreexpressió del lligand PDGF-B ha estat clarament implicada en la patogènesi del dermatofibrosarcoma.²⁷⁴

Totes aquestes evidències fan pensar que els receptors tirosina cinasa serien una bona diana terapèutica en molts càncers.

9.1 Vies de senyalització associades als receptors amb activitat tirosina cinasa

La unió del lligand als receptors tirosina cinasa desencadena l'activació de múltiples vies de senyalització com la via PI3K/Akt/mTOR, la via de les MAPK, la via de la PKC i la via de la PLC γ , entre altres.

9.1.1 Via PI3K/Akt/mTOR

Dins de l'eix de senyalització PI3K/Akt/mTOR hi participen aquestes tres proteïnes clau en aquest ordre.

Akt, també anomenada PKB, és una serina/treonina cinasa altament conservada evolutivament. La seva activació constitutiva s'ha relacionat amb la resistència a l'apoptosi, a la proliferació cel·lular i a un augment del metabolisme cel·lular. En mamífers, existeixen tres isoformes d'Akt (Akt1, Akt2 i Akt3), les quals estan codificades per diferents gens i presenten una homologia de seqüència del 80%. Un cop s'ha produït la unió del lligand als RTK, la subunitat catalítica p110 de la **PI3K** s'activa per dues possibles vies: pel reclutament amb la seva unitat reguladora p85 o per la proteïna Ras. Un cop activada, p110, fosforil·la els difosfoinosítids (PIP₂) a la tercera posició de l'anell per generar els trifosfoinosítids (PIP₃). En un primer pas, aquests PIP₃ s'uneixen al domini PH, produint la translocació d'Akt a la membrana plasmàtica. En un segon pas, Akt és fosforil·lada per la PDK1 (**PI3K-dependent kinase-1**) en el residu treonina 308, localitzat en el domini catalític, i per PDK2 (**PI3K-dependent kinase-2**) en el residu serina 473, localitzat en el motiu hidrofòbic c-terminal. Per permetre la total activació d'Akt, aquests dos residus necessiten estar fosforil·lats^{277, 278}. L'activitat d'Akt està negativament regulada per PTEN, la fosfatasa que desfosforil·la els PIP₃ convertint-los en PIP₂.

Akt pot ser activada en el càncer per nombrosos mecanismes. Per exemple, per mutació o deleció de PTEN o per una amplificació o sobreexpressió de la subunitat catalítica p110 de la PI3K. L'activació d'Akt deguda a una mutació en PTEN ocorre freqüentment en càncers, especialment en el carcinoma d'endometri²⁷⁹. Això fa que la via Akt es consideri desregulada en aquest càncer.

Introducció

Un cop Akt està activada, aquesta pot activar **mTOR** a través de diferents mecanismes. Per exemple, el pot activar a través de la fosforil·lació de TSC2 (**tuberous sclerosis complex 2**), el qual, al seu torn, inactiva l'activitat de mTOR²⁸⁰, ja que TSC2 forma un heterodímer amb TSC1 (**tuberous sclerosis complex 1**), que gràcies a la seva activitat GTPàsica pot inhibir l'activitat de Rheb, una petita GTPasa essencial per a l'activació de mTOR. És a dir, si TSC2 s'inhibeix, aquest no pot inhibir Rheb i tenint Rheb actiu s'activa mTOR. D'altra banda, Akt pot inhibir AMPK, proteïna coneguda per la seva activitat supressora tumoral²⁸¹. AMPK podria activar TSC2, però en restar inhibida, s'aconsegueix la total inhibició de TSC2, comportant l'activació de mTOR. Així doncs, per a l'activació de mTOR, s'han de sobrepassar dues barreres supressores tumorals: PTEN i l'heterodímer TSC1-TSC2. Un cop s'ha activat mTOR, aquesta forma un complex amb Raptor (**regulatory-associated protein of mTOR**) induint una acceleració de la traducció a través de l'activació i fosforil·lació de p70S6K. Aquesta proteïna és un efector "downstream" de mTOR, que activa S6K. D'altra banda, mTOR inhibeix la 4E-BP (eIF4E binding protein), la qual manté unida i inactiva eIF4E. Aquest és un factor iniciador de la traducció en eucariotes involucrat en direccionar els ribosomes a la estructura *cap* dels mRNAs, afavorint la traducció i així accelerant nombrosos processos cel·lulars crucials per al creixement cel·lular. Apart, mTOR controla l'entrada a la cèl·lula dels factors de creixement IGF-1, IGF-2 i d'aminoàcids²⁸⁰ i, actua com a un sensor cel·lular de nutrients, de nivells d'energia i d'estatus redox²⁸².

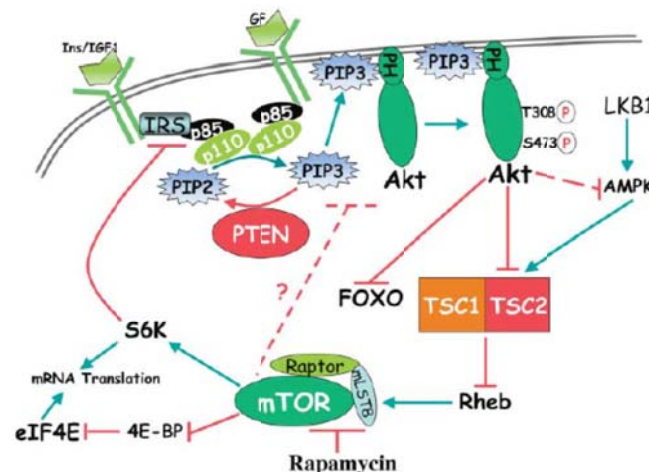


Figura 26. Esquema de l'activació de l'eix PI3K/Akt/mTOR. (Hay N. et al. *Cancer Cell*, 2005, 179-83)²⁸³.

9.1.2 Via de les MAPK

La via de senyalització de les MAPK és un nom genèric que dona nom a quatre cascades diferents, les quals s'anomenen depenent de l'últim efector cinasa "downstream"²⁸⁴. Aquesta última proteïna pot ser ERK1/2, JNK1/2/3, p38-MAPK i Erk5. Tot i que totes aquestes cascades estan regulades per la senyalització procedent dels RTKs, es considera que aquests són els majors reguladors de la cascada ERK1/2.

Una vegada el lligand s'ha unit al RTK, aquest s'activa i s'autofosforil·la en residus de tirosina. Aquest fet comporta que la proteïna adaptadora Grb2 s'hi pugui unir a través del seu domini SH2 i a través del seu domini SH3 pugui interaccionar amb Sos. Amb això, Sos pot ser reclutat a prop de la membrana plasmàtica, on promouria l'intercanvi de GDP per GTP en una petita proteïna G anomenada **Ras**. Aquest Ras actiu, ja unit a GTP podria unir-se i activar Raf. A continuació, **Raf** indueix la fosforil·lació del residu serina en el loop d'activació de **Mek**²⁸⁵. Un cop Mek 1/2 està fosforil·lada pot fosforil·lar i activar **ERK**, mitjançant la fosforil·lació en dos residus, una treonina i una tirosina localitzats en el bucle d'activació i separats per un àcid aspàrtic (ERK 1/2)²⁸⁶. Un cop ERK està activa pot fosforil·lar nombroses proteïnes citoplasmàtiques i del citoesquelet, com la família S6K ribosomals de 90 KDa (Rsk)²⁸⁷. Apart, un cop Erk i Rsk 1/2 estan activades poden translocar al nucli, on Erk permetrà la fosforil·lació i l'activació de nombrosos factors de transcripció com Sp1, E2F, Elk-1 i AP-1²⁸⁸. Tot això donarà lloc a una activació de la proliferació, la migració i la diferenciació cel·lular.

Com hem vist la proteïna Ras forma part de la via de les MAPK. Aquesta presenta tres isoformes: Hras, Nras i Kras. Es creu que molts efectors d'aquesta via estan permanentment activats deguts a mutacions en RAS. Aproximadament, un 25% dels tumors humans presenten mutacions en un d'aquests tres gens, tot i que el més freqüent apareix en KRAS (70-90%). Aquest gen s'ha trobat freqüentment mutat en el carcinoma d'endometri i també en el melanoma, però en menor freqüència.

Un altra proteïna, el gen de la qual es troba freqüentment mutat en càncer, es B-raf, un altre component de la via de les MAPK. La mutació més freqüent és l'anomenada V600E, situada en el domini cinasa d'aquesta proteïna serina/treonina cinasa. Això fa que la proteïna ERK estigui constitutivament fosforil·lada i per tant, també la cascada ERK. S'ha trobat que B-raf es troba mutat en un 30-70% dels melanomes i també en el carcinoma d'endometri.

Introducció

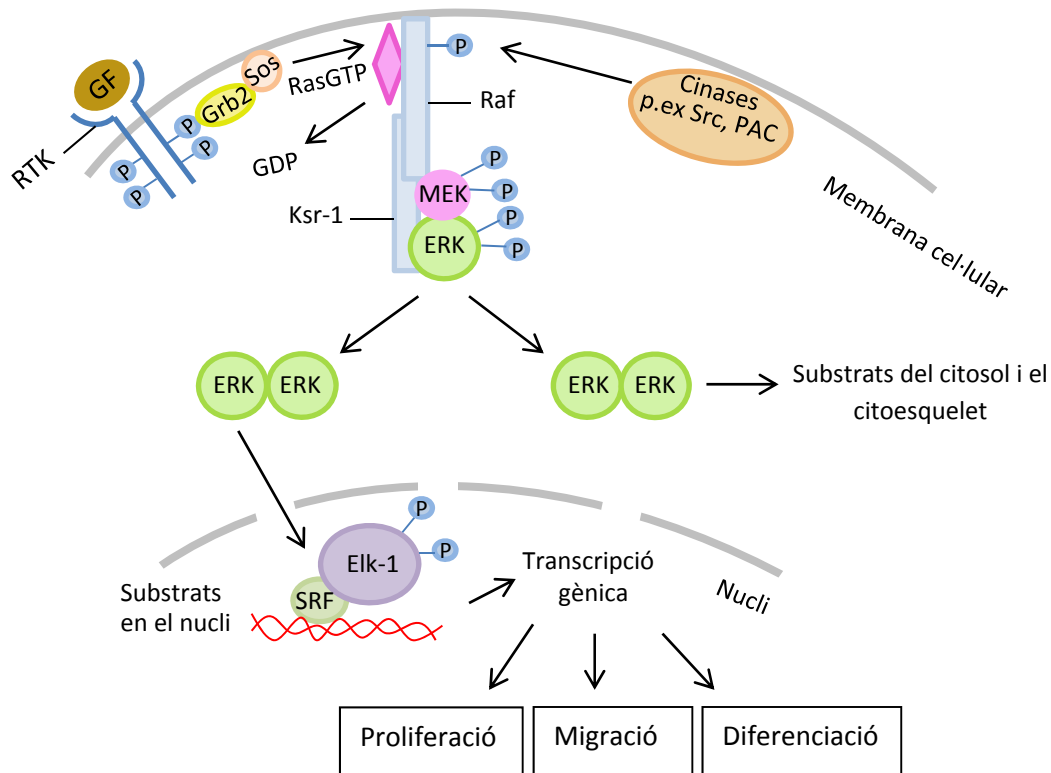


Figura 27. Esquema de l'organització i funció de la via Ras-Raf-MEK- ERK. La unió del lligand al receptor RTK produeix la dimerització i l'autofosforil·lació en residus de tirosina. Aquestes tirosines serveixen com a lloc d'unió d'altres molècules com Grb2, i més tard s'unirà Sos. Aquest complex activa la proteïna Ras, estímulant-la a intercanviar GDP per GTP. Aquest canvi produeix un canvi conformacional en Ras, que li permet unir-se a Raf, reclutant-lo des de el citosol a la membrana plasmàtica. Raf activat fosforil·la i activa MEK, que al seu torn, fosforil·la i activa ERK. La proteïna Ksr-1 serveix de lloc d'anclatge de la via. ERK té nombroses dianes citosòliques i pot translocar a nucli per activar la transcripció gènica, que donarà lloc a proliferació cel·lular, migració i diferenciació.

9.2 Els inhibidors de receptors amb activitat tirosina cinasa

La FDA ha aprovat l'ús de varies molècules que s'han desenvolupat per inhibir RTKs activats, per al tractament del càncer i altres malalties. Aquestes molècules es poden dividir en dues categories diferents: inhibidors de pes molecular petit o anticossos monoclonals. Els inhibidors de pes molecular petit competeixen per als llocs d'unió de l'ATP en aquests receptors, els quals es troben en el domini intracel·lular TK^{289, 290}. Aquests petits inhibidors són actius oralment i poden ser combinats fàcilment amb altres formes de quimioteràpia o radioteràpia. Els anticossos monoclonals poden interferir tant en l'activació dels RTKs, bloquejant-la, com etiquetar les cèl·lules

expressores de RTKs perquè siguin reconegudes pel sistema immune i així poder ser destruïdes²⁹¹.

Small Molecule	Mab	Target	Disease	Year of approval
Imatinib (Gleevec)		PDGFR, KIT, Abl, Arg	CML, GIST	2001
Gefitinib (Iressa)		EGFR	Esophageal cancer, Glioma	2003
Erlotinib (Tarceva)		EGFR	Esophageal càncer, Glioma	2004
Sorafenib (Nexavar)		Raf, VEGFR, PDGFR, Flt3, KIT	Renal cell carcinoma	2005
Sunitinib (Sutent)		KIT, VEGFR, PDGFR, Flt3	Renal cell carcinoma, GIST, Endocrine pancreatic cancer	2006
Dasatinib (Sprycel)		Abl, Arg, KIT, PDGFR, Src	Gleevec-resistant CML	2007
Nilotinib (Tasigna)		Abl, Arg, KIT, PDGFR	Gleevec-resistant CML	2007
Lapatinib (Tykerb)		EGFR, Erb2	Mammary carcinoma	2007
Trastuzumab (Herceptin)		Erb2	Mammary carcinoma	1998
Cetuximab (Erbix)		EGFR	Colorectal cancer. Head and neck cancer	2004
Bevacizumab (Avastin)		VEGFR	Lung cancer, Colorectal cancer	2004
Panitumumab (Vectibix)		EGFR	Colorectal cancer	2006

Taula 4. Llistats de molècules aprovades per la FDA per al tractament del càncer, que actuen inhibint els RTKs. En blau es mostren els inhibidors de pes molecular petit i en groc els anticossos monoclonals (*modificat de: Lemmon M.A. et al. Cell, 2010, 141:1117-1134*)²⁵⁰

Apart, dels inhibidors indicats en la taula, també s'han sintetitzat Canertinib, Vatalanib, Semaxinib i Leflunomide, però encara no han estat aprovats per la FDA, degut a la seva limitada eficàcia i al seu modest poder inhibitori. Canertinib és un inhibidor de EGFR; Vatalanib és un inhibidor de VEGFR i a més concentració també de PDGFR β , c-Kit i c-FMS; Semaxinib és un inhibidor de VEGFRs i també de c-Kit i Flt-3; Leflunomide és un inhibidor de PDGFR.

Introducció

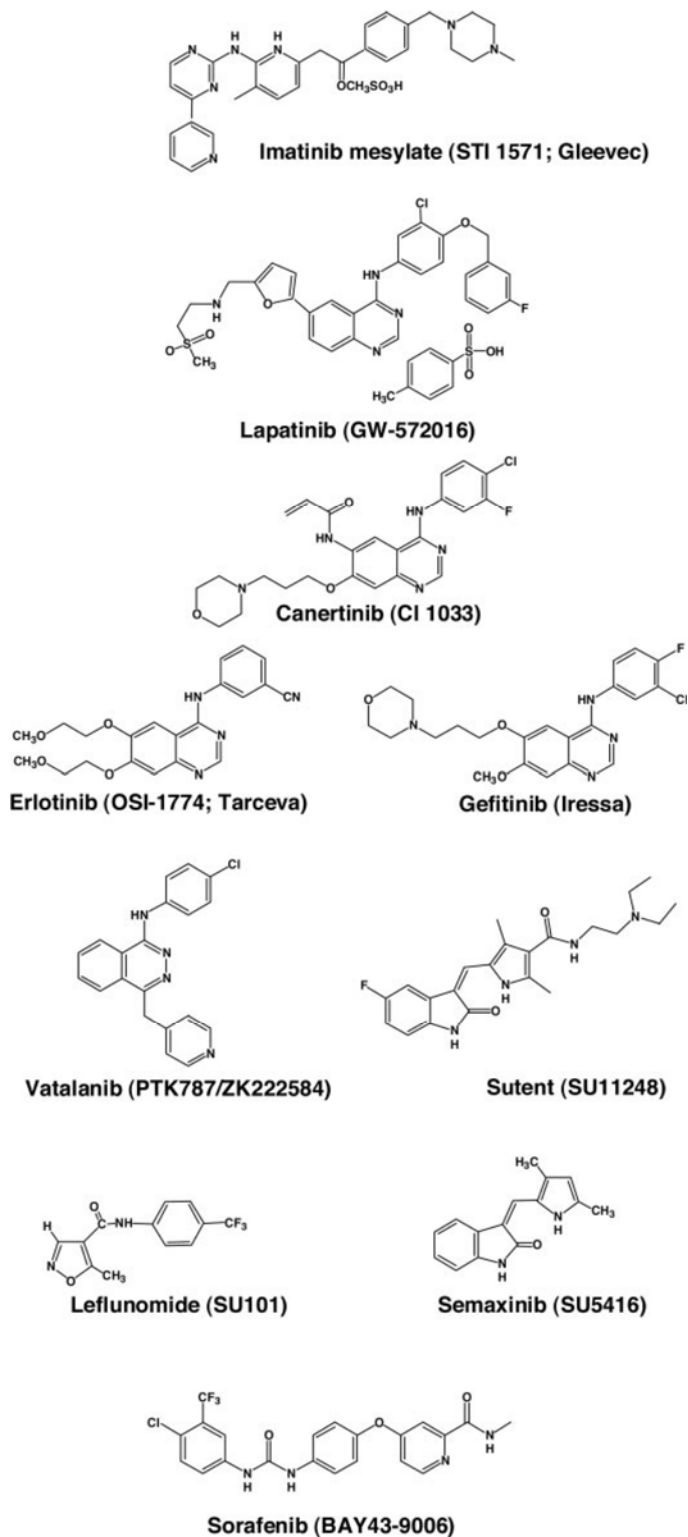


Figura 28. Estructures químiques d'alguns inhibidors de molècules amb activitat tirosina cinasa, utilitzats com a teràpia contra el càncer. (Arora A. et al. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2005, 315:971-979)²⁸¹.

Com que els inhibidors de pes molecular petit tenen com a diana els llocs d'unió a l'ATP, apart de tenir afinitat per RTKs també presenten afinitat per altres molècules

amb activitat tirosina cinasa, com és el cas de Imatinib. Aquest fàrmac va ser identificat en el programa de desenvolupament d'inhibidors de PDGFR, però més tard es va veure que inhibia de forma molt potent Abl, una molècula amb activitat tirosina cinasa que no és un receptor.

A continuació, passarem a explicar dos inhibidors de pes molecular petit: Imatinib i Sunitinib.

Imatinib mesylate (STI571; Gleevec®) és un inhibidor comercialitzat per Novartis que s'està utilitzant per al tractament de la CML des de la seva aprovació per part de la FDA, l'any 2001, en demostrar una resposta clínica favorable en diversos assajos clínics. Aquesta leucèmia es caracteritza perquè la molècula Abl presenta un activitat tirosina cinasa constitutiva, a causa de la formació de la quimera oncogènica Bcr-Abl, com a conseqüència de la translocació cromosòmica entre els cromosomes 9 i 22, coneguda com a cromosoma Philadelphia. Aquesta característica genètica s'ha observat en el 95% dels pacients afectats per CML¹. La formació de la quimera suposa una desregulació de les vies de senyalització intracel·lulars donant lloc a un augment de la proliferació i resistència a l'apoptosi dels progenitors hematopoètics. Imatinib és capaç d'inhibir tant Abl com Bcr-Abl²⁹², per la qual cosa es considera el fàrmac ideal per atacar aquest tipus de càncer. Apart de tractar la CML també s'ha utilitzat per al tractament del GIST, donat la seva activitat inhibidora dels receptors c-Kit i PDGFRs. Se sap que la tant la desregulació de c-Kit com de PDGFR juguen un paper important en la formació del GIST²⁹³. Aquests tumors es caracteritzen per expressar c-Kit en la superfície cel·lular. Imatinib inhibeix c-Kit salvatge i c-Kit mutat a unes concentracions similars a les requerides per la inhibició de Bcr-Abl²⁹⁴.

Sunitinib malate (SU11248; Sutent®) és un inhibidor comercialitzat per Pfizer que inhibeix de forma potent VEGFR (1,2 i 3), PDGF (α i β), c-Kit i Flt-3^{12, 295}. També té activitat inhibidora, però en menys potència de Ret, FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1), c-met, IGFR-1R i CSF-1R (colony-stimulating factor receptor 1)¹². En un primer moment, va ser aprovat per la FDA l'any 2006 per al tractament del càncer renal i per a aquells GIST que es mostraven resistents a la teràpia amb Imatinib²⁹⁶. Més tard, la seva utilització s'ha estès també per al càncer pancreàtic. En un principi, es va dissenyar per poder superar la potència del seu predecessor, Semaxinib, i de fet, va mostrar una major inhibició de VEGFR2, PDGFR β , c-Kit i FGFR1 comparat amb aquest^{290, 297, 298}. També, Sunitinib és més soluble i més estable que altre anàlegs sintetitzats prèviament²⁹⁹. A més a més, comparat amb Imatinib, Sunitinib ha

Introducció

demostrat ser més potent a l'hora d'inhibir c-Kit i els PDGFRs, cosa que ha fet que es consideri com a un segon fàrmac per tractar el GIST¹².

La inhibició de tots aquests receptors per part del Sunitinib, bloqueja diverses transduccions de senyals i per tant, afecta a nombrosos processos cel·lulars com el creixement tumoral, la metàstasi i l'angiogènesi³⁰⁰.

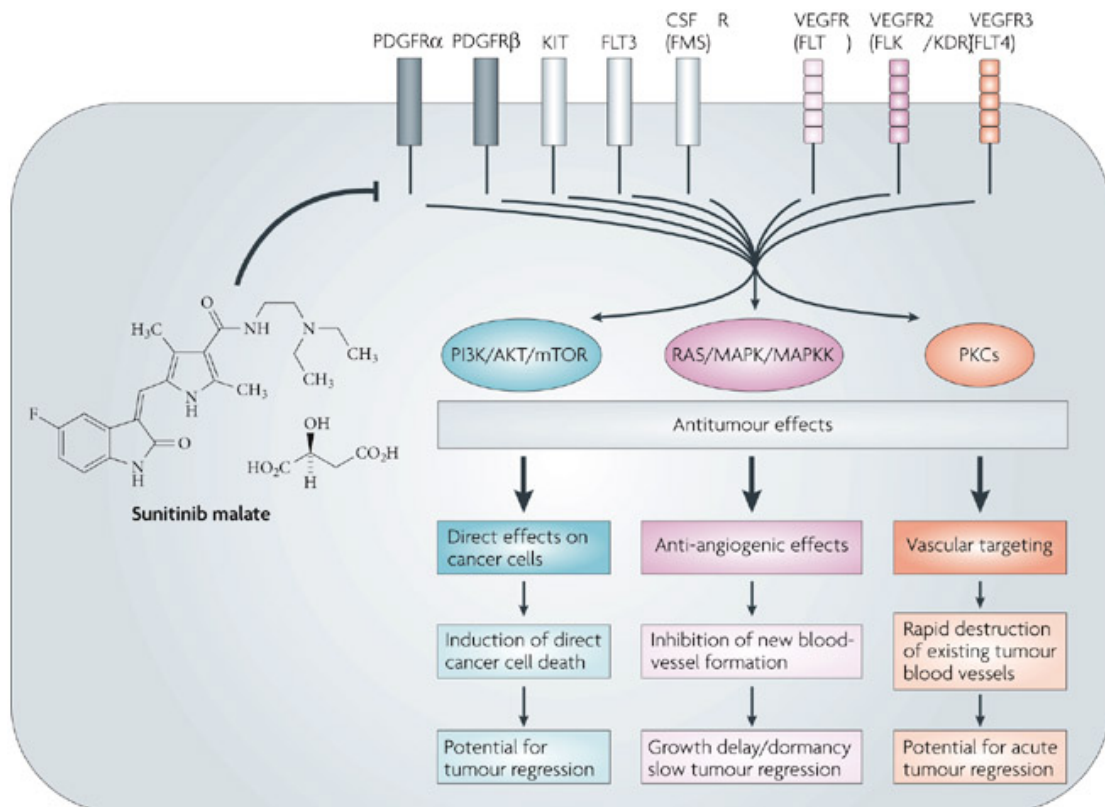


Figura 29. Vies de senyalització implicades i efectes cel·lulars en la inhibició de receptors amb activitat tirosina cinasa, dianes de Sunitinib. (Atkins M. et al. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, 5:279-280)²⁹⁶.

La inhibició de receptors amb activitat tirosina cinasa per part de Sunitinib bloqueja tres vies de senyalització diferents. La via PI3K/Akt/mTOR^{301, 302}, la via de les MAP cinases i la via de la PKC²⁹⁶. El bloqueig de la via PI3K/Akt/mTOR té com a resultat un efecte citotòxic directe en les cèl·lules del tumor. D'altra banda, Sunitinib també té un efecte important antiangiogènec i de destrucció de la vascularització tumoral. Tots dos fenòmens es produeixen a través del bloqueig de la via de les MAP cinases i PKC.

Així, doncs, l'atractiu de Sunitinib recau en el seu doble efecte inhibidor del creixement cel·lular del tumor i de l'angiogènesi. A més, de forma interessant i sabent l'efecte pleiotròpic dels RTKs s'ha trobat recentment que Sunitinib, juntament amb altres receptors amb activitat tirosina cinasa, poden inhibir la via NFκB³⁰³.

9.3 Els inhibidors de receptors amb activitat tirosina cinasa en el melanoma

Fins al moment, l'ús d'inhibidors de receptors amb activitat tirosina cinasa en el melanoma, ha anat dirigit a inhibir **c-Kit**. La possibilitat de que c-Kit fos una diana terapèutica en el melanoma ja fa temps que s'hipotetitza. De fet, c-Kit és una proteïna que actua com a un receptor de factor de creixement fonamental dels melanòcits epidèrmics i juga un paper primordial en la diferenciació i la migració de les cèl·lules melanocítiques durant el desenvolupament embrionari³⁰⁴. En concordança, molts melanomes expressen c-Kit. No obstant, algunes dades clíniques i experimentals apuntaven en contra d'aquesta hipòtesi fins fa poc anys, ja que, d'una banda s'havia demostrat que la expressió de c-Kit disminuïa durant la progressió tumoral de molts melanomes^{305, 306}. D'altra banda, en algunes línies cel·lulars, la pèrdua d'aquest factor s'havia relacionat amb un augment de la seva capacitat metastatitzant^{307, 308}. A més a més, els primers assajos clínics realitzats amb pacients amb melanoma metastàtic, utilitzant l'inhibidor de c-Kit, Imatinib, no van donar resultats esperançadors^{309, 310}. A pesar de que existien evidències experimentals i clíniques prèvies de respostes aïllades a Imatinib i de mutacions molt ocasionals en l'exó 11 de KIT en algunes línies de melanoma³¹¹⁻³¹⁴, no fa ser fins la publicació del treball de Curtin i col·laboradors l'any 2006⁵⁹ fins que es va establir que en un 39%, un 36% i un 28% de determinats tipus de melanoma, de per si poc freqüents, (melanoma de mucoses, melanoma acral i melanoma sobre pell amb dany actínic crònic, respectivament), es trobaven aberracions genètiques de KIT que convertien a la proteïna codificada per aquest gen en una possible diana per al seu tractament. La baixa representació d'aquests tipus de melanomes, explicarien la falta de resposta observada en els assajos clínics mencionats³¹⁵.

Les alteracions genètiques de KIT inclouen mutacions i amplificacions d'aquest gen. Aquesta dada és important perquè no necessàriament els dos tipus d'alteracions tenen perquè tenir el mateix significat biològic. Del total d'aberracions genètiques de

Introducció

KIT, només un 15-38%, un 8-23% i un 0-17% (dels melanomes de mucoses, acrals i pell amb dany actínic crònic, respectivament) corresponen a mutacions. La majoria de mutacions, tal i com ocorre en els GISTs, estan localitzades en l'exó 11. No obstant, en el melanoma, existeixen mutacions en major proporció que en el GIST, en els exons 13, 17 i 18, i que precisament corresponen a mutacions associades a resistència a Imatinib. Per altra banda, en el melanoma, s'ha descrit la coexistència de mutacions i amplificacions de KIT. Curiosament, depenent si c-Kit està amplificat o mutat es poden trobar grans diferències després del tractament amb Imatinib, tal i com es descriu en un assaig clínic³¹⁶, on la resposta dels pacients era del 50% en aquells pacients portadors de melanomes amb mutacions de KIT, mentre que cap pacient portador d'amplificacions del gen va respondre positivament al tractament amb Imatinib. Per tant, des del punt de vista clínic, els estudis moleculars semblen imprescindibles per establir l'existència d'alteracions d'aquest gen³¹⁷⁻³²¹, i indicar així el tractament amb inhibidors de c-kit, com Imatinib, ja que els resultats obtinguts fins al moment semblen indicar que no sempre existeix una relació entre la positivitat o negativitat immunohistoquímica per a c-Kit i la presència o absència d'aberracions genètiques.

A més de Imatinib, també actuen inhibint l'activitat tirosina cinasa de c-Kit, Sunitinib, Dasatinib i Sorafenib. La capacitat d'aquests fàrmacs per induir la regressió de melanomes portadors de mutacions activadores de KIT s'ha demostrat en varis casos clínics i assaigs in vitro^{318, 322-326}.

En la línia de la utilització de Sunitinib en el tractament del melanoma, varies evidències addicionals apunten a la seva utilitat, ja que s'ha observat la presència d'altres receptors diana de Sunitinib com **PDGFRs**^{306, 327} i **VEGFRs**^{328, 329} en el melanoma i en alguns casos la seva expressió sembla augmentar a mesura que avança l'estadi del melanoma. Concretament, d'un banda, sembla ser que l'expressió de VEGFR2 en un tumor sembla bastant restringida a aquelles cèl·lules malignes de llinatge melanocític^{306, 330}, i la sobreproducció del lligand VEGF juntament amb els seus receptors s'ha vist que media el creixement de les cèl·lules de melanoma mitjançant un mecanisme autocrí^{329, 331}. Per altra banda, PDGFR α s'ha vist sobreexpressat en un nombre important de melanomes malignes^{308, 327, 332}, i també els seus lligands, els quals podrien participar en un possible mecanisme autocrí³²⁷. No és el cas de PDGFR β , el qual no es troba expressat en el melanoma³²⁷. Pel que fa referència a mutacions en aquests receptors, no s'han observat mutacions en els VEGFRs ni en PDGFRA³³³ en el melanoma. En el cas de PDGFRA, es va estudiar la presència de mutacions en

melanomes de tipus primari en els exons 10, 12, 14 i 18, comunament descrits com a *hotspots* d'aquest gen, però no es va observar la presència de cap mutació.

Donada l'expressió de RTKs en el melanoma, varis d'ells importants per la progressió tumoral, podríem dir que Sunitinib resultaria ser un tractament raonable per al melanoma metastàtic.

9.4 Els inhibidors de receptors amb activitat tirosina cinasa en el carcinoma d'endometri

La presència de receptors amb activitat tirosina cinasa i dels seus lligands ha estat estudiada extensament en el carcinoma d'endometri. Pel que fa a **c-Kit**, tant aquest receptor³³⁴⁻³³⁷ com el seu lligand, SCF³³⁵, s'han trobat expressats en el carcinoma d'endometri, suggerint la existència d'un possible bucle autocrí que pugui afavorir la progressió d'aquest càncer. No obstant, en general, sembla no haver diferències significatives entre la expressió c-Kit en el carcinoma d'endometri i en el teixit sa^{335, 336}. Fins i tot, en el teixit sa, l'expressió de c-Kit varia depenent en l'estadi en que es trobi l'endometri, ja sigui proliferatiu o secretor³³⁶. D'altra banda, sí que s'ha relacionat una major expressió de c-Kit en aquells carcinomes d'endometri recurrents comparats amb els tumors primaris³³⁴ i també una major freqüència de les metàstasis i invasió miometrial i una menor supervivència en aquells pacients portadors de tumors c-Kit positius³³⁷. Per tant, sembla ser que c-Kit podria tenir un paper important durant la progressió del carcinoma d'endometri, però no en la seva gènesi.

Pel que fa a la utilització d'inhibidors de receptors amb activitat tirosina cinasa, només s'ha pensat en la utilització de Imatinib, però més per l'existència de receptors **PDGFRs** que per c-Kit³³⁴. Concretament s'ha vist que tant els carcinomes primaris com els recurrents d'endometri presenten una alta positivitat per PDGFRs, sent del 100% en els tumors recurrents. A més, també s'ha demostrat la presència dels receptors PDGFRs fosforil·lats en teixits tumorals, incrementant-se en aquells carcinomes d'endometri recurrents. Aquests fets, posen de manifest el paper d'aquests receptors PDGFRs en la malignitat del carcinoma d'endometri. També estan en concordància amb aquells treballs que apunten a PDGFR α com a diana terapèutica en altres càncers emparentats amb el carcinoma d'endometri, com els sarcomes uterins³³⁸ i el càncer ovàric²⁰⁰.

Introducció

Una altra família receptors interessants en el carcinoma d'endometri, que són diana de Sunitinib, podrien ser els **VEGFRs**. Aquests receptors (VEGFR-1, VEGFR-2 i VEGFR-3) s'han trobat expressats tant en les cèl·lules tumorals com en les cèl·lules de l'estroma i endotelials adjacents^{339, 340} en el carcinoma d'endometri. Alhora, també s'ha vist una forta expressió dels seus lligands en al carcinoma d'endometri comparada amb la trobada en l'epitel·li normal. També, s'ha relacionat una major immunitació de VEGFR-3 i VEGF-D en aquells casos de més invasió miometrial i metàstasi³⁴⁰. Aquests fets suggereixen la importància d'unes possibles senyalitzacions autocrines i paracrines durant la progressió del carcinoma d'endometri.

Pel que fa a mutacions de KIT, PDGFR i VEGFR, no hi ha cap treball que demostrï la existència de mutacions en aquests gens en el carcinoma d'endometri.

Sunitinib, tot i que amb menys afinitat, actua també inhibint altres receptors amb activitat tirosina cinasa com **EGFR**, **CSF-1R** i **FGFR**¹². Això és especialment rellevant, ja que s'ha vist que expressió de EGFR en el carcinoma d'endometri i una forta expressió s'ha correlacionat amb una menor supervivència i amb un major grau histològic³⁴¹. D'altra banda, hi ha estudis que demostren la presència de CSF-1R (**colony stimulating factor receptor 1**) en el carcinoma d'endometri, el qual s'ha associat a un pronòstic pobre i a una major potència invasiva^{342, 343}. A més a més, s'han trobat mutacions de guany de funció de FGFR2 en el 12% dels carcinomes d'endometri³⁴⁴, i la pèrdua d'aquest receptor induïx mort en línies cel·lulars de carcinoma d'endometri³⁴⁵. Tots aquests fets i els anteriorment mencionats apunten que Sunitinib podria suposar un bon tractament per al carcinoma d'endometri, donat que aquest expressa molts dels receptors diana de Sunitinib i alhora aquests receptors són importants per a la progressió del carcinoma endometrial.

Objectius

El melanoma, un cop disseminat, és un càncer que presenta molt mal pronòstic i resulta altament resistent a la quimioteràpia convencional. Com que el tractament futur del melanoma metastàtic sembla encaminat a la cerca de noves teràpies, molts esforços s'han sumat a l'hora de trobar noves dianes terapèutiques que puguin ser útils per aquest càncer i així disposar de tractaments més efectius.

Pel que fa referència al carcinoma d'endometri, aquest càncer presenta molt poques opcions terapèutiques un cop es troba en fase avançada, fet que ocorre en un 20% dels carcinomes. En aquest sentit, és un fet crucial trobar nous tractaments per al carcinoma d'endometri que siguin útils

Dit això, hem volgut avaluar l'efecte de diversos agents antitumorals, tant sols com combinats, utilitzats en altres tipus de càncer. Aquestes anàlisis farmacològiques les hem dut a terme principalment en el melanoma però també en el carcinoma d'endometri. Els objectius del nostre treball van ser els següents:

1. Analitzar l'expressió de receptors de la somatostatina i l'efecte en la proliferació de dos anàlegs de la somatostatina, SOM230 i Octreotide, en línies cel·lulars de melanoma.
2. Caracteritzar l'efecte en la proliferació i l'apoptosi de quatre inhibidors del proteasoma estructuralment diferents, Bortezomib, MG132, ALLN i Epoxomicina en línies cel·lulars de melanoma.
3. Evaluar l'efecte del tractament combinat de Bortezomib i l'inhibidor de receptors amb activitat tirosina cinasa Sunitinib en línies cel·lulars de melanoma. Trobar l'aplicabilitat d'aquesta teràpia en melanomes concrets.
4. Testar l'efecte del tractament combinat de Bortezomib i Sunitinib en línies cel·lulars de carcinoma d'endometri.

Resultats

Aquesta tesi és una tesi per articles, composta per 4 articles. Els resultats són:

- 1. Expression of Somatostatin receptors in human melanoma cell lines: effect of two different somatostatin analogues, Octreotide and SOM230 on cell proliferation.**
- 2. Effect of proteasome inhibitors on proliferation and apoptosis of human cutaneous melanoma-derived cell lines.**
- 3. Inhibition of activated receptor tyrosine kinases by Sunitinib induces growth arrest and sensitizes melanoma cells to Bortezomib by blocking Akt pathway.**
- 4. Blockade of NF κ B activity results in an increase of cell death in Bortezomib-treated endometrial carcinoma cells.**

ARTICLE 1.

1. Expression of somatostatin receptors in human melanoma cell lines: effect of two different somatostatin analogues, Octreotide and SOM230 on cell proliferation.

1. Expressió de receptors de la somatostatina en línies cel·lulars de melanoma: efecte de dos anàlegs de la somatostatina diferents, Octreotide i SOM230 en la proliferació cel·lular.

1.1 El tractament de les línies cel·lulars de melanoma amb cada anàleg de la somatostatina durant 1, 3 o 6 dies, inhibeix la proliferació cel·lular de forma moderada de manera concentració depenent.

1.2 El pic màxim d'inhibició de la proliferació s'assoleix al tercer dia de tractament, utilitzant la concentració més alta d'Octreotide i SOM230.

1.3 L'anàlisi d'expressió de receptors de la somatostatina per PCR en temps real demostra que les línies cel·lulars de melanoma testades expressen almenys un dels quatre receptors de la somatostatina estudiats.

1.4 Els receptors expressats en més nivell en les línies cel·lulars de melanoma són en aquest ordre: SSTR2, SSTR1, SSTR3 i SSTR5.

1.5 No existeix cap correlació estadísticament significativa entre els nivells d'expressió dels receptors analitzats i la resposta a Octreotide i SOM230 en les línies cel·lulars de melanoma.

Expression of Somatostatin Receptors in Human Melanoma Cell Lines: Effect of Two Different Somatostatin Analogues, Octreotide and SOM230, on Cell Proliferation

M MARTINEZ-ALONSO¹, N LLECHA², ME MAYORGA^{3,4}, A SOROLLA^{3,4}, X DOLCET^{2,4}, V SANMARTIN³, L ABAL³, JM CASANOVA³, M BARADAD³, A YERAMIAN^{2,4}, R EGIDO², S PUIG⁵, R VILELLA⁶, X MATIAS-GUIU² AND RM MARTI³

¹Department of Basic Medical Sciences, ²Department of Pathology and Molecular Genetics, ³Department of Dermatology and ⁴Laboratory of Research, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRB-Lleida, Lleida, Spain; ⁵Department of Dermatology and ⁶Department of Immunology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

Somatostatin analogues (SAs) are potential anticancer agents. This study was designed to investigate the expression of somatostatin receptors (SSTRs) in melanoma cells and the effect of two SAs on cell proliferation and viability. Eighteen primary and metastatic human cutaneous melanoma cell lines were treated with octreotide and SOM230. Expression of SSTR1, SSTR2, SSTR3 and SSTR5 was assessed by real-time polymerase chain reaction. Proliferation, viability and cell death were assessed using standard assays. Inhibition was

modelled by mixed-effect regression. Melanoma cells expressed one or more SSTR. Both SAs inhibited proliferation of most melanoma cell lines, but inhibition was < 50%. Neither SA affected cell viability or induced cell death. The results suggest that melanoma cell lines express SSTRs. The SAs investigated, under the conditions used in this study, did not, however, significantly inhibit melanoma growth or induce cell death. Novel SAs, combination therapy with SAs and their anti-angiogenic properties should be further investigated.

KEY WORDS: MALIGNANT MELANOMA; SOMATOSTATIN ANALOGUES; OCTREOTIDE; SOM230; CELL CULTURE; SOMATOSTATIN RECEPTORS; CELL PROLIFERATION; APOPTOSIS

Introduction

Besides inhibiting the release of growth hormone and affecting other eccrine activities, native somatostatin and synthetic somatostatin analogues (SAs) inhibit cell proliferation through cell cycle control and

induction of apoptosis.^{1,2} These actions are mediated via five specific somatostatin receptors (SSTR 1, SSTR 2, SSTR 3, SSTR 4 and SSTR 5).^{1,2} Expression of SSTRs in neoplasms has raised the possibility of employing SAs as anticancer agents.¹⁻⁶ Nevertheless, with the

exception of neuroendocrine tumours,^{4,7,8} their role as antineoplastic drugs remains unclear.^{4,9}

Disseminated malignant melanoma presents a therapeutic challenge because it is highly resistant to current forms of therapy.^{10,11} Data regarding the utility of SAs in melanoma are scarce.¹²⁻¹⁵ The aim of the present study was to assess the *in vitro* effect of two SAs with different SSTR binding profiles, octreotide and SOM230,^{1,2,16-19} on the proliferation and viability of melanoma cell lines, and to relate these results to the expression of their target receptors (SSTR 1, SSTR 2, SSTR 3 and SSTR 5) as measured by real-time polymerase chain reaction (PCR). As neither octreotide nor SOM230 bind to SSTR4, the expression of SSTR4 was not investigated.

Materials and methods

MALIGNANT MELANOMA CELL LINES AND CELL CULTURE

A total of 18 human skin malignant melanoma cell lines were obtained from four primary and 14 metastatic (12 cutaneous and subcutaneous and two visceral) tumours by one of the authors (RV).^{20,21} The cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco® Cell Culture, Barcelona, Spain) with 10% fetal calf serum (FCS; Gibco®) and 20 mM penicillin/streptomycin/glutamine (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) at 37 °C and in 5% CO₂.

The cells were trypsinized and plated in 96-well plates and incubated with octreotide or SOM230 (Novartis, Basel, Switzerland) for 1, 3 and 6 days. As 25 µg/ml octreotide was previously shown to be the best inhibitory concentration for neoplastic cells,²² octreotide was added to the cell cultures at concentrations of 10, 25 or 50 µg/ml (9.81, 24.53 or 49.05 µmol, respectively). The SOM230 was added to cell cultures at

concentrations of 0.01, 0.10 or 1.00 µmol, as suggested by Novartis. Control cells for each experiment were incubated in DMEM with 10% FCS. All treatments were performed in triplicate and repeated at least three times.

The effect of each SA on melanoma cell proliferation was measured using the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay (Sigma-Aldrich) as previously described.²⁰ The effect of each SA on cell death and viability was determined by the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity in the cells using a CytoTox 96® kit (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instruction. Cell death ratios were obtained by referring the LDH values in the medium of a SA-treated culture to the total LDH content of its corresponding control culture. The mean percentage cell death found in untreated cultures was calculated and subtracted from the final death ratios. Apoptosis was evaluated by nuclei staining with Hoescht 33258 (bis-benzimide; Sigma-Aldrich) in the M14 cell line, which was the most responsive cell line to both SAs.

REAL-TIME PCR ANALYSIS OF SSTR EXPRESSION

Total cellular RNA was extracted using TRIzol® reagent (Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) and 1 µg of total RNA was reverse transcribed (RT) into cDNA using TaqMan® Reverse Transcription Reagents (part No. N808-0234; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The RT reaction was then used as a template for a 25 µl reaction for real-time PCR detection of human somatostatin receptors using TaqMan® Technology on a ABI Prism® 7000 sequence detection system (both from Applied Biosystems). Applied Biosystems' Assays-on-Demand™ primers and TaqMan® MGB probes (FAM™ dye-labelled reporter and no

fluorescent quencher) for all four target genes and pre-developed glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (VIC® dye-labelled probe) were used.

Quantification of gene expression was performed in separate tubes (Singleplex) for both the target genes and the endogenous control gene using the commercially-available primer and probe sequences for human somatostatin receptors SSTR1, SSTR2, SSTR3 and SSTR5 and GAPDH (Applied Biosystems; assay identification numbers HS 00174949m1, HS 00265617s1, HS 00265624s1, HS 00265639s1 and HS 99999905m1, respectively). The thermal cycling conditions were uracil-*N*-glycosylase activation for 2 min at 50 °C and AmpliTaq® DNA polymerase activation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing/extension at 60 °C for 1 min.

Duplicate control values from two independent RNA extractions were analysed with Quantitative Relative Software (Applied Biosystems) using the comparative CT ($\Delta\Delta Ct$) method as described by the manufacturer.²³ The amount of target ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was obtained by normalizing to an endogenous reference gene (*GAPDH*) and relative to a calibrator melanoma cell line, M20, to give the relative quantity (RQ) value. The M20 melanoma cell line was selected as the calibrator because it had SSTR expression levels closest to the median SSTR expression levels.

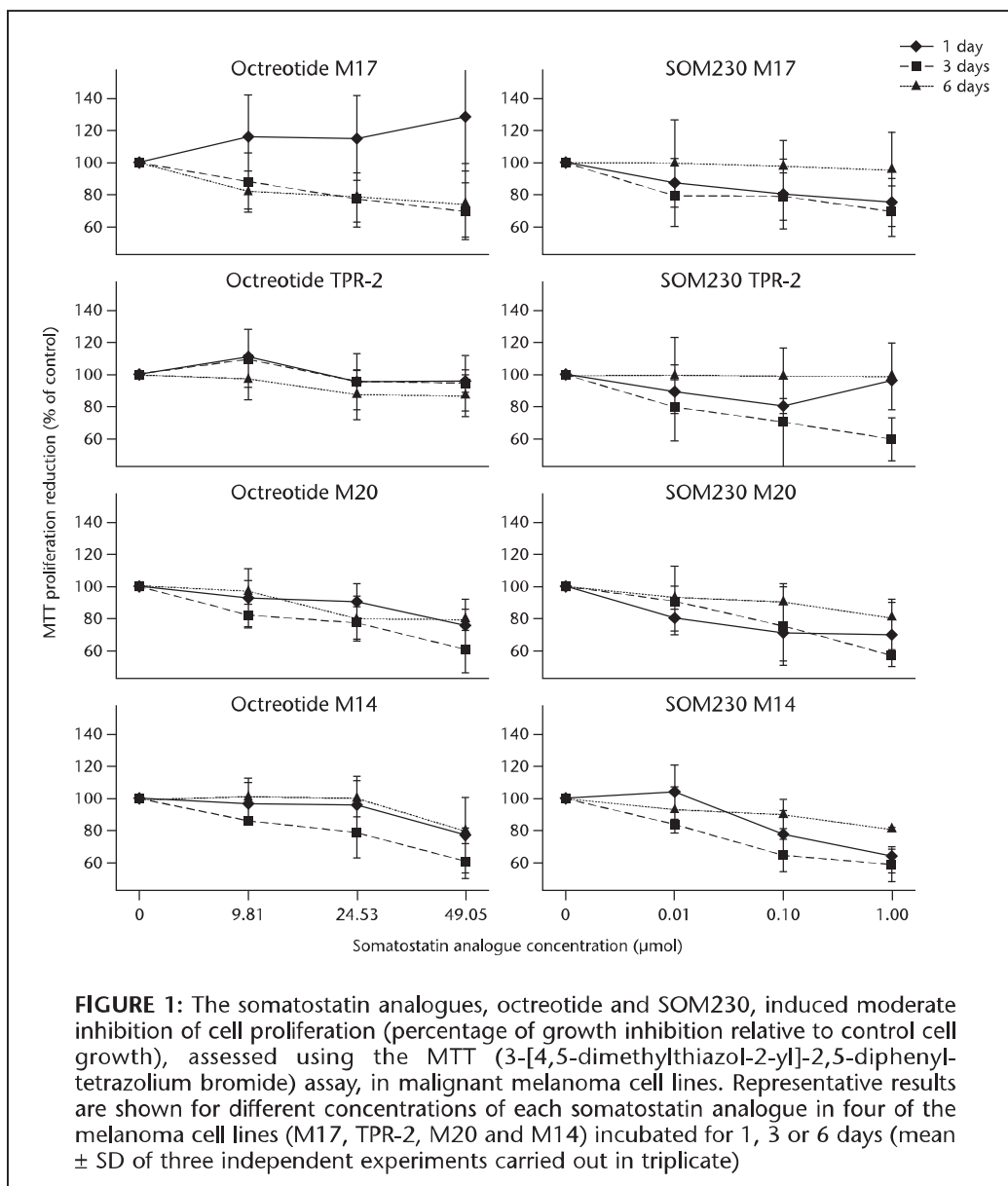
STATISTICAL ANALYSIS

The statistical analysis included computation of the Pearson correlation coefficient, the Wilcoxon's rank sum test, and mixed-effect model estimations. The latter were fitted to the data to take into account the variability explained by repeated experiments in each cell line

(random effect). Thus, initially, the observed inhibition induced by each treatment was modelled separately, depending on time (in days, included as a polynomial function), concentration (included as a factor), and their interaction. Then, SSTR specific gene expressions were included once dichotomized by median value. A constant effect was assumed for the SSTR values, independent of time and concentration. Concentration and SSTR dummy effects were estimated as referred to the lowest category, and the likelihood ratio test was used to measure the SSTR expression contribution to the multivariate model. A *P*-value < 0.05 was considered to be statistically significant. Analysis was performed with 'R', the language and environment for statistical computing developed by the R Development Core Team (created by Ross Ihaka and Robert Gentleman, University of Auckland, New Zealand).

Results

Treatment of melanoma cell lines with each SA for 1, 3 or 6 days inhibited cell proliferation in a concentration-dependent manner (Fig. 1). The highest inhibitory response was observed at day 3 and with the highest concentration of both treatments, with a mean inhibition of control proliferation of 21.54% with octreotide and 26.92% with SOM230 (Table 1). The highest mean inhibition of proliferation in a melanoma cell line was 39.2% (observed in M14 and M20) with octreotide 49.05 µmol treatment for 3 days and 49.2% (observed in M38) with SOM230 1.00 µmol for 3 days (Fig. 2). Mean inhibitory responses to octreotide and SOM230 were not statistically different according to Wilcoxon's rank sum test with continuity correction. As detected by the LDH cytotoxicity assay, neither SOM230 nor octreotide modified cell



viability or were toxic (data not shown). Additionally, incubation of one of the most SA responsive melanoma cell lines (M14) with the highest concentration of each SA for 3 days did not induce an apoptotic morphology (Hoechst 33258 staining, data not shown).

Analysis of the expression of SSTRs by

real-time PCR demonstrated that all melanoma cell lines tested expressed at least one of the four SSTRs studied (Fig. 3). The SSTR expressed at the highest levels in the majority of cell lines tested was SSTR 2, followed by SSTR 1, SSTR 3 and SSTR 5. Some cell lines showed higher expression of other SSTRs; in particular, five cell lines expressed

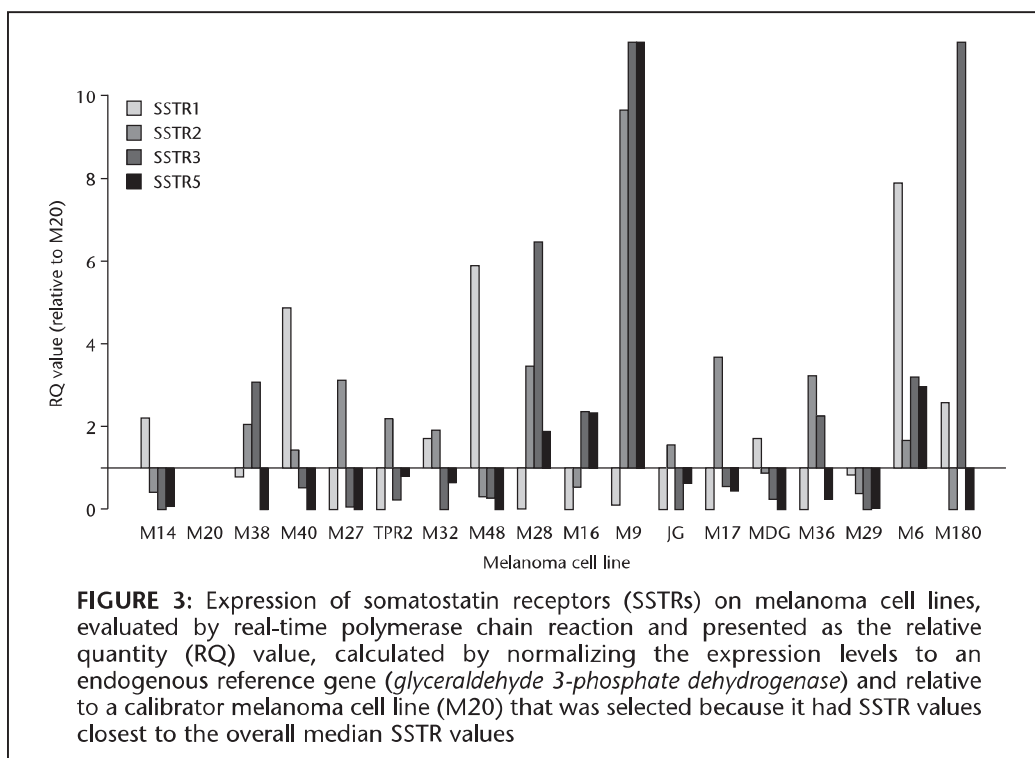
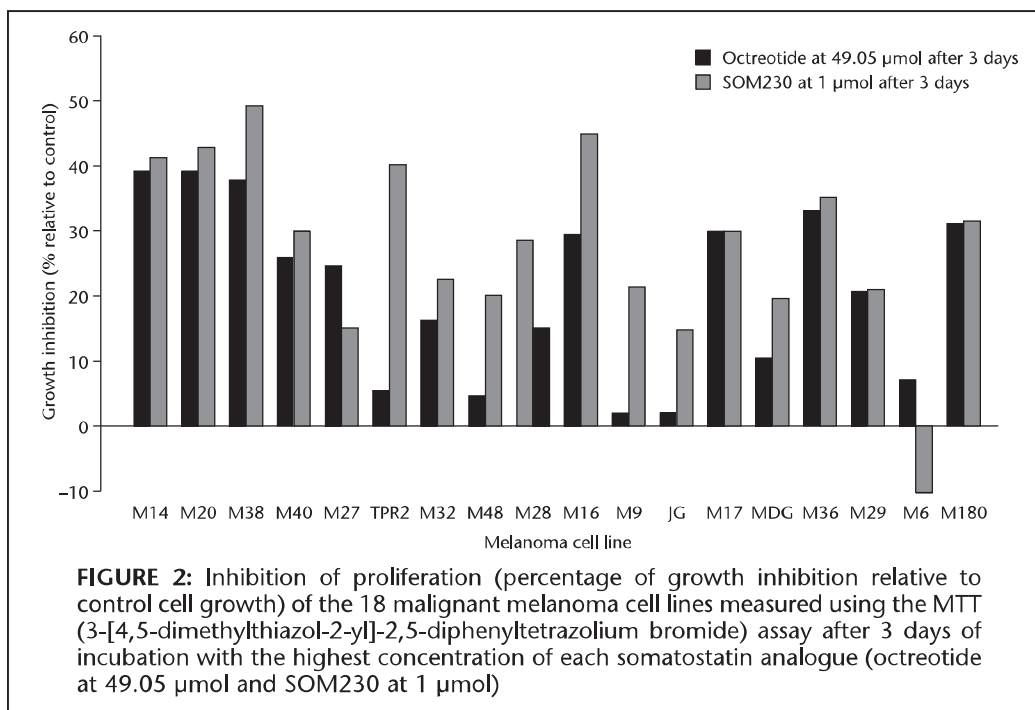
TABLE 1:
 Observed and estimated mean percentage of inhibition of proliferation induced by treatment of malignant melanoma cell lines with the somatostatin analogues, octreotide and SOM230

Duration of treatment, drug dose	Octreotide												SOM230	
	Unadjusted by SSTR		Adjusted by SSTR1		Adjusted by SSTR2		Adjusted by SSTR3		Adjusted by SSTR3		Unadjusted by SSTR			
	Observed (%)	Estimated (%)	Low ^a (%)	High ^a (%)	Low ^a (%)	High ^a (%)	Low ^a (%)	High ^a (%)	Low ^a (%)	High ^a (%)	Observed (%)	Estimated (%)		
Day 1, CI	0.53	0.14	4.72	-4.44	2.15	-1.87	-1.46	1.74	3.96	5.07	3.96	5.07		
Day 1, CII	2.53	1.91	1.91	-7.24	1.91	-2.12	1.91	5.11	10.21	3.95	10.21	3.95		
Day 1, CIII	5.49	6.22	6.22	-2.93	6.22	2.20	6.22	9.43	15.18	10.18	15.18	10.18		
Day 3, CI	10.92	13.77	15.14	12.39	12.65	14.88	9.58	17.95	10.62	13.44	10.62	13.44		
Day 3, CII	16.97	15.53	12.33	9.58	12.40	14.64	12.95	21.32	16.93	12.32	16.93	12.32		
Day 3, CIII	21.54	19.85	16.65	13.90	16.72	18.96	17.27	25.63	26.92	18.55	26.92	18.55		
Day 6, CI	-0.20	-2.66	-6.08	0.77	-8.47	3.16	0.74	-6.05	-1.04	-4.97	-1.04	-4.97		
Day 6, CII	-2.52	-0.89	-8.89	-2.04	-8.71	2.91	4.11	-2.68	-1.74	-6.09	-1.74	-6.09		
Day 6, CIII	2.89	3.43	-4.58	2.28	-4.40	7.23	8.43	1.63	2.00	0.14	2.00	0.14		

^aEstimated values for the percentage of inhibition induced by octreotide depending on the corresponding somatostatin receptor (SSTR) expression level (low versus high).

CI, concentration 1 (octreotide 9.81 µmol or SOM230 0.01 µmol); CII, concentration 2 (octreotide 24.53 µmol or SOM230 0.10 µmol); CIII, concentration 3 (octreotide 49.05 µmol or SOM230 1.00 µmol); SSTR, somatostatin receptor.

M Martinez-Alonso, N Llecha, ME Mayorga *et al.*
Anti-proliferative effects of somatostatin analogues



SSTR 3 with RQ values ≥ 3 relative to the M20 calibrator median level (with RQ up to 68.64 for M9 and 90.13 for M180). Only M6 expressed all four SSTRs above the median expression level. The M9 cell line showed the highest levels of expression for all SSTRs except for SSTR1. Levels of expression of all SSTRs were positively correlated with each other, except for SSTR 1 which showed small but statistically significant negative correlations with SSTR 2 ($r = -0.35$) and SSTR 5 ($r = -0.15$), and no significant linear correlation with SSTR 3. The highest positive correlation coefficients were shown for SSTR 2 versus SSTR 5 ($r = 0.85$) and SSTR 3 versus SSTR 5 ($r = 0.56$).

The modelling included the melanoma cell line as a random effect and time, concentration and expression of SSTRs as fixed effects. Table 1 shows the estimated values derived from five different models. The first and last columns in Table 1 show the models where the overall estimation of inhibition for each treatment did not take into account the expression of SSTRs (i.e. unadjusted by SSTR). The other three columns give the results from the models that show a significant SSTR expression contribution in explaining the response to octreotide (no significant contribution was found for SOM230). Thus, there was a statistically significant contribution from SSTR1, SSTR2 and SSTR3 on the response to octreotide, depending on time. The melanoma cell line random effect had a high impact on the response to SOM230 treatment, where variability within melanoma cell lines represented 18% of the total variability compared with 9% obtained with octreotide.

According to the unadjusted models, the maximum mean inhibition was predicted for day 3 with the maximum concentration of both treatments, with a predicted mean

inhibition of 19.85% and 18.55% for octreotide and SOM230, respectively (Table 1). Taking into account the influence of the expression of SSTRs in the cell lines' responses to octreotide, the results showed that, with the highest octreotide concentration and after 3 days of treatment, high expression levels of SSTR1 were associated with a lower predicted mean inhibition (13.90%) than the overall fitted mean of 19.85%. In contrast, with the same time and concentration conditions, high expression of SSTR3 was associated with the highest predicted mean inhibition (25.63%). In reference to the expression of SSTR2, the biggest differences were seen not on day 3 (when fitted inhibition with the highest concentration of octreotide was similar to the overall response) but on day 6, where the melanoma cell lines with low expression of SSTR2 showed no inhibition compared with the melanoma cell lines with high expression of SSTR2. Inhibition data in cell lines were well fitted by the different models except for the inhibition effect of octreotide in M16 and the inhibition effect of SOM230 in M48.

Discussion

The results from the present study are in agreement with previous studies showing that SSTR2 is the most abundantly expressed SSTR in the majority of tumour types¹⁷ and in cutaneous and uveal melanoma.^{12,13,17,24} Melanoma expression of SSTRs has been shown to be variable in different studies, probably due to the diversity of materials and methods employed (tissue, cell lines, RT-PCR, Western blot, immunohistochemistry).^{12,13,17,24} The present study was the first to evaluate SSTR expression quantitatively by real-time PCR in a large number of melanoma cell lines.

Both of the SAs used in the present study

inhibited melanoma cell proliferation in a concentration-dependent manner. This inhibition did not, however, exceed 50% of the control proliferation under any conditions (Table 1, Fig. 2). SOM230 inhibited control proliferation more than octreotide, although there were no statistically significant differences between the two SAs. It is worth mentioning, however, that the employed concentration of octreotide was 50 – 1000-fold higher than that of SOM230. To date, the authors have not been able to identify any published experiments that could be compared with the present study, as previous studies have used different SAs (vapreotide, lanreotide, TT232 and RC121), different octreotide concentrations or different assay conditions.^{12 – 15,24,25} Although it has been argued that SOM230, acting through SSTR1 and SSTR3, could be useful in SSTR-positive malignancies,¹ no published reports on SOM230 and melanoma have been identified. The highest mean inhibition of proliferation in the present study occurred on day 3 in response to the highest concentration of each SA, but inhibition was generally decreased on day 6 compared with day 3, with time apparently having a quadratic rather than linear effect (Fig. 1). The inhibitory effect of each SA appeared to reach a peak at 1 – 3 days, as described previously for colon cancer cells.²²

Attempts to analyse the correlation between SSTR expression and the response of melanoma cells to the SAs used were difficult. In total, 18 malignant melanoma cell lines, four SSTRs with potentially different effects on cell cycle and apoptosis, and two SAs with different binding profiles were used in the present study, all of which could have led to a range of abnormal responses to SSTR stimulation. Both of the SAs used in the present study are known to

bind with high affinity to SSTR2 and SSTR5.^{1,2,16–19} Octreotide binds moderately to SSTR3 and hardly at all to SSTR1, whereas SOM230 shows high affinity to SSTR3 and very high affinity to SSTR1.^{1,2,1–19} Given so many sources of variability, it seems reasonable that the present study did not show any clear statistical relationship between the expression levels of the SSTRs studied and the response to SOM230 or to octreotide.

Although the inhibitory effect of each SA on melanoma cell proliferation was only modest (< 50% of the control proliferation), a statistical model for the inhibition response to SA by concentration, time and expression of SSTRs was designed that fitted the behaviour of almost all cell lines with the exception of one cell line for each SA. A long list of possible explanations for the abnormal behaviour of SSTR-positive neoplastic cells in response to SA treatment has been presented, reflecting abnormalities in the pathways involved in the response to SA, from down-regulation of SSTR affinity to mutations in SSTR genes.¹⁸ To the authors' knowledge, this type of study has not been done in malignant melanoma.

In summary, the present study was the first to assess quantitatively the expression of SSTRs (1, 2, 3 and 5) by real-time PCR in a range of malignant melanoma cell lines. SSTR2 was the SSTR with the highest overall level of expression. Both SAs, octreotide and SOM230, inhibited the proliferation of melanoma cells in a concentration-dependent manner. This response was consistently predicted by a statistical model. The inhibition induced by both of the SAs did not, however, exceed 50% of control cell proliferation under any conditions. Moreover, neither of the SAs was able to modify cellular viability or induce cell death. Thus, octreotide and SOM230 are probably

not potential antineoplastic drugs for metastatic melanoma, at least when used as single agents. As SSTR expression has been clearly demonstrated in malignant melanoma, here and by other authors, and as at least some of the SSTRs expressed by melanoma cells, such as SSTR2 and SSTR3, can induce apoptosis,^{26,27} the use of SAs as anticancer agents in melanoma remains a possibility. Novel SAs that are better able to induce apoptosis,^{15,28} the use of SAs in combination with chemotherapy, radioactive or other cytotoxic agents,^{2,4,25,27} and their anti-angiogenic properties^{24,29,30} should be further investigated.

- Received for publication 30 July 2009 • Accepted subject to revision 3 August 2009
- Revised accepted 10 November 2009

Copyright © 2009 Field House Publishing LLP

Acknowledgements

This study was supported by Novartis Farmacéutica SA and by the Research Group of Oncological Pathology of the IRB-Lleida. A Sorolla holds a pre-doctoral fellowship position granted by the Fundación Científica AECC, Catalunya contra el Càncer, Lleida. The authors also thank Xavier Carbonell for his contribution in the design of the study.

Conflicts of interest

This study was partially supported by Novartis Farmacéutica SA (supply of octreotide and SOM230 and 1-year financial support for laboratory technical work).

References

- 1 Lamberts SW, van der Lely AJ, Hofland LJ: New somatostatin analogs: will they fulfil old promises? *Eur J Endocrinol* 2002; **146**: 701 – 705.
- 2 Pawlikowski M, Melen-Mucha G: Perspectives of new potential therapeutic applications of somatostatin analogues. *Neuro Endocrinol Lett* 2003; **24**: 21 – 27.
- 3 Bousquet C, Puente E, Buscail L, *et al*: Antiproliferative effect of somatostatin and analogs. *Chemotherapy* 2001; **47**(suppl 2): 30 – 39.
- 4 Hejna M, Schmidinger M, Raderer M: The clinical role of somatostatin analogues as antineoplastic agents: much ado about nothing? *Ann Oncol* 2002; **13**: 653 – 668.
- 5 Pollak MN, Schally AV: Mechanisms of antineoplastic action of somatostatin analogues. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; **217**: 143 – 152.
- 6 Reubi JC, Waser B, Schaer JC, *et al*: Somatostatin receptor sst1–sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med* 2001; **28**: 836 – 846.
- 7 Batista DL, Zhang X, Gejman R, *et al*: The effects of SOM230 on cell proliferation and adrenocorticotropin secretion in human corticotroph pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**: 4482 – 4488.
- 8 Öberg K: Diagnosis and treatment of carcinoid tumours. *Expert Rev Anticancer Ther* 2003; **3**: 863 – 877.
- 9 Hofland LJ, van der Hoek J, Feelders R, *et al*: Pre-clinical and clinical experiences with novel somatostatin ligands: advantages, disadvantages and new prospects. *J Endocrinol Invest* 2005; **28**(11 suppl international): 36 – 42.
- 10 Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF: Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005; **365**: 687 – 701.
- 11 Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, *et al*: Malignant melanoma in the 21st Century, part 2: staging, prognosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 2007; **82**: 490 – 513.
- 12 Ardjomand N, Ardjomand N, Schaffler G, *et al*: Expression of somatostatin receptors in uveal melanoma cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 980 – 987.
- 13 Lum SS, Fletcher WS, O'Dorisio MS, *et al*: Distribution and functional significance of somatostatin receptors in malignant melanoma. *World J Surg* 2001; **25**: 407 – 412.
- 14 Schwab R, Froidevaux S, Paku S, *et al*: Antiproliferative efficacy of the somatostatin analogue TT-232 in human melanoma cells and tumours. *Anticancer Res* 2001; **21**: 71 – 75.
- 15 Tejada M, Gaal D, Barna K, *et al*: The antitumor activity of the somatostatin structural derivative (TT-232) on different human tumour xenografts. *Anticancer Res* 2006; **23**: 4061 – 4066.
- 16 Bruns C, Lewis I, Meno-Tetang G, *et al*: SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *Eur J Endocrinol* 2002; **146**: 707 – 716.

M Martinez-Alonso, N Llecha, ME Mayorga et al.
Anti-proliferative effects of somatostatin analogues

- 17 Hofland LJ, Lamberts SW: Somatostatin receptor subtype expression in human tumours. *Ann Oncol* 2001; **12**(suppl 2): S31 – S36.
- 18 Hofland LJ, Lamberts SWJ: The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization. *Endocr Rev* 2003; **24**: 28 – 47.
- 19 Weckbecker G, Briner U, Lewis I, et al: SOM230: a new somatostatin peptidomimetic with potent inhibitory effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in rats, primates, and dogs. *Endocrinology* 2002; **143**: 4123 – 4130.
- 20 Mayorga ME, Sanchis D, Perez de Santos A, et al: Antiproliferative effect of STI571 on cultured human cutaneous melanoma-derived cell lines. *Melanoma Res* 2006; **16**: 127 – 135.
- 21 Sorolla A, Yeramian A, Dolcet X, et al: Effect of proteasome inhibitors on proliferation and apoptosis of human cutaneous melanoma-derived cell lines. *Br J Dermatol* 2008; **158**: 496 – 504.
- 22 El-Salhy M, Starefeldt A: Direct effects of octreotide, galanin and serotonin on human colon cancer cells. *Oncol Rep* 2003; **10**: 1723 – 1728.
- 23 Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al: The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; **27**: 95 – 125.
- 24 Valencak J, Heere-Ress E, Traub-Weidinger T, et al: Somatostatin receptor scintigraphy with ¹¹¹In-DOTA-lanreotide and ¹¹¹In-DOTA-Tyr3-octreotide in patients with stage IV melanoma: *in-vitro* and *in-vivo* results. *Melanoma Res* 2005; **15**: 523 – 529.
- 25 Keller G, Schally AV, Nagy A, et al: Effective therapy of experimental human malignant melanomas with a targeted cytotoxic somatostatin analogue without induction of multi-drug resistance proteins. *Int J Oncol* 2006; **28**: 1507 – 1513.
- 26 Bousquet C, Guillermet-Guibert J, Saint-Laurent N, et al: Direct binding of p85 to sst2 somatostatin receptor reveals a novel mechanism for inhibiting PI3K pathway. *EMBO J* 2006; **25**: 3943 – 3954.
- 27 Guillermet-Guibert J, Saint-Laurent N, Davenne L, et al: Novel synergistic mechanism for sst2 somatostatin and TNF α receptors to induce apoptosis: crosstalk between NF- κ B and JNK pathways. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 197 – 208.
- 28 Szende B, Horvath A, Bökönyi G, et al: Effect of a novel somatostatin analogue combined with cytotoxic drugs on human tumour xenografts and metastasis of B16 melanoma. *Br J Cancer* 2003; **88**: 132 – 136.
- 29 Adams RL, Adams IP, Lindow SW, et al: Inhibition of endothelial proliferation by the somatostatin analogue SOM230. *Clin Endocrinol* 2004; **61**: 431 – 436.
- 30 Arena S, Pattarozzi A, Corsaro A, et al: Somatostatin receptor subtype-dependent regulation of nitric oxide release: involvement of different intracellular pathways. *Mol Endocrinol* 2005; **19**: 255 – 267.

Author's address for correspondence

Dr Rosa M Marti

Department of Dermatology, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida,
IRB-Lleida, Avda. Alcalde Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain.

E-mail: marti@medicina.udl.cat

ARTICLE 2.

2. Effect of proteasome inhibitors on proliferation and apoptosis of human cutaneous melanoma-derived cell lines.

2. Efecte dels inhibidors del proteasoma en la proliferació i l'apoptosi de línies cel·lulars humanes d'origen cutani.

2.1 Els inhibidors del proteasoma indueixen una reducció en la viabilitat en nombroses línies cel·lulars de melanoma.

2.2 Els inhibidors del proteasoma indueixen una parada en el cicle cel·lular i una reducció en la proliferació.

2.3 Els inhibidors del proteasoma desencadenen apoptosi.

2.4 Els inhibidors del proteasoma indueixen mort cel·lular, tant dependent com independent de caspases.

2.5 Els inhibidors del proteasoma indueixen un alliberament d'AIF des del mitocondri en absència d'activació de caspases

Effect of proteasome inhibitors on proliferation and apoptosis of human cutaneous melanoma-derived cell lines

A. Sorolla,*† A. Yeramian,†‡ X. Dolcet,†‡ A.M. Pérez de Santos,*† D. Llobet,†‡ J.A. Schoenenberger,§ J.M. Casanova,* X. Soria,* R. Egado,‡ A. Llombart,¶ R. Vilella,** X. Matias-Guiu‡ and R.M. Martí*

*Department of Dermatology, †Laboratory of Research, ‡Department of Pathology and Molecular Genetics, §Department of Pharmacy and ¶Department of Oncology, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Universitat de Lleida, 25198 Lleida, Spain

**Department of Immunology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

Summary

Correspondence

Rosa M. Martí.
E-mail: marti@medicina.udl.cat

Accepted for publication

10 October 2007

Key words

apoptosis, cancer, cell proliferation, melanoma, proteasome inhibitors

Conflicts of interest

None declared.

The authors' Institutional Review Board has approved all human studies. All clinical investigation was conducted according to Declaration of Helsinki principles. When appropriate, informed consent was obtained.

Background Cutaneous malignant melanoma is an aggressive type of skin cancer which causes disproportionate mortality in young and middle-aged adults. Once disseminated, melanoma can be considered an incurable disease, highly resistant to standard antineoplastic treatment, such as chemotherapy or radiation therapy. The proteasome represents a novel target for cancer therapy that can potentially be used in melanoma.

Objectives To assess the effect of four structurally different proteasome inhibitors on human cutaneous melanoma-derived cell lines.

Methods Sixteen human cutaneous melanoma-derived cell lines which are original were obtained from patients who were treated by two of the authors. Cells were cultured, exposed to proteasome inhibitors (bortezomib, ALLN, MG-132 and epoxomicin) and then assayed for cell cycle and cell death analyses.

Results Proteasome inhibitors inhibited the *in vitro* growth of melanoma cells, and this effect was due to a reduction in cell proliferation rate and an induction of both caspase-dependent and caspase-independent cell death. Moreover, release of apoptosis-inducing factor was observed in the presence of the broad-specificity caspase inhibitor BAF (Boc-D-fmk). In addition, the four different proteasome inhibitors induced caspase 2 processing.

Conclusions This study provides information regarding the *in vitro* effects of proteasome inhibitors on melanoma cell lines, and the molecular mechanisms involved. It also gives support to the future use of such inhibitors in the treatment of patients with melanoma, either administered alone or in combination with other drugs.

Cutaneous malignant melanoma is the most aggressive form of skin cancer. It is resistant to conventional chemotherapy and radiotherapy, making early diagnosis and surgical treatment the only successful tools available to control it. Once in an advanced stage, the prognosis of patients with melanoma becomes very poor (median survival 6–8 months). Systemic therapy, immunotherapy or even biochemotherapy have failed to improve the survival of these patients, implying the complexity and diversity of factors that control the progression of the disease.¹ Alteration of survival capacity and inactivation of the apoptotic pathways are the molecular mechanisms responsible for conventional drug resistance in patients with melanoma. Activation of Ras signalling with increased levels of Bcl-2,² constitutive activation of either Akt/protein kinase B or NF- κ B³ and impaired p53 transcriptional activities⁴ are some examples of the altered mechanisms in melanoma cells which

contribute to apoptosis resistance. In this context the proteasome, a multicatalytic proteinase complex that controls the half-life of the majority of cellular proteins,⁵ represents an attractive therapeutic target in cancer.

Various classes of proteasome inhibitors are currently available. Peptide aldehydes (MG-132, ALLN) are the first class of compounds shown to inhibit the proteasome.⁶ They are reversible serine and cysteine proteases that bind to the N-terminal active site threonine of proteolytically active proteasome subunits. Peptide epoxyketone or epoxomicin is another compound that has been shown selectively and irreversibly to inhibit the proteasome.⁷ Finally, bortezomib (Velcade[®], also previously known as PS-341; Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA, U.S.A.) is a cell-permeable dipeptidyl boronic acid that reversibly inhibits the chemotrypsin-like activity of the proteasome. Bortezomib binds the proteasome with very

high affinity and dissociates slowly, inducing stable but reversible proteasome inhibition.⁸ Bortezomib has shown its efficacy in preclinical studies in various types of cancers.⁹ It is the first proteasome inhibitor to have undergone clinical testing in patients where it has demonstrated its activity, particularly in multiple myeloma and non-Hodgkin lymphoma.

In this report, 16 human cutaneous melanoma-derived cell lines were treated with the four structurally different proteasome inhibitors cited above (bortezomib or PS-341, ALLN, MG-132 and epoxomicin), and the effects of these inhibitors on cell proliferation and on the apoptotic machinery were investigated. Our results indicate that proteasome inhibition induces cell cycle arrest, and triggers both caspase-independent and caspase-dependent cell death. In addition, we identify apoptosis-inducing factor (AIF) as a potential executor of the caspase-independent cell death.

Although the effect of proteasome inhibitors on melanoma cell lines has been demonstrated previously in other studies, the present article shows the effect of these substances in a significantly higher number of melanoma cell lines, which are original and were obtained from patients who were treated by two members of the clinical team (R.M.M., R.V.) involved in this study. Moreover, this is the only study evaluating a wide spectrum of proteasome inhibitors that includes some that are exclusively used in experimental studies (ALLN, MG-132, epoxomicin) and the only proteasome inhibitor that is used in clinical practice (bortezomib). Finally, the present study is the first one that provides conclusive evidence that proteasome inhibitors produce melanoma cell death by caspase-dependent and caspase-independent mechanisms, AIF related. It also demonstrates the involvement of caspase 2 processing in proteasome inhibitors-induced cell death.

Materials and methods

Cell cultures and treatment procedures

Sixteen human malignant melanoma cell lines of cutaneous origin (Table 1) were obtained by one of the authors (R.V.) in the Department of Immunology of the Hospital Clinic of Barcelona (Spain). Some of these cell lines (M3, M9, M16,

M17, M28, M36) were already employed in human immunization protocols.^{10,11} Among these cell lines, four were derived from primary tumours (Breslow thickness 0.9–12 mm) while the other 12 originated from metastasis of malignant melanomas (See Table 1 for the origin of the cells). The melanocytic lineage of the cell lines was previously confirmed by immunodetection of the specific melanoma cell markers S100 and HMB-45.¹² Cells were classified as low, medium or high proliferating (Table 1), depending on the time needed to double cell population. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, U.S.A.) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco, Barcelona, Spain), 20 mmol L⁻¹ L-glutamine and antibiotics at 37 °C and 5% CO₂. The proteasome inhibitors bortezomib, MG-132, ALLN and epoxomicin were dissolved in water at final concentrations of 10, 10, 50 and 1 mmol L⁻¹, respectively, and added to the complete media to the appropriate final concentrations. All treatments were carried out in complete media, performed in triplicate, and repeated at least three times.

Chemical reagents and antibodies

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), RNase A and antibodies against tubulin and AIF were from Sigma. The proteasome inhibitors MG-132, ALLN, epoxomicin and anticaspase 8 antibody were obtained from Calbiochem (La Jolla, CA, U.S.A.). Antibodies against caspase 9 and cleaved caspase 3 were purchased from Cell Signaling (Beverly, MA, U.S.A.). Anticaspase 2 and anticytochrome c were from BD Pharmingen (San Diego, CA, U.S.A.). Antibody against lactate dehydrogenase (LDH) used as a specific marker of cytosolic fraction was obtained from Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA, U.S.A.), while antibody against prohibitin used as a marker for mitochondrial membrane contamination was purchased from Neomarkers (Fremont, CA, U.S.A.). Bortezomib was manufactured by Millennium Pharmaceuticals and was obtained from the Department of Pharmacy, Hospital Arnau de Vilanova (Lleida, Spain). The broad-specificity caspase inhibitor BAF (Boc-D-fmk) was purchased from Calbiochem. Peroxidase-conjugated antimouse and antirabbit antibodies were from Amersham Biosciences (Amersham, U.K.).

Cell viability assays and assessment of apoptosis

Cell viability was measured using an MTT assay which assesses the ability of metabolically active cells to reduce MTT. Melanoma cell lines were plated on M96 well plates at 5×10^3 cells per well. After the corresponding treatments, cells were incubated for 45 min with 0.5 mg mL⁻¹ of MTT reagent and lysed with dimethylsulphoxide. Absorbance was measured at 595 nm in a microplate reader (Bio-Rad, Richmond, CA, U.S.A.). Apoptotic cells were identified by nuclear staining with bis-benzimide fluorescent dye (Hoechst 33258) that was added to the culture medium at a final concentration of 5 µg mL⁻¹.

Table 1 Classification of the melanoma-derived cell lines according to their origin and their proliferation rate

Cell lines	Origin
LPR: M48, MDG, M6 HPR: M9	Primary tumours
LPR: M180, M29 MPR: M32, M14, M17, M16 HPR: TPR2, JG, M28	Metastasis (skin)
LPR: M38 (bone) HPR: M36 (CSF), M3 (pleural effusion)	Other metastasis

LPR, low proliferation rate; MPR, medium proliferation rate; HPR, high proliferation rate; CSF, cerebrospinal fluid.

5-Bromodeoxyuridine incorporation

For the determination of DNA, cells were incubated with $6 \mu\text{mol L}^{-1}$ of 5-bromodeoxyuridine (BrdU) (Sigma) for 2 h and then fixed with 4% paraformaldehyde. After DNA denaturing with 2 mol L^{-1} HCl for 30 min and neutralization with 0.1 mol L^{-1} $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH 8.5) for 2 min, cells were blocked in phosphate-buffered saline (PBS) solution containing 5% horse serum, 5% fetal bovine serum, 0.2% glycine and 0.1% Triton X-100 for 1 h. Subsequently, cells were subjected to indirect immunofluorescence with a mouse anti-BrdU monoclonal antibody (Dako, Glostrup, Denmark), and fluorescein isothiocyanate-conjugated antimouse secondary antibody (Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.). Nuclei were counterstained with $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Hoechst 33258 and cells were visualized under an epifluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Western blot analysis and immunofluorescence detection

At the end of the corresponding treatments, melanoma cell lines were washed twice with cold PBS. The corresponding total cell lysates were obtained by adding lysis buffer [2% sodium dodecyl sulphate (SDS), 125 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 6.8]. Protein extracts were denatured by heat shock at 95°C for 3 min and quantified by the Lowry assay (Bio-Rad). Equal amounts of proteins were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.). Non-specific binding was blocked by incubation with TBST (20 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol L^{-1} NaCl, 0.1% Tween-20) plus 5% nonfat milk. Immunodetection was performed using the appropriate primary antibodies. Immunoblots were developed with an appropriate secondary peroxidase-conjugated antibody and the bound antibody was visualized using the chemiluminescent substrate ECL Advance (Amersham-Pharmacia, Amersham, U.K.). For immunofluorescence detection, cells were cultured in four-well plates (Nunc-Clon; Nunc, Roskilde, Denmark) and fixed by incubation with methanol 100% for 3 min. Cells were rinsed, permeabilized, and stained as described previously.¹³

Subcellular fractionation

Cytosolic and mitochondrial fractions were obtained by means of the serial centrifugation protocol described by Gross *et al.*¹⁴ with some modifications. Briefly, cells were seeded on 60-mm plates at 1.5×10^6 cells per plate and treated with proteasome inhibitors for the indicated times. Then, cells were washed twice in ice-cold PBS, resuspended in 5 volumes of extraction buffer containing 220 mmol L^{-1} mannitol (Sigma), 100 mmol L^{-1} sucrose, 50 mmol L^{-1} HEPES-KOH (pH 7.2), 10 mmol L^{-1} KCl, 5 mmol L^{-1} EGTA, 2 mmol L^{-1} MgCl_2 , 1 mmol L^{-1} dithiothreitol, 1 mmol L^{-1} phenylmethylsulphonyl fluoride and kept on ice for 20 min. Cells were spun at 750 g for 10 min at 4°C to sort out nuclei and unbroken

cells. This supernatant was further centrifuged at $10\,000 \text{ g}$ for 20 min at 4°C to separate the fraction enriched with mitochondria (pellet) from the supernatant containing the cytosol. Proteins were quantified, separated by SDS-PAGE (15% gel for cytochrome *c* detection, 7% gel for AIF detection) and subjected to Western blot as described above. Purity of cytosolic extracts was checked with LDH antibody, as a specific marker of cytosolic fraction, and prohibitin as a marker for mitochondrial membrane contamination.

Cell cycle analysis

Analysis of cell cycle distribution was determined by propidium iodide (PI) staining and flow cytometry. Following treatment, approximately 1×10^6 cells were fixed in 70% ethanol for at least 1 h on ice. The cells were then resuspended in 2 mL of cell cycle buffer ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$ PI, in PBS containing 0.1% Triton X-100 and $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ RNase A) for 1 h at 37°C . PI fluorescence emission was measured using a FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, U.S.A.), and cell cycle distribution was analysed with WinMDI 2.9 software (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, U.S.A.).

Results

Proteasome inhibitors induce a decrease in cell viability in a panel of melanoma cell lines

To determine the effect of proteasome inhibition on melanoma cell viability, 16 human melanoma cell lines were exposed to increasing concentrations of bortezomib for 48 h at 37°C , and MTT reduction was quantified. MTT assay measures the ability of a mitochondrial dehydrogenase enzyme from viable cells to reduce tetrazolium salt (MTT). Bortezomib (PS-341) reduced cell survival in a dose-dependent manner in the majority of cell lines analysed (data not shown). The IC_{50} of bortezomib at 48 h in three representative cell lines JG, M28 and M9 ranged from 20 to 26 nmol L^{-1} (Fig. 1a). To check whether the reduction in cell viability was not due to a nonspecific effect of bortezomib, we treated the cell lines cited above with three structurally different proteasome inhibitors (MG-132, ALLN and epoxomicin). These inhibitors induced similar decreases in MTT reading with mean values of their IC_{50} in the analysed cell lines ranging from 187 to 250 nmol L^{-1} , 2.5 to $3.75 \mu\text{mol L}^{-1}$ and 3.75 to 15 nmol L^{-1} for MG-132, ALLN and epoxomicin, respectively (Fig. 1a). However, within the range of time studied, some cell lines were resistant to proteasome inhibitors-induced decrease of cell viability (M29, M180). To ascertain whether this resistance could be overcome by longer exposures to proteasome inhibitors, M29 cell line was treated for 8 days with bortezomib, MG-132, ALLN or epoxomicin. As shown in Figure 1b, epoxomicin induced a severe decrease in cell viability at day 8 of treatment, whereas M29 cells treated with the reversible proteasome inhibitors bortezomib, MG-132 or ALLN showed a very low inhibition of cell viability at 8 days. Nevertheless,

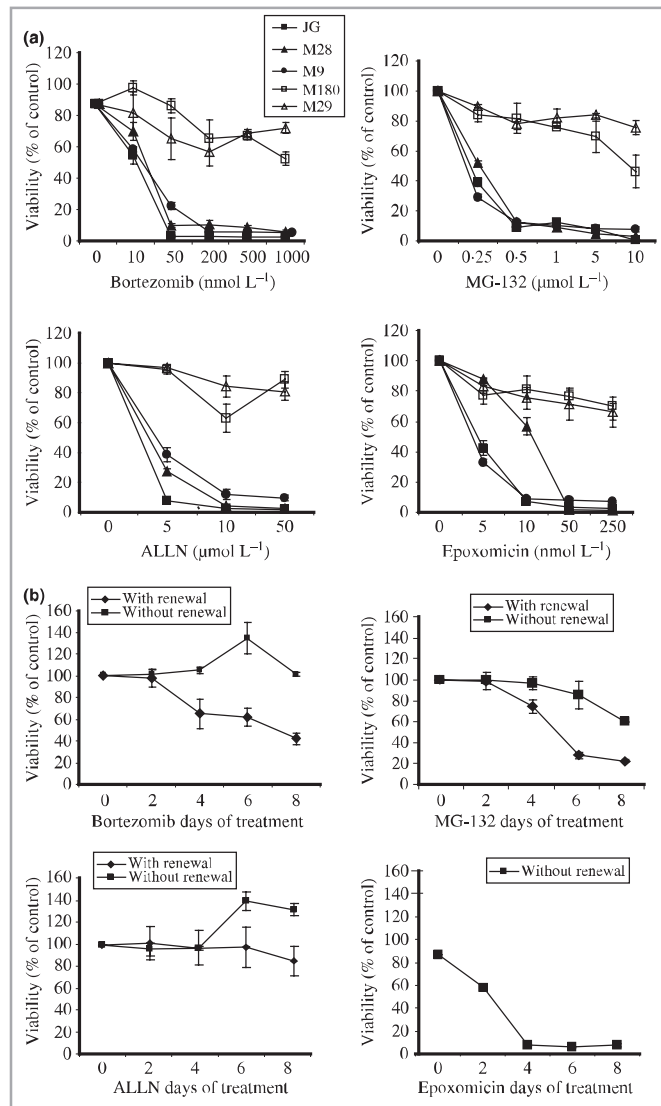


Fig 1. Proteasome inhibitors induce a decrease in cell viability in a panel of melanoma cell lines. (a) Melanoma cells from either primary or metastatic tumours were treated with increasing doses of bortezomib, MG-132, ALLN or epoxomicin for 48 h and cell viability was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. See Table 1 for the cells' origin (primary or metastatic). (b) M29 cells were treated for 8 days with 25 nmol L⁻¹ of bortezomib, 0.5 μmol L⁻¹ of MG-132, 10 μmol L⁻¹ of ALLN or 10 nmol L⁻¹ of epoxomicin. Proteasome inhibitor was either renewed in media every 2 days (reversible proteasome inhibitor, i.e. bortezomib, MG-132 and ALLN), or not. Results are expressed as mean ± SD percentage of the control values.

when bortezomib or MG-132 was renewed in fresh medium every 2 days, viability of M29 cells was severely compromised (Fig. 1b). ALLN, even when renewed in fresh medium, showed a weak inhibitory effect on cell viability consistent with the compound's weak inhibition of the proteasome. These data suggest that proteasome inhibitors cause significant reduction of MTT values on melanoma cells; this effect could be due to a reduction in cell proliferation rate, an induction of cell death either apoptotic or not, or, more probably, all these factors together.

Proteasome inhibitors induce cell cycle arrest and a reduction in proliferation rate

To examine the effect of proteasome inhibitors on melanoma cell proliferation, BrdU incorporation assays were performed in three representative cell lines (M28, JG and M29). M28 and JG cell lines treated with bortezomib for 24 h presented a clear decrease in BrdU incorporation compared with untreated cells (Fig. 2a). In contrast, the low proliferating cells M29 needed a longer time exposure to bortezomib, with drug

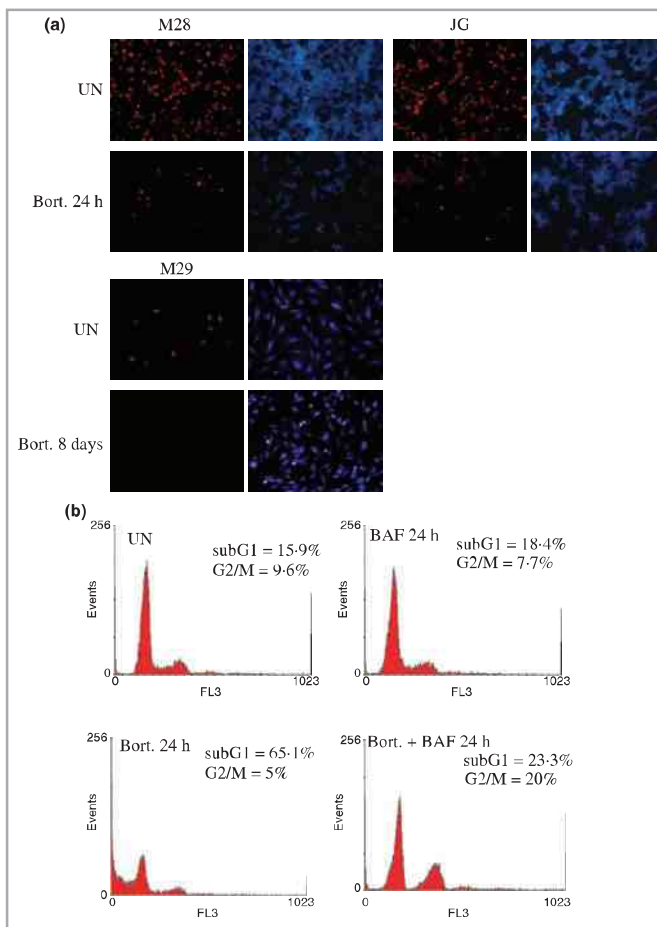


Fig 2. Proteasome inhibitors stop cell cycle and decrease cell proliferation of melanoma cells. (a) M28 and JG cells were incubated with 25 nmol L^{-1} of bortezomib for 24 h or alternatively for 8 days (M29 cells) with inhibitor renewal every 2 days. Pictures show 5-bromodeoxyuridine incorporation and Hoechst 33258 staining. (b) Flow cytometry analysis and cell cycle distribution. M28 cells were pretreated with phosphate-buffered saline or the pancaspase inhibitor BAF (Boc-D-fmk) ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), and then exposed to bortezomib (25 nmol L^{-1}) for 24 h, after which DNA content was determined by propidium iodide staining.

renewal every 2 days, in order to be able to visualize inhibition of cell proliferation (Fig. 2a). Further to confirm the cell-cycle arrest, DNA content was analysed in M28 cells after PI staining (Fig. 2b). We found that bortezomib induces a decrease of cells at the S phase and increases the sub-G₁ peak, hallmark of apoptotic cell death. Cotreatment with bortezomib + BAF, a broad-specificity caspase inhibitor, induced an arrest of cells at the G₂-M phases of the cycle (Fig. 2b). These data suggest that the proteasome inhibitor bortezomib induces both cell cycle arrest at the G₂-M phases, and apoptosis.

Proteasome inhibitors trigger apoptosis

Previous studies have shown that proteasome inhibition induces apoptosis in melanoma cell lines.^{5,15} In order to explore the effect of proteasome inhibitors on cell death and apoptosis in our cells, two representative melanoma cell lines

(M28, JG) were treated with bortezomib (25 nmol L^{-1}) or MG-132 ($0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$) for 48 h, and apoptotic cell death was determined by Hoechst 33258 staining. As expected, the treatment with either bortezomib or MG-132 increased the number of nuclei displaying apoptotic features (Fig. 3a), which correlated with a decrease in cell viability as assessed by MTT (Fig. 1). Moreover, cell cycle analysis by flow cytometry showed that the sub-G₁ peak, hallmark of apoptotic cell death, was significantly increased in bortezomib-treated M28 and JG cells (Figs 2b, 3a).

Next, caspase processing was assessed by Western blot, in M28 and JG cell lines treated with the four structurally different proteasome inhibitors. Interestingly, the four proteasome inhibitors trigger initiator (caspase 2, caspase 9 and caspase 8) and effector (caspase 3) caspase activation (Fig. 3b). Processing of caspase 9 and caspase 8 suggests the participation of both intrinsic or mitochondrial-based and extrinsic pathways,

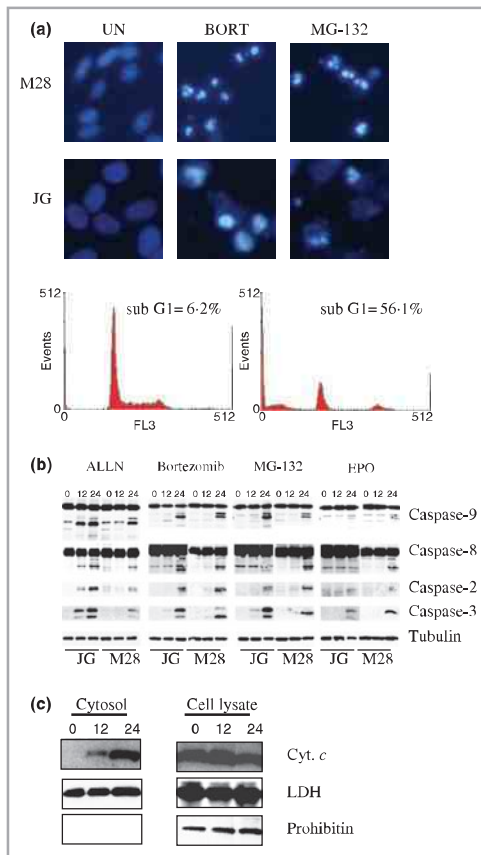


Fig 3. Proteasome inhibitors trigger apoptosis by caspase processing in melanoma cells. (a) M28 and JG cells were incubated with 25 nmol L⁻¹ of bortezomib for 48 h and Hoechst 33258-stained apoptotic nuclei were visualized. Alternatively, cell cycle distribution was analysed in untreated and bortezomib-treated JG cells. (b) JG and M28 cells were exposed to 25 nmol L⁻¹ of bortezomib, 0.5 µmol L⁻¹ of MG-132, 10 µmol L⁻¹ of ALLN or 10 nmol L⁻¹ of epoxomicin for 24 h and whole cell protein extracts were subjected to Western blot analysis to monitor the expression of processed caspase 3, caspase 8, caspase 2 and caspase 9. The blots were subsequently reprobed with antitubulin. (c) M28 cells were treated with 25 nmol L⁻¹ of bortezomib for 0, 12 and 24 h, after which protein extracts were prepared from mitochondrial free cytosolic fractions as described in Materials and methods and relative levels of cytochrome c were determined by Western blot. LDH, lactate dehydrogenase.

respectively. The engagement of the intrinsic or mitochondrial death pathway is often accompanied by the release of several proapoptotic factors such as cytochrome c into the cytoplasm and subsequent binding to Apaf-1, which results in apoptosome activation of caspase 9.¹⁶ Activated caspase 9, in turn, cleaves and activates procaspase 3, leading to apoptosis.¹⁷ In

our cells, bortezomib induced cytochrome c translocation as assessed by the increase of cytochrome c levels in the cytosolic fraction of bortezomib-treated cells (Fig. 3c).

Proteasome inhibitors induce both caspase-dependent and caspase-independent cell death

Next, we wanted to characterize the type of cell death induced by proteasome inhibitors. Therefore, we first determined the extent of caspase inhibition accomplished by BAF, a broad-specificity caspase inhibitor. As shown in Figure 2b, bortezomib treatment induced the sub-G₁ peak, and this was prevented by BAF. Furthermore, as expected, nuclei of cells

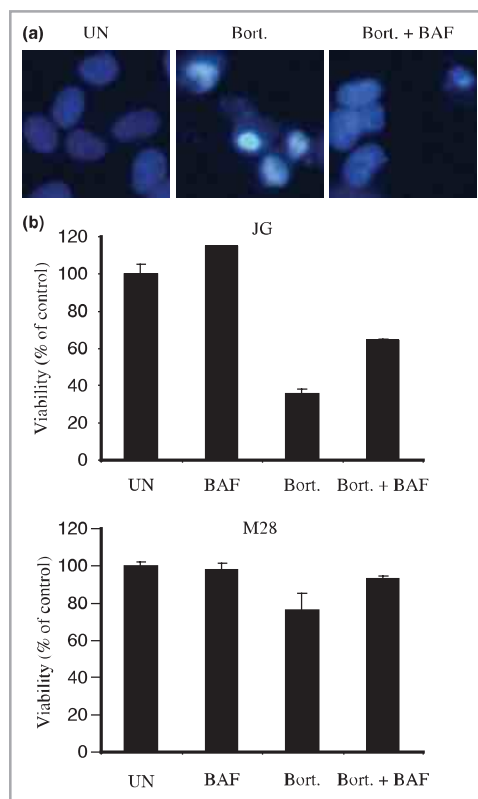


Fig 4. Role of caspases in mediating proteasome inhibitor-induced cell death. (a) Proliferating melanoma JG cell line was pretreated with phosphate-buffered saline (PBS) or the pancaspase inhibitor BAF (Boc-D-fmk) (100 µmol L⁻¹), and then exposed to bortezomib (25 µmol L⁻¹) for 24 h and Hoechst 33258-stained apoptotic nuclei were visualized. (b) M28 and JG cell lines were pretreated with PBS or the pancaspase inhibitor BAF (100 µmol L⁻¹), and then exposed to bortezomib (25 nmol L⁻¹) for 24 h. Cell viability was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. Results are shown as mean ± SD percentage of the control values.

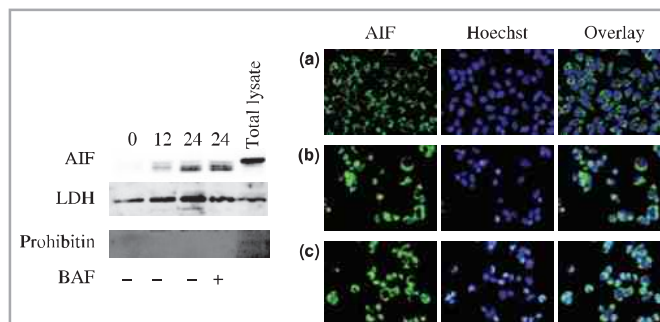


Fig 5. Proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis-inducing factor (AIF) release from the mitochondria. JG cells were treated with 25 nmol L⁻¹ of bortezomib for the designated periods (hours), in the presence or absence of pancaspase inhibitor BAF (Boc-D-fmk), after which protein extracts were prepared from mitochondrial free cytosolic fractions as described in Materials and methods and relative levels of AIF were determined by Western blot. LDH, lactate dehydrogenase. For immunofluorescence detection, cells were cultured in four-well plates and were either left untreated (a) or treated with 25 nmol L⁻¹ of bortezomib for 24 hours, in the absence (b) or presence (c) of pancaspase inhibitor BAF. Pictures show Hoechst 33258 (blue) and AIF (green) staining. Fluorescence images were captured by a fluorescence microscope, and representative images are shown.

treated with the combination of bortezomib + BAF did not present apoptotic morphology when stained by Hoechst 33258 (Fig. 4a). Next, MTT reduction was assessed in cells cotreated with BAF and bortezomib. As shown in Figure 4b, while caspase inhibition resulted in a partial reversal of cell viability decrease in JG cells, it almost completely abolished bortezomib-induced decrease of cell viability in M28 cells. These results suggest that proteasome inhibitors-induced killing of melanoma cells is partially a caspase-dependent process, and that the involvement of a caspase-independent cell death programme varies among cell lines.

Proteasome inhibition induces the release of apoptosis-inducing factor from the mitochondria in the absence of caspase activation

The intermembrane space of mitochondria contains proteins such as AIF and endonuclease G, which can be responsible for caspase-independent cell death.¹⁸ During apoptosis, the 62-kDa mature form of AIF is cleaved to a 57-kDa fragment¹⁹ that detaches from the mitochondria and then translocates to cytosol and nucleus where it interacts with DNA and triggers a caspase-independent cell death.²⁰ Viability of JG cells treated with bortezomib was partially rescued when pancaspase inhibitor was added, suggesting that caspase-independent cell death occurs in these cells. Therefore, we checked AIF translocation in this cell line by immunofluorescence and Western blot analysis. Under basal conditions, immunofluorescence staining showed a punctate pattern of AIF which reveals a mitochondrial localization (Fig. 5a). This staining disappeared when cells were treated with proteasome inhibitors in accordance with AIF translocation to the cytosol and nucleus (Fig. 5b). This result was further confirmed by cell fractionation assay where proteasome inhibition induced an increase of AIF levels in the cytosolic fraction. Cytosolic AIF was smaller in size than

mitochondrial AIF (Fig. 5). This is in agreement with the proposed mechanism of apoptosis-induced AIF cleavage.¹⁹

The involvement of caspases in AIF translocation from the mitochondria to the cytosol is still controversial and has been proposed to be both caspase dependent²¹ and caspase independent.²² Caspase inhibition by BAF did not affect the mitochondrial to cytosolic translocation of AIF in JG cells (Fig. 5c). In fact, JG cells cotreated with BAF and bortezomib presented a diffuse distribution pattern staining as with bortezomib alone. This result was further confirmed by cell fractionation (Fig. 5). This suggests that, in JG cells, AIF release from the mitochondria occurs via a caspase-independent pathway.

Discussion

It is well established that proteasome inhibitors cause cell death on tumour cell lines of different origins, by different mechanisms. Preclinical studies have shown the antitumour activity of proteasome inhibitors in haematological and solid tumours including ovary, prostate, lung, colon, pancreas and head and neck carcinoma.^{23,24} Among the proteasome substrates are the mediators of cell-cycle progression such as cyclins, cyclin-dependent kinase inhibitors, antiapoptotic factors such as Bcl-2 and the tumour-suppressor protein p53. In addition, the proteasome controls transcriptional factors that suppress the apoptotic machinery such as NF-κB by regulating the degradation of its inhibitor I-κB.²⁵ Thus, the inhibition of the proteasome triggers cell-cycle arrest at G₁-S and G₂-M phases, and induces apoptosis. Furthermore, it was demonstrated that malignant cells are more sensitive than normal cells to proteasome inhibitor-induced apoptosis,⁵ and that a synergistic interaction exists between proteasome inhibitors and apoptotic stimulus.^{26,27} Thus, proteasome inhibitors seem to be promising compounds in anticancer therapy as they can

abrogate many forms of drug resistance and synergize with a number of conventional therapies.

Although the only published clinical trial with bortezomib in patients with advanced melanoma did not show significant results,²⁸ the potential use of proteasome inhibitors for the treatment of patients with melanoma is still under assessment. Firstly, proteasome inhibitors could be helpful when administered in combination with standard, chemotherapeutic or radiation therapies,^{5,29–32} or with other therapeutic strategies.^{31,33–35} Secondly, new drugs exhibiting some of the biological properties of proteasome inhibitors,^{36–39} together with additional effects on angiogenesis,⁴⁰ may contribute to inhibit melanoma growth.

Hence, the main aim of the present work was to investigate the molecular mechanisms of proteasome-induced growth-inhibitory effect, as a better understanding of these mechanisms might be a promising tool that could improve the effectiveness of future melanoma therapy.

In this study, we show that four structurally different proteasome inhibitors reduce the viability of melanoma cell lines, and that the decrease of viability of low proliferating cell lines needs longer exposures to proteasome inhibitors. This result is in agreement with others that show that cell cycle and apoptosis are inextricably linked processes. Thus, cells with a higher proliferation rate are more susceptible to apoptosis. For example, expression of the oncogene *c-myc* can initiate proliferation and simultaneously increase sensitivity to apoptosis under low serum conditions.⁴¹

The antiproliferative effect of proteasome inhibitors was achieved through cell cycle arrest and increased apoptosis as confirmed by assessment of nuclear morphology, analysis of DNA and caspase processing (caspases 2, 8, 9 and 3). To our knowledge, there is no current work reporting caspase 2 processing in bortezomib-treated melanoma cells. Recent evidence shows that mitochondrial release of cytochrome *c* and phosphatidylserine externalization by the proteasome inhibitor bortezomib are regulated by caspase 2⁴² in human pancreatic cancer cells. Further investigations are needed to elucidate the mechanisms linking cytochrome *c* release and caspase 2 processing in our cell model.

Pretreatment of JG cells with the pancaspase inhibitor BAF partially reversed the decrease of cell viability caused by proteasome inhibition, suggesting that proteasome inhibitors may induce cell death partially via a caspase-independent pathway in these cells. In contrast, M28 cells seemed less sensitive to caspase-independent cell death, as assessed by MTT. As mitochondria harbour molecules that, once released in the cytoplasm, trigger caspase-independent cell death pathways^{43,44} (AIF and endonuclease G), we examined the release of AIF in JG cells. We found that proteasome inhibition induced a significant release of AIF. In order to check if AIF release depends on caspase activation, we cocreated our cells with bortezomib and BAF. Our results show that caspase inhibition by BAF does not affect AIF release due to bortezomib, suggesting that AIF is the potential executor of caspase-independent cell death. Recent publications have

proposed that apoptosis would follow a general scheme where cytochrome *c* release from mitochondria would stimulate the activation of caspases, which then triggers AIF release from mitochondria.⁴⁵ Our data are in agreement with other studies that have described the release of AIF in the absence of detectable caspase activation.^{20,46}

On the whole, our results indicate that proteasome inhibitors stop cell proliferation and induce cell death in melanoma cells. This death occurs via both caspase-dependent and caspase-independent pathways, and AIF is a potential executor of caspase-independent cell death. These results may be useful information for the use of proteasome inhibitors in combination with chemotherapeutic drugs or other agents in the treatment of melanoma.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from Fondo de Investigación Sanitaria (PI060832). A.S. holds a predoctoral fellowship position granted by Fundación Científica AECC, Catalunya contra el Cancer, Lleida. The authors thank Mario Encinas for discussions and critical reading of the manuscript.

References

- 1 Wolchok JD, Livingston PO. Vaccines for melanoma: translating basic immunology into new therapies. *Lancet Oncol* 2001; **2**:205–11.
- 2 Borner C, Schlagbauer-Wadl H, Fellay I *et al.* Mutated N-ras upregulates Bcl-2 in human melanoma *in vitro* and in SCID mice. *Melanoma Res* 1999; **9**:347–50.
- 3 Yang J, Amiri KI, Burke JR *et al.* BMS-345541 targets inhibitor of kappaB kinase and induces apoptosis in melanoma: involvement of nuclear factor kappaB and mitochondria pathways. *Clin Cancer Res* 2006; **12**:950–60.
- 4 Satyanarayanan K, Clelab NH, Waterman MJ *et al.* Aberrant regulation and function of wild-type p53 in radioresistant melanoma cells. *Cell Growth Differ* 2000; **11**:467–74.
- 5 Fernandez Y, Verhaegen M, Miller TP *et al.* Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res* 2005; **65**:6294–304.
- 6 Wilk S, Orłowski M. Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J Neurochem* 1983; **40**:842–9.
- 7 Meng L, Mohan R, Kwok BH *et al.* Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits *in vivo* anti-inflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**:10403–8.
- 8 Adams J. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist* 2002; **7**:9–16.
- 9 Adams J, Palombella VJ, Sausville EA *et al.* Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumour agents. *Cancer Res* 1999; **59**:2615–22.
- 10 Vilella R, Benítez D, Mila J *et al.* Treatment of patients with progressive unresectable metastatic melanoma with a heterologous polyvalent melanoma whole cell vaccine. *Int J Cancer* 2003; **106**:626–31.
- 11 Vilella R, Benítez D, Mila J *et al.* Pilot study of treatment of biochemotherapy-refractory stage IV melanoma patients with autologous dendritic cells pulsed with a heterologous melanoma cell line lysate. *Cancer Immunol Immunother* 2004; **53**:651–8.

- 12 Mayorga ME, Sanchis D, Perez de Santos AM *et al.* Antiproliferative effect of ST1571 on cultured human cutaneous melanoma-derived cell lines. *Melanoma Res* 2006; **16**:127–35.
- 13 Bahi N, Zhang J, Llovera M *et al.* Switch from caspase-dependent to caspase-independent death during heart development: essential role of endonuclease G in ischemia-induced DNA processing of differentiated cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2006; **281**:22943–52.
- 14 Gross A, Jockel J, Wei MC *et al.* Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 1998; **17**:3878–85.
- 15 Qin JZ, Ziffra J, Stennett L *et al.* Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res* 2005; **65**:6282–93.
- 16 Li P, Nijhawau D, Budihardjo I *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; **91**:479–89.
- 17 Robertson JD, Orrenius S, Zhivotovsky B. Review: nuclear events in apoptosis. *J Struct Biol* 2000; **129**:346–58.
- 18 Wang X, Yang C, Chai J *et al.* Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2002; **298**:1587–92.
- 19 Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z *et al.* Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J* 2005; **24**:1375–86.
- 20 Joza N, Susin SA, Daugas E *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001; **410**:549–54.
- 21 Arnoult D, Parone P, Martinou JC *et al.* Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J Cell Biol* 2002; **159**:923–9.
- 22 Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG *et al.* Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* 2002; **158**:507–17.
- 23 Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell* 2004; **5**:417–21.
- 24 Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**:349–60.
- 25 Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL *et al.* The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 1994; **78**:773–85.
- 26 LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T *et al.* Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth *in vivo* and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 2002; **62**:4996–5000.
- 27 Nagy K, Szekely-Szuts K, Izeradjene K *et al.* Proteasome inhibitors sensitize colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via enhanced release of Smac/DIABLO from the mitochondria. *Pathol Oncol Res* 2006; **12**:133–42.
- 28 Markovic SN, Geyer SM, Dawkins F *et al.* A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Cancer* 2005; **103**:2584–9.
- 29 Amiri KI, Horton LW, LaFleur BJ *et al.* Augmenting chemosensitivity of malignant melanoma tumours via proteasome inhibition: implication for bortezomib (Velcade, PS-341) as a therapeutic agent for malignant melanoma. *Cancer Res* 2004; **64**:4912–18.
- 30 Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T *et al.* Inhibition of constitutively activated nuclear factor-kappaB radiosensitizes human melanoma cells. *Mol Cancer Ther* 2004; **3**:985–92.
- 31 Mlynarczuk-Bialy I, Roeckmann H, Kuckelkorn U *et al.* Combined effect of proteasome and calpain inhibition on cisplatin-resistant human melanoma cells. *Cancer Res* 2006; **66**:7598–605.
- 32 Sosman JA, Puzanov I. Molecular targets in melanoma from angiogenesis to apoptosis. *Clin Cancer Res* 2006; **12**:S2376–83.
- 33 Schumacher LY, Vo DD, Garban HJ *et al.* Immunosenescence of tumour cells to dendritic cell-activated immune responses with the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341, Velcade). *J Immunol* 2006; **176**:4757–65.
- 34 Pei XY, Dai Y, Grant S. Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2004; **10**:3839–52.
- 35 Freudlspurger C, Thies A, Pfuller U *et al.* The proteasome inhibitor bortezomib augments anti-proliferative effects of mistletoe lectin-I and the PPAR-gamma agonist rosiglitazone in human melanoma cells. *Anticancer Res* 2007; **27**:207–13.
- 36 Jiang W, Mikochik PJ, Ra JH *et al.* HIV protease inhibitor nelfinavir inhibits growth of human melanoma cells by induction of cell cycle arrest. *Cancer Res* 2007; **67**:1221–7.
- 37 Vivier M, Jarrousse AS, Bouchon B *et al.* Preliminary studies of new proteasome inhibitors in the tumour targeting approach: synthesis and *in vitro* cytotoxicity. *J Med Chem* 2005; **48**:6731–40.
- 38 Chauhan D, Hideshima T, Anderson KC. A novel proteasome inhibitor NPI-0052 as an anticancer therapy. *Br J Cancer* 2006; **95**:961–5.
- 39 Joazeiro CA, Anderson KC, Hunter T. Proteasome inhibitor drugs on the rise. *Cancer Res* 2006; **66**:7840–2.
- 40 Daniel KG, Kuhn DJ, Kazi A *et al.* Anti-angiogenic and anti-tumour properties of proteasome inhibitors. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; **5**:529–41.
- 41 Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS *et al.* Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992; **69**:119–28.
- 42 Yeung BH, Huang DC, Sinicrope FA. PS-341 (bortezomib) induces lysosomal cathepsin B release and a caspase-2-dependent mitochondrial permeabilization and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 2006; **281**:11923–32.
- 43 Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001; **412**:95–9.
- 44 Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; **397**:441–6.
- 45 Arnoult D, Gaume B, Karbowski M *et al.* Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J* 2003; **22**:4385–99.
- 46 Dumont C, Durbach A, Bidere N *et al.* Caspase-independent commitment phase to apoptosis in activated blood T lymphocytes: reversibility at low apoptotic insult. *Blood* 2000; **96**:1030–8.

ARTICLE 3.

3. Inhibition of activated receptor tyrosine kinase by Sunitinib induces growth arrest and sensitizes melanoma cells to Bortezomib by blocking Akt pathway.

3. La inhibició de receptors tirosina cinasa activats per part del Sunitinib indueix una reducció del creixement i sensibilitza les cèl·lules de melanoma a Bortezomib mitjançant el bloqueig de la via Akt.

3.1 Tant les biòpsies de teixit de melanoma primari i metastàtic com les línies cel·lulars de melanoma expressen receptors diana de Sunitinib.

3.2 Sunitinib indueix diferents graus de parada del creixement cel·lular en les línies de melanoma metastàtic.

3.3 Sunitinib inhibeix les vies de senyalització cel·lulars “downstream” de VEGFR2 i PDGFR α en les línies cel·lulars M17 i M16, respectivament.

3.4 El silenciament de PDGFRA i VEGFR2 per shRNA mimetitza els efectes de les línies cel·lulars M16 i M17, respectivament.

3.5 La combinació de l'inhibidor de la via PI3K/Akt LY i Bortezomib indueix un increment de la mort cel·lular de forma sinèrgica.

Inhibition of activated receptor tyrosine kinases by Sunitinib induces growth arrest and sensitizes melanoma cells to Bortezomib by blocking Akt pathway

Andree Yeramian¹, Anabel Sorolla¹, Ana Velasco¹, Maria Santacana¹, Xavier Dolcet¹, Joan Valls², Leandre Abal³, Sara Moreno³, Ramón Egado¹, Josep M. Casanova³, Susana Puig⁴, Ramón Vilella⁵, Antonio Llombart-Cussac⁶, Xavier Matias-Guiu¹ and Rosa M. Martí³

¹Pathology Group, Department of Pathology and Molecular Genetics, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRB-Lleida, Lleida, Spain

²Biostatistics Unit, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRB-Lleida, Lleida, Spain

³Department of Dermatology, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRB-Lleida, Lleida, Spain

⁴Department of Dermatology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

⁵Department of Immunology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

⁶Department of Oncology, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRB-Lleida, Lleida, Spain

Despite the use of multiple therapeutic strategies, metastatic melanoma remains a challenge for oncologists. Thus, new approaches using combinational treatment may be used to try to improve the prognosis of this disease. In this report, we have analyzed the expression of receptor tyrosine kinases (RTKs) in melanoma specimens and in four metastatic melanoma cell lines. Both melanoma specimens and cell lines expressed RTKs, suggesting that they may represent eventual targets for multitargeted tyrosine kinase inhibitor, Sunitinib. Sunitinib reduced the proliferation of two melanoma cell lines (M16 and M17) and increased apoptosis in one of them (M16). Moreover, the two metastatic melanoma cell lines harbored an activated receptor (PDGFR α and VEGFR, respectively), and Sunitinib suppressed the phosphorylation of the RTKs and their downstream targets Akt and ribosomal protein S6, in these two cell lines. Similar results were obtained when either PDGFR α or VEGFR2 expression was silenced by lentiviral-mediated short-hairpin RNA delivery in M16 and M17, respectively. To evaluate the interaction between Sunitinib and Bortezomib, median dose effect analysis using MTT assay was performed, and combination index was calculated. Bortezomib synergistically enhanced the Sunitinib-induced growth arrest in Sunitinib-sensitive cells (combination index < 1). Moreover, LY294002, a PI3K inhibitor, sensitized melanoma cells to Bortezomib treatment, suggesting that downregulation of phospho-Akt by Sunitinib mediates the synergy obtained by Bortezomib + Sunitinib cotreatment. Altogether, our results suggest that melanoma cells harboring an activated RTK may be clinically responsive to pharmacologic RTK inhibition by Sunitinib, and a strategy combining Sunitinib and Bortezomib, may provide therapeutic benefit.

Key words: melanoma, Bortezomib, RTK, Sunitinib, Akt, survival, apoptosis

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

A.Y. and A.S. are first authors and X.M-G. and R.M.M. are senior authors.

Grant sponsors: Fondo de Investigaciones Sanitarias (Ministerio de Sanidad y Consumo). Suport a grups de recerca consolidats (Generalitat de Catalunya). RTICC and Programa de Intensificació de la Investigació (Instituto Carlos III). Xarxa Catalana de Bancs de Tumors. Programa Juan de la Cierva (Ministerio de Educación y Ciencia). Fundación científica AECC, Catalunya Contra el Cancer, Lleida. Gotta; **Grant numbers:** FIS-PI060832, CP05/00028, 2009S6R794, RD06/0020/1034, RD 09/0076/00059

DOI: 10.1002/ijc.26096

History: Received 2 Dec 2010; Accepted 7 Mar 2011; Online 28 Mar 2011

Correspondence to: Rosa M. Martí, Department of Dermatology, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, 2a planta, Avda. Alcalde Rovira Roure, 80, Lleida 25198, Spain, Tel.: +34-973705238, Fax: +34-973-702-435, E-mail: marti@medicina.udl.cat

Cutaneous melanoma is the most aggressive form of skin cancer. To date, the methylating agent dacarbazine is still the standard treatment for metastatic melanoma allowing objective responses in just 10–20% of patients with a median duration of only 4–6 months. Therefore, new therapeutic strategies are under investigation, such as immunotherapy and targeted therapy.¹ Although recently reported clinical trials using targeted therapies either against c-kit in melanoma harboring c-kit mutation,^{2,3} or against Braf in tumors harboring V600E mutation⁴ achieved promising results, and secondary tumor resistance occurs frequently. The loss of function of tumor suppressor genes and the activation of multiple signaling pathways in melanoma may explain the origin of such resistance. Thus, a therapeutic approach using combinatory therapies based on the expression profile of patient's tumors and designed to target simultaneously different cellular pathways may improve metastatic melanoma prognosis and counter drug resistance developed in patients treated with single-agent therapy.^{5–7}

In tumors, ligand-dependent or mutational activation of receptor tyrosine kinases (RTKs) leads to the activation of

downstream signaling pathways including Ras, PI3 kinase and MAPK pathways.⁸ Various RTKs are expressed on melanoma cells such as VEGFR,^{9,10} PDGFR,^{11,12} and c-kit.^{11,13} Sunitinib (SU011248; Sutent®, Pfizer, New York, NY) is a multitargeted tyrosine kinase inhibitor that potently inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and c-kit¹⁴ receptor kinases. Recently, Sunitinib maleate was approved by the FDA for the treatment of both renal cell carcinoma¹⁵ and gastrointestinal stromal tumors.

The ubiquitin proteasome pathway represents a novel attractive target for cancer therapy, as it controls the degradation of a wide variety of intracellular proteins involved in proliferation, cell cycle and apoptosis,¹⁶ such as p21Cip1, p27Kip1 and Bax. Bortezomib (Velcade®, also known as PS-341; Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA), a dipeptidyl boronic acid that reversibly inhibits the chemotrypsin-like activity of the proteasome, has demonstrated its clinical activity in the treatment of patients with multiple myeloma and non-Hodgkin lymphoma. Although proteasome inhibitors induced growth arrest of melanoma cells both *in vitro*¹⁷ and in a murine xenograft melanoma model,^{18,19} a phase II clinical trial using single-agent Bortezomib in patients with advanced melanoma yielded disappointing results.²⁰ However, preclinical studies in melanoma have shown that Bortezomib exerts an antitumor effect in a synergic manner when administered with temozolomide²¹ or calpain inhibitors.^{21,22} Moreover, different tyrosine kinase inhibitors such as Imatinib, EGFR inhibitors and Sorafenib have demonstrated an *in vitro* enhanced cytotoxicity when combined with Bortezomib in a broad range of tumors.^{23–25}

In this report, we first explored the effects of single-agent Sunitinib on cell survival and proliferation in four human metastatic melanoma cell lines. We found that two metastatic melanoma cell lines, which presented a phosphorylated RTK, were sensitive to Sunitinib. Inhibition of these RTKs by Sunitinib induced growth arrest and blocked RTK downstream pathways, *i.e.*, PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK signaling cascades. Furthermore, we found that only in the melanoma cells that are sensitive to Sunitinib, a combined exposure to Sunitinib and Bortezomib resulted in a synergistic decrease of cell viability and an increase in caspase activation and apoptosis. Our results suggest that an activated RTK may represent an attractive target for melanoma treatment and that combined therapy, which targets both RTK and the ubiquitin proteasome pathway, could be useful for the design of future preclinical or clinical studies in melanoma.

Material and Methods

Cell cultures and treatment procedures

Four metastatic human melanoma cell lines of cutaneous origin (M16, M17, M28 and JG), established by one of the authors (R.V.), were used in this study. Two other metastatic melanoma cell lines, M14 and M3, obtained from a cutaneous metastasis and a pleural effusion, respectively, were used

in the supplemental material.²⁶ Human epidermal melanocytes (HEMn-LP) were purchased from Cascade Biologics (Invitrogen, Portland, OR). Melanoma cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, St. MO) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco, Barcelona, Spain), 20 mmol l⁻¹ L-glutamine and antibiotics at 37°C and 5% CO₂. HEMn-LP cells were cultured in 154 medium supplemented with human melanocytes growth supplement obtained from Cascade Biologics (Invitrogen, Portland, OR) and antibiotics.

Chemical reagents and antibodies

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), RNase A, propidium iodide (PI), 5-bromodeoxyuridine (BrdU) and monoclonal antibody to tubulin were from Sigma. The proteasome inhibitor Bortezomib was manufactured by Millennium Pharmaceuticals. The tyrosine inhibitor Sunitinib was kindly provided by Pfizer. LY294002 was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). Antibodies against caspase 9, cleaved caspase 3, phospho-AKT ser 473, phospho-AKT thr 308, phospho-ERK 1/2, phospho-p70S6K, PDGFR α , PDGFR β , c-kit and VEGFR2 were from Cell Signalling (Beverly, MA). Antibodies against c-kit and BrdU were from Dako (Glostrup, Denmark). Antibodies against AKT, cyclin D1 and phosphotyrosine were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). HA antibody was purchased from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany).

Cell viability assays and assessment of apoptosis

Cell viability was determined by MTT assay. Melanocytes and melanoma cells were plated on M96 well plates at 3500 cells per well. After the corresponding treatments, cells were incubated for 45 min with 0.5 mg ml⁻¹ of MTT reagent and lysed with DMSO. Absorbance was measured at 595 nm in a microplate reader (Bio-Rad, Richmond, CA). Apoptotic cells were identified by nuclear staining with bis-benzimide fluorescent dye (Hoechst 33258) that was added to the culture medium at a final concentration of 5 μ g/ml. For clonogenic assays, 10³ cells were seeded in 2-ml culture medium per well (six well plate), left untreated or treated every 2 days with 0.5 μ M Sunitinib. After 14 days of culture, colonies were visualized by staining with MTT.

BrdU incorporation

5-Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay was performed as described previously.¹⁷ Nuclei were stained with 5 μ g ml⁻¹ Hoechst 33258, and cells were visualized under an epifluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Immunoprecipitation and Western blot analysis

For Western blot analysis, melanoma cell lines or melanocytes were washed twice with cold PBS and lysed with lysis buffer (2% SDS, 125 mM Tris-HCL and pH 6.8). Protein concentrations were determined with the Protein Assay Kit

(Bio-Rad). Equal amounts of proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore, Bedford, MA). Nonspecific binding was blocked by incubation with TBST (20 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20) plus 5% of nonfat milk. Membranes were incubated with the primary antibodies overnight at 4°C. The signal was detected with ECL Advance (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK). For RTK immunoprecipitation, cells were washed and lysed in a buffer-containing 20 mM Tris pH 7.4, 140 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10% glycerol, 1% NP-40, 1 mM Na₂VO₄, 10 mM NaF, 50 mM α -glycerophosphate and a complete protease inhibitor (Roche). Cell lysates were incubated with anti-PDGFR α , PDGFR β , VEGFR-2 or c-kit antibodies followed by protein A-agarose or protein G-sepharose (Sigma). Samples were subjected to Western blot analysis.

Lentiviral production and infection

Oligonucleotides to produce plasmid-based short hairpin RNA (shRNA) were cloned into de FSV vector using AgeI-BamHI restriction sites. shRNA target sequence to PDGFRA was 5'-GCAGGCTGATACTACACAGTA-3', and the target sequence to VEGFR2 was 5'-GCCTCGGTCATTATGTC TAT-3'. To produce infective lentiviral particles, 293T cells were cotransfected by PEI method with the virion packaging elements (VSV-G and D8.9) and the FSV on 293T human embryonic kidney. Supernatants were collected after 3 days and concentrated by centrifugation through a filter column of 100 kDa (VWR International LLC, West Chester, PE) for 1 hr at 4000 rpm. Cells were incubated overnight in the presence of medium-containing lentiviral particles. After this period, medium was replaced for fresh medium, and cells were incubated for at least 72 hr to allow endogenous protein knockdown or protein overexpression.

Cell-cycle analysis

Analysis of cell-cycle distribution was determined by PI staining as described elsewhere.¹⁷

Immunohistochemical analysis

Human malignant melanoma biopsies (formalin fixed and paraffin embedded) were treated as described.²⁷ The malignant melanoma biopsies included nine primary malignant melanomas of the skin (five superficial spreading melanomas, two nodular melanomas, one acral lentiginous melanoma, one lentigo malignant melanoma) and nine metastatic melanoma tumors (seven cutaneous or subcutaneous metastases, one retroperitoneum metastasis and one brain metastasis). Briefly, paraffin blocks were sectioned at a thickness of 3 μ m, dried for 1 hr at 65° before being dewaxed in xylene and rehydrated through a graded ethanol series and washed with phosphate-buffered saline. Antigen retrieval was achieved by heat treatment in a pressure cooker for 2 min in EDTA (pH:8.9). Before staining the sections, endogenous peroxidase was blocked. The antibodies used were anti-VEGFR2 (mono-

clonal, A3 clon, Santa Cruz Biotechnology, 1/100 dilution), PDGFR α (monoclonal, C20 clon, Santa Cruz Biotechnology, 1/200 dilution), anti-PDGFR β (monoclonal, 2B3 clon, Cell Signalling, 1/100 dilution) and anti-cKIT (polyclonal, DAKO, 1/50 dilution). After incubation, the reaction was visualized with the EnVision Detection Kit (DAKO) using diaminobenzidine chromogen as a substrate. Sections were counterstained with haematoxylin. Tissue specimens were also stained in parallel without primary antibody in order to confirm the specificity of the immunoreaction. Immunohistochemical results were evaluated by two pathologists, by following uniform pre-established criteria. VEGFR-2, PDGFR α , PDGFR β and c-KIT immunoreaction was graded semi-quantitatively by considering the percentage and intensity of the staining. A histological score was obtained from each sample, which ranged from 0 (no immunoreaction) to 300 (maximum immunoreactivity). The score was obtained by applying the following formula, Hscore = 1X (% light staining) + 2X (% moderate staining) + 3X (% strong staining). Histoscore values from primary and metastatic melanoma tumors were compared for each receptor to assess the significance of the observed difference in the means of both groups using Student's *t*-test. The nonparametric Mann-Whitney test was also used to evaluate this difference, given the small sample size. Statistical significance was set at 5% ($\alpha = 0.05$), and all statistical results were performed with the statistical package R (R Development Core Team, 2009). In addition, normal skin samples (obtained from the edges of elliptical excision of benign cutaneous lesions) were stained with the same primary antibodies and immunohistochemical method, but using 3-amino-9-ethylcarbazole as chromogen.

DNA sequencing

Sequence analysis was performed by direct sequencing of polymerase chain reaction (PCR)-amplified products, generated with specific primers designed to include the exons of interest based on BRAF sequences (accession number NM_004333 for BRAF). BRAF primers were as follows: exon 15 5'-TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA-3' (forward) and 5'-GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A-3' (reverse). The PCR cycling conditions were as follows: an initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 35 cycles of 96°C for 30 sec, 55°C for 30 sec and 72°C for 30 sec and completed with an extension step at 72°C for 10 min.

PCR products were purified using the MinElute PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and sequenced in both directions with the original primer pair using BigDye v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) in combination with an ABI PRISM 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems).

Analysis of combined drug effects

The effect of combining Sunitinib and Bortezomib was analyzed using the median effect method proposed by Chou and

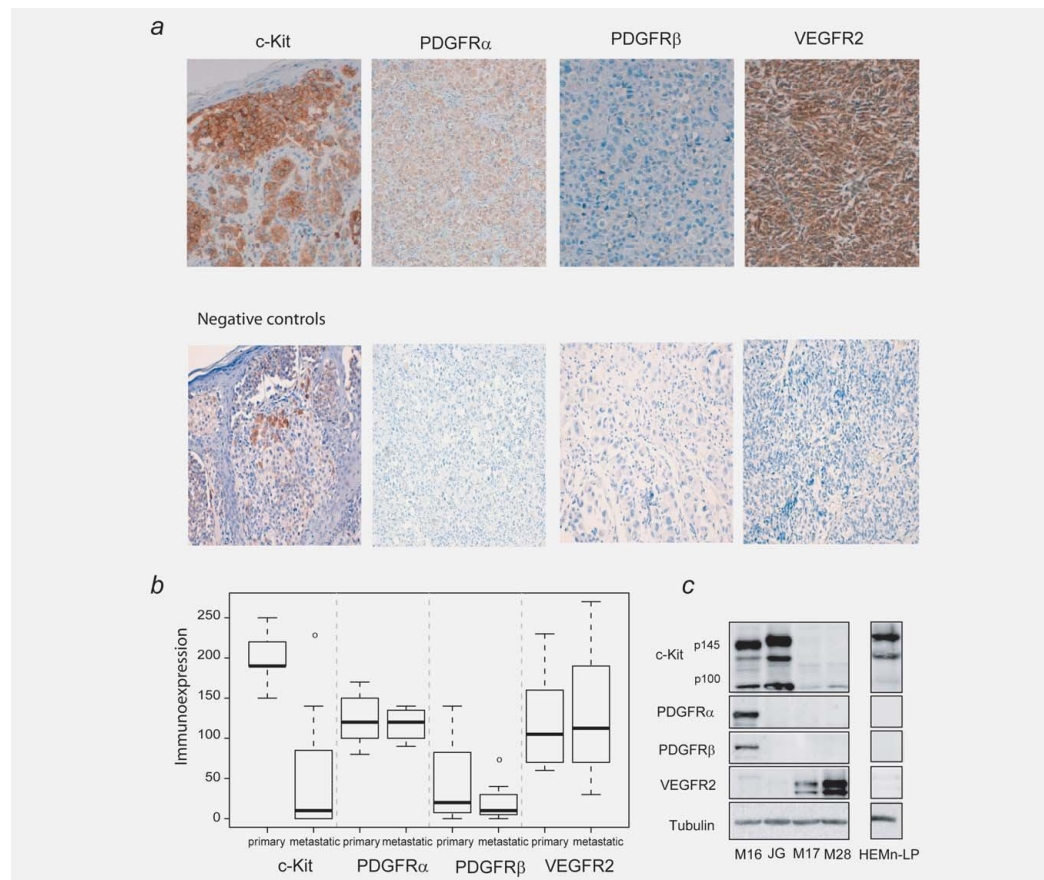


Figure 1. Expression profile of RTK in melanoma biopsies and metastatic melanoma cell lines. (a) Top panel: Melanoma biopsies analyzed by immunohistochemistry: expression of c-Kit in a primary melanoma, PDGFR α and PDGFR β in a cutaneous metastasis and VEGFR2 in a lymph node metastasis. Bottom panel: corresponding pictures of matched sections without primary antibody (negative controls). (b) Immunorexpression levels of c-Kit, PDGFR α , PDGFR β and VEGFR2 were calculated by a histoscore method (being 300 points the maximum immunoreactivity) and represented by boxplots. These boxplots show the usual position measures (minimum, first quartile, *i.e.*, Q_1 , median, *i.e.*, Q_2 , third quartile, *i.e.*, Q_3 and maximum) and serve to visualize in depth the differences between primary and metastatic samples (total of 18) for each receptor. Outliers, which are defined as those values, which exceed Q_3 or which fall behind Q_1 in 1.5 times the interquartile range ($IQR = Q_3 - Q_1$), are also shown as a point. (c) Total cell lysates of the four metastatic melanoma cell lines (M16, M17, JG and M28) and normal melanocytes (HEMn-LP) were analyzed by western blot for c-Kit, PDGFR α , PDGFR β and VEGFR2 expression. Tubulin was used as a loading control.

Talalay²⁸ using CalcuSyn software (Biosoft, Oxford, UK) as reported previously.²⁹

Results

Both primary and metastatic melanoma tissue specimens and metastatic melanoma cell lines express Sunitinib target receptors

To better understand the role of RTK in melanoma biology, we first examined using immunohistochemistry the expres-

sion of PDGFR α , PDGFR β , VEGFR2 and c-Kit receptors in melanoma biopsies (Fig. 1a). Among the receptors tested, PDGFR α and VEGFR2 showed a uniform positivity in both primary and metastatic melanomas. PDGFR β staining was found to be faint in both primary and metastatic melanomas. As for c-Kit expression, it presented a partial loss of staining in metastatic tissue (p -value = 0.001 for the t -test and p -value = 0.005 for Mann-Whitney test) confirming the results

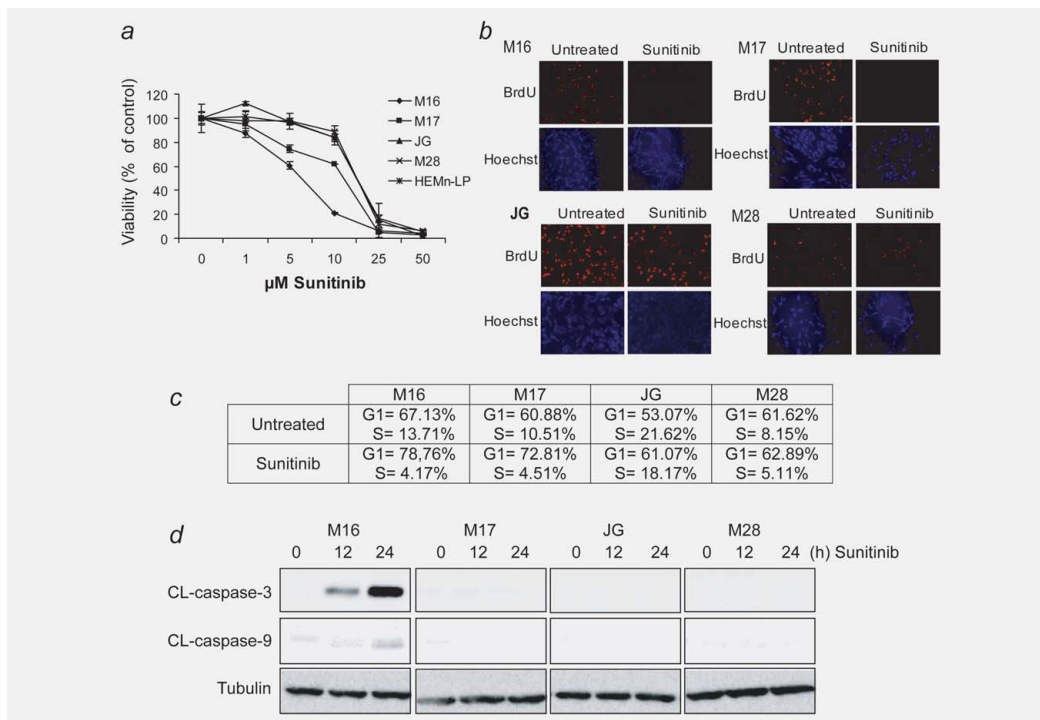


Figure 2. Sunitinib induces different rates of growth arrest in four metastatic melanoma cell lines. (a) The four melanoma cells and normal melanocytes were treated with Sunitinib (0–1–5–10–25–50 μmol/l) for 24 hr at 37°C, and cell viability was assessed by MTT assay. (b) Melanoma cells were incubated with Sunitinib (5 μmol/l) for 24 hr, and cell proliferation was assessed by 5-bromodeoxyuridine incorporation assay. Pictures show BrdU incorporation and Hoechst 33258 staining. (c) The four melanoma cells were treated with 5 μM of Sunitinib for 24 hr or maintained untreated, after which DNA content was determined by propidium iodide staining. (d) Melanoma cells were exposed to 5 μM of Sunitinib and whole-cell protein extracts were subjected to Western blot analysis to monitor the expression of processed caspase 3.

of previous reports^{11,13} (Fig. 1b). Next, we examined the expression status of different Sunitinib target receptors in four metastatic melanoma cell lines and in normal melanocytes. Both M28 and M17 cell lines expressed VEGFR2, JG cell-line expressed c-kit, while M16 cell-line expressed c-kit, PDGFRα and PDGFRβ (Fig. 1c). Interestingly, cultured primary melanocytes (HEMn-LP) expressed c-kit and were negative for the other RTK tested (Fig. 1c). Moreover, on normal skin sections, c-kit was the only RTK of those investigated that showed a clear and intense immunostaining on epidermal melanocytes (Supporting Information Fig. 1). Hence, melanoma cells presented a positive but variable expression pattern of RTK (Figs. 1a–1c).

Sunitinib induces different rates of growth arrest in metastatic melanoma cell lines

To explore whether Sunitinib has antitumor effects in melanoma, the four metastatic melanoma cell lines and primary

melanocytes were cultured in the presence of Sunitinib (1–50 μmol l⁻¹) for 24 hr at 37°C. The four analyzed cell lines showed different rates of growth inhibition, as assessed by MTT assay, when exposed to Sunitinib (Fig. 2a). Although M16 and M17 cells showed a decrease of 40 and 26% of cell viability, respectively, at a dose of 5 μM of Sunitinib, M28, JG cell lines and melanocytes were largely refractory to Sunitinib treatment. Alternatively, proliferation of melanoma cell lines was analyzed by BrdU incorporation assay. Sunitinib (5 μM) significantly reduced BrdU incorporation in M16 and M17 cells, but not in M28 or JG cells (Fig. 2b). Furthermore, Sunitinib induced a net blockade of cell cycle at the G1 phase (Fig. 2c) in M16 and M17 cells, while JG and M28 cell cycle was almost not affected by Sunitinib treatment. Interestingly, Sunitinib treatment induced apoptotic cell death, only in M16 cell line. A time course treatment with Sunitinib showed a cleavage of both initiator caspase 9 and executioner caspase 3 in M16 cell line but not in M17, JG or M28 cells (Fig. 2d).

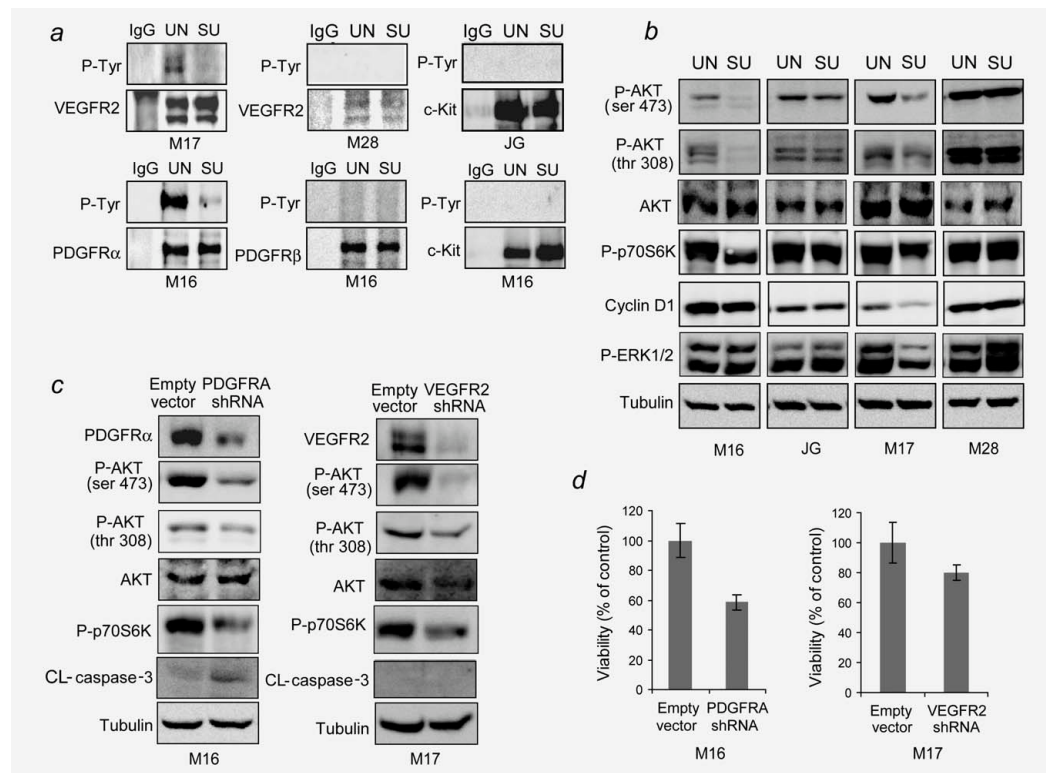


Figure 3. Sunitinib suppresses VEGFR2 and PDGFR α phosphorylation in M17 and M16 cell lines, respectively, and their downstream signaling pathways. (a) M16 and M17 cell lines were treated with 5 μ M of Sunitinib for 24 hr. Subsequently, VEGFR2 was immunoprecipitated from M17 cells and M28 cells, and c-kit was immunoprecipitated from JG cells while M16 cell lysates were immunoprecipitated with c-kit, PDGFR α and PDGFR β antibodies. RTK phosphorylation was assessed using phosphotyrosine antibody. (b) The four cell lines were treated with 5 μ M/l Sunitinib for 24 hr, and cell lysates were subjected to Western blot. (c) M16 and M17 cells were infected with the lentiviral vector carrying shRNA for PDGFR α and VEGFR2, respectively. Seventy-two hours postinfection, cells lysates were analyzed by Western blot. (d) Viability of M16 and M17 cells harboring PDGFR α and VEGFR2 shRNA, respectively, was assessed by MTT analysis.

Moreover, lower doses of Sunitinib (0.5 μ M) were able to induce a reduction of 60% in the number of colonies in both M16 and M17 cell lines (Supporting Information Fig. 2).

Sunitinib inhibits VEGFR2 and PDGFR α signaling pathways in M17 and M16 cells lines, respectively

To investigate the mechanism through which Sunitinib induces cell-growth arrest, we next checked for the phosphorylation status of the RTK in the four metastatic melanoma cell lines. Cell lysates from M17 and M28 were immunoprecipitated with anti-VEGFR2 while M16 cell lysates were immunoprecipitated either with anti-c-kit, anti-PDGFR β or anti-PDGFR α antibodies, and the phosphorylation status of each receptor was determined by Western blot using antiphosphotyrosine antibody. As shown in Figure 3a, M17, but not

M28, cells presented a basally phosphorylated VEGFR2 receptor, while in M16 cells, PDGFR α , but not c-kit nor PDGFR β , was basally phosphorylated. Of note, a 24-hr treatment with Sunitinib (5 μ M) completely abolished both VEGFR2 and PDGFR α phosphorylation in M17 and M16 cells, respectively. Immunoprecipitation of cell lysates from JG cells with anti-c-kit antibody revealed the absence of a basal phosphorylation of c-kit (Fig. 3a).

Furthermore, in M16 and M17 cell lines, Sunitinib inhibited Akt phosphorylation in its two residues (Thr 308 and Ser 473), suppressed the phosphorylation of ribosomal protein p70S6KSer240/244 (which is phosphorylated by mTOR) and downregulated the levels of cyclin D1 (a direct target of Akt/mTOR pathway) correlating with the cell-cycle arrest induced by Sunitinib in these two cell lines (Fig. 3b). Of

note, Sunitinib had no effect on phospho-Akt, P-p70S6K or cyclin D1 levels in Sunitinib-insensitive cell lines, *i.e.*, JG and M28 cells. Sunitinib partially inactivated ERK in M17 but not M16 cell line, suggesting that the MAPK pathway remains turned on in M16 cell line when treated with Sunitinib. As expected, treatment of M28 and JG cell lines with Sunitinib did not affect ERK activity, as detected by western blotting using phospho-ERK antibody (Fig. 3*b*). Given that ERK activation is maintained in M16 cell line despite the blockade of RTK, we thought that this could be due to a mutation of an upstream gene in the MAPK kinase cascade that would continuously stimulate this pathway. As BRAF is an upstream regulator of ERK signaling and activating mutations of BRAF are highly prevalent in melanoma, we thus checked for the BRAF mutation status in both M16 and M17 cell lines. The most common BRAF mutation is V600E and consists of a valine-to-glutamate transversion in exon 15 at residue 600 facilitating thus ATP binding.³⁰ Analysis of BRAF exon 15 by direct sequencing revealed a V600E mutation in M16, but not M17 cell line. Thus, the BRAF V600E mutation in M16 cell line maintains the ERK pathway active despite the complete inactivation of PDGFR α by Sunitinib. Taken together, these results suggested that the sensitivity of melanoma cells to Sunitinib correlates with the presence of an activated RTK and a concomitant inhibition of PI3K/Akt/mTOR, while the inhibition of ERK signaling by Sunitinib depends on the mutational status of BRAF gene.

Knockdown of PDGFR α and VEGFR2 by shRNA mimics Sunitinib effects in the M16 and M17 cell line, respectively

Sunitinib is not specific for PDGFR α neither for VEGFR2; but we have shown that, in our cell lines M16 and M17, these proteins may be the targets of Sunitinib effects. To verify that VEGFR2 or PDGFR α are indeed the targets, we compared the effects of Sunitinib in these cell lines with those obtained after knockdown of PDGFR α or VEGFR2 by short hairpin RNA (shRNA). M16 and M17 cell lines were infected with lentiviruses carrying shRNA against PDGFR α or VEGFR2, respectively. Lentiviral delivery of shRNA against PDGFR α and VEGFR2 selectively blocked the expression of each protein (Fig. 3*c*). PDGFR α and VEGFR2 knockdown induced a decrease of 41.4% and 19.97% in cell viability in M16 and M17 cell lines, respectively (Fig. 3*d*). Furthermore, PDGFR α and VEGFR2 knockdown, in M16 and M17, respectively, reduced Akt/mTOR signaling as assessed by a decrease of the phosphorylation of Akt at serine 473 and threonine 308 residues and an inhibition of the phosphorylation of ribosomal protein p-70S6K. Of note, the activation of the apoptotic machinery, as assessed by caspase 3 cleavage, was only observed in M16 cell line (Fig. 3*c*). These findings suggest that specific inhibition of PDGFR α and VEGFR2 in M16 and M17 cell lines, respectively, suppresses cell growth. Altogether, these data indicate that melanoma cells harboring an activated RTK may be susceptible to Sunitinib inhibition.

Bortezomib interacts synergistically with Sunitinib and induces an increase of cell death in Sunitinib-sensitive melanoma cell lines

To determine the effect on melanoma cells of the combination of Sunitinib and the proteasome inhibitor Bortezomib, the four cell lines were treated with Sunitinib (5 μ M), Bortezomib (25 nM) or a combination of both drugs for 24 hr. Subsequently, nuclei displaying apoptotic morphology were quantified by Hoechst staining. Treatment of M16 with single-agent Sunitinib or Bortezomib induced an increase in the apoptotic rate of 9.5% and 6.6%, respectively, compared to the control, whereas combined exposure yielded 35.5% of apoptotic cells (Fig. 4*a*). Similar results were observed in M17 cell line, where the values were as follows: Sunitinib (5 μ M) 0.96%, Bortezomib (25 nM) 3.1% and Sunitinib + Bortezomib 12.1% of apoptotic cells. This synergistic increase in cell death could also be reproduced by 18 hr pretreatment with Bortezomib (25 nM), followed by additional 6 hr incubation with Sunitinib (5 μ M) in M16 (Supporting Information Fig. 3), but not M17 cells. Interestingly, this sensitization to cell death in M16 cell line was not observed with Sunitinib pretreatment followed by Bortezomib stimulation. On the other hand, Bortezomib and Sunitinib combined treatment failed to increase the apoptotic rate, in comparison with single treatment, in Sunitinib-resistant cell lines, *i.e.*, JG and M28 cells.

Comparable results were obtained in M16 and M17 cell lines, when apoptosis was assessed by Western blot analysis (Fig. 4*b*). Combined exposure of either M16 or M17 cell line to Bortezomib and Sunitinib induced a clear increase in caspase 3 activation, compared to single treatment. To further explore the interaction between Bortezomib and Sunitinib, M16 and M17 cells were treated with increasing concentrations of Bortezomib (5–50 nmol/l), Sunitinib (1–10 μ mol/l) or combined at a fixed ratio (1/200). Figure 4*c* shows a clear decrease in cell viability when both drugs are combined, which indicates a relevant interaction. Median dose effect analysis was determined using MTT assay. Combination index (CI)/fractional effect plots show the CI values *versus* the fraction of cells affected by Sunitinib + Bortezomib combined treatment. CI values obtained were significantly lower than 1 over all doses, corresponding to a synergistic interaction (Fig. 4*d*). Table S1 (Supporting Information) shows potential values of CI achieved in a range of different doses of Bortezomib and Sunitinib and the related fraction affected. Interestingly, two other metastatic melanoma cell lines, M13 and M14, showed a synergistic interaction when treated with the combination of both drugs used at higher doses (Supporting Information Fig. 4).

The combination of PI3K/Akt inhibitor LY and Bortezomib induces a synergistic increase in cell death

To determine the contribution of Akt kinase activity inhibition in mediating the synergic effect induced by the combination of Sunitinib and Bortezomib treatment, M16 and M17

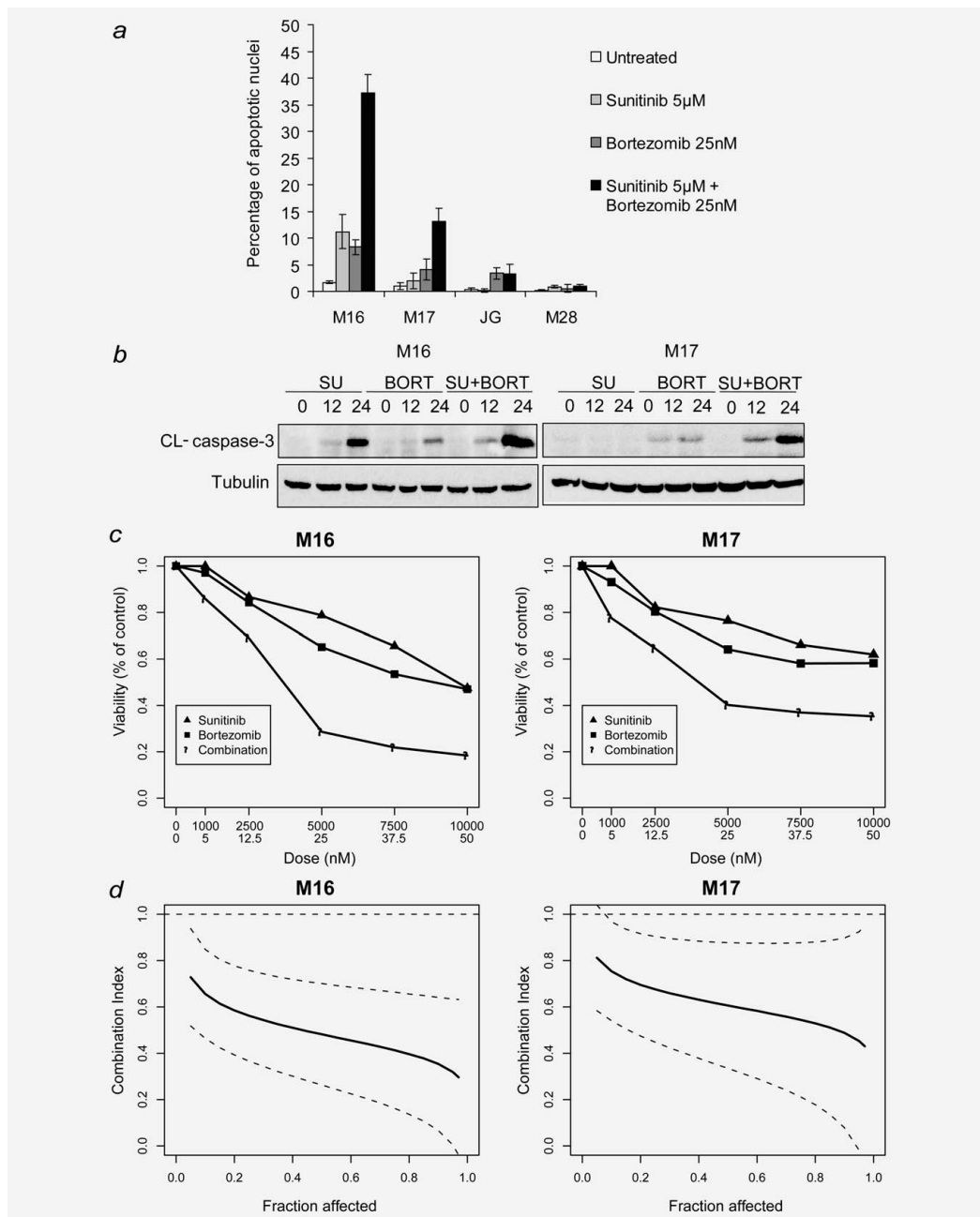


Figure 4. Combined Sunitinib and Bortezomib treatment results in a synergistic increase of cell death in Sunitinib sensitive cells. (a) Melanoma cells were treated with Sunitinib (5 µmol/L), Bortezomib (25 nmol/L) or both for 24 hr, and the percentage of apoptotic cells was quantified by Hoechst staining. (b) M16 and M17 cell lines were treated with Sunitinib, Bortezomib or their combination and cell lysates were subjected to Western blot. (c) Cell viability (%) of M16 and M17 cells treated with Sunitinib, Bortezomib or both. Each point represents the mean of three independent experiments ($n = 3$), performed in triplicate. Both drugs doses are indicated. (d) Combination index obtained for different fractions affected. Dotted lines indicate CI \pm standard deviation, which are computed using Monte Carlo simulations.

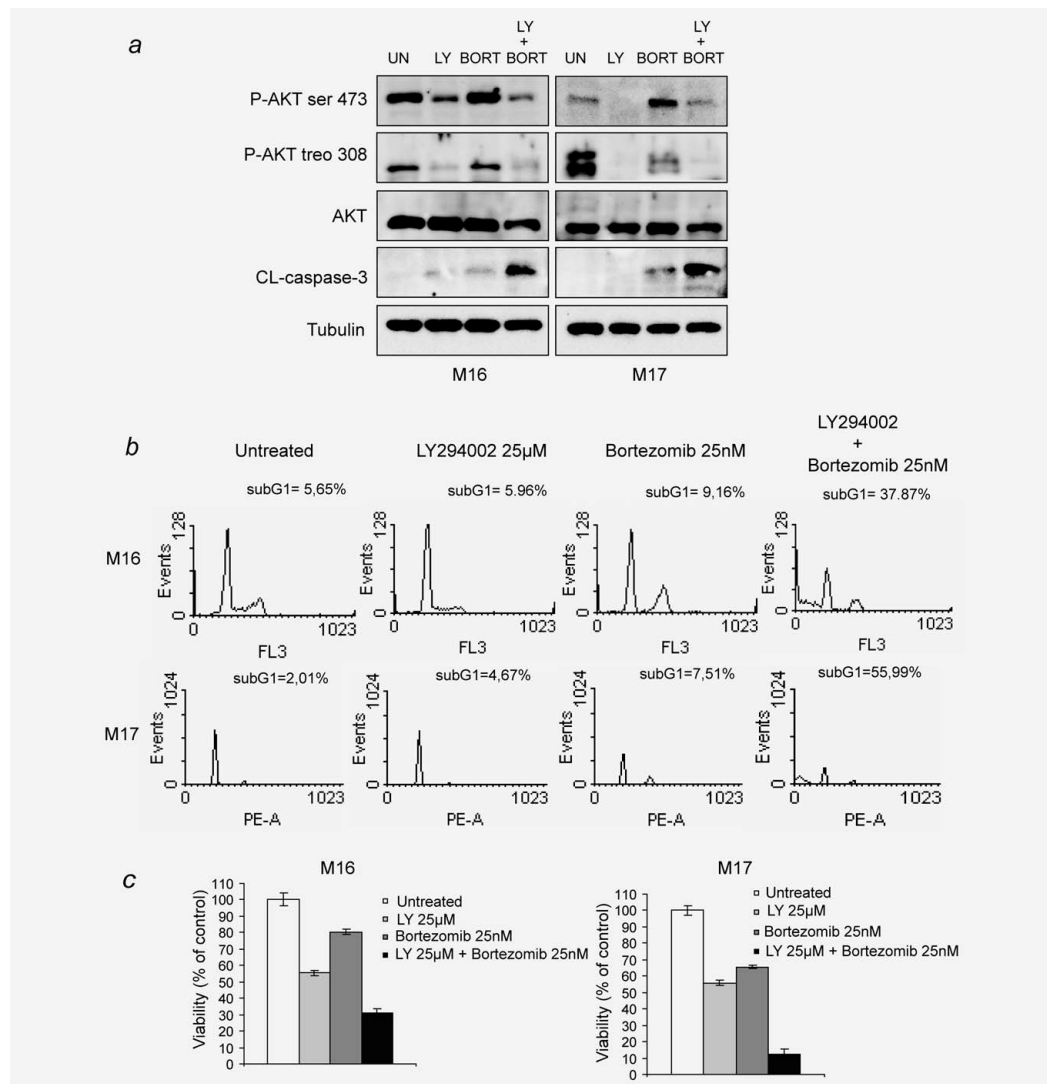


Figure 5. Akt pathway inhibitor LY294002 potently synergizes cell death induced by Bortezomib. (a) Western blot analysis of cell lysates from M16 and M17 metastatic melanoma cell lines treated with LY (25 µM), Bortezomib (25 nM) or both for 24 hr. Levels of P-AKT (ser 473), P-AKT (thr 308), AKT and cleaved-caspase-3 were determined. Tubulin was used as a loading control. (b) Cell-cycle distribution and subG1 content of M16 and M17 cells after 24 hr treatment with DMSO as control, LY 294002 (25 µM), Bortezomib (25 nM) or combination of both drugs. (c) Cell viability of M16 and M17 cells treated with LY (25 µM), Bortezomib (25 nM) or both was assessed by MTT. Results are expressed as percent of the control values.

cells were either treated with the PI3K inhibitor LY294002 (25 µM), Bortezomib (25 nM) or both for 24 hr. The PI3K inhibitor LY294002 inhibited Akt phosphorylation (Thr308 and Ser 273; Fig. 5a). Exposure of M16 and M17 cells to the

combination of LY and Bortezomib resulted in an increase of caspase-3 processing (Fig. 5a) and a dramatic increase of the sub-G1 fraction when compared with single drug-treatment conditions (Fig. 5b). Cell-growth analysis (MTT) confirms

the synergy achieved by Bortezomib treatment and PI3K/Akt blockade (Fig. 5c). Altogether, these results suggested that the synergistic effect on cell growth between Sunitinib and Bortezomib in melanoma cells was achieved through the Akt-dependent pathway.

Discussion

RTK activity has been implicated in multiple cell functions such as survival, migration and angiogenesis.³¹ In this study, we report the expression of RTK in melanoma biopsies and in four metastatic melanoma cell lines. Our results also show that melanoma cells present different grades of sensitivity to RTK inhibitor Sunitinib, while viability of normal melanocytes is not affected (Fig. 1a), suggesting that, in the absence of ligands, which could potentially activate the RTK present in normal melanocytes, the action of this drug is restricted to malignant cells. Sunitinib induces a cell-cycle arrest at the G1 phase in M16 and M17 cells and is an apoptotic inducer only in M16 cells, suggesting that it inactivates a pathway essential for the survival of M16 cells. Sensitivity to Sunitinib correlated with the phosphorylation status of the target RTK present on melanoma cell surface. Sunitinib inactivates the Akt/mTOR pathway only in melanoma cells that harbor an activated RTK, *i.e.*, M16 and M17 cells. This result is in agreement with other reports demonstrating Sunitinib induced growth arrest of cancer cells through a blockade of the Akt/mTOR pathway.^{31,32} Surprisingly, Sunitinib treatment abrogated the activation of the MAPK/ERK pathway in M17 cell line, but not in M16 cell line. As in human tumors, ERK activation occurs as a result of RTK activation or mutations in members of the RAS and RAF gene families^{34,35} and that activating mutations of BRAF are frequently observed in melanoma,³⁰ we next examined the status of BRAF in M16 and M17 cells. We show that M16, but not M17 cells, harbor oncogenic BRAF, resulting in unchanged phospho-ERK 1/2 signaling after Sunitinib treatment. We next evaluated the phosphorylation status of Akt/mTOR pathway by blocking Sunitinib target receptors, using lentiviral vectors carrying shRNA against PDGFR α and VEGFR2 in M16 and M17 cells, respectively. Both PDGFR α and VEGFR knockdown in M16 and M17 cell lines mimicked the effects obtained by Sunitinib treatment, *i.e.*, a reduced cell growth, a blockade of the Akt/mTOR pathway, downregulation of cyclin D1 in both cell lines and the induction of apoptosis only in M16 cell line. Thus, PI3K pathway contributes in promoting survival and proliferation elicited by activated RTK in metastatic melanoma cells.

In the two Sunitinib-sensitive melanoma cell lines, the activation of either PDGFR α or VEGFR2 mediated cell growth. Gene amplification, activating mutations or an autocrine loop generated between the ligand and its corresponding RTK may explain the basal phosphorylation of VEGFR2 and PDGFR α in M17 and M16 cell lines, respectively. VEGFR2 expression has been shown to be restricted to malignant cells of melanocytic lineage,^{11,13} and an overproduc-

tion of VEGF concomitantly expressed with its receptors has been shown to mediate the growth of melanoma cells through an autocrine loop mechanism.^{36,37} As for PDGFR α , it is overexpressed in a quite important number of malignant melanomas^{11,13,38} where it may also function as an autocrine growth factor.¹² A recent study reported the lack of mutations of PDGFR α in primary melanoma in the common mutation sites of PDGFR α , *i.e.*, exons 10, 12, 14 and 18.³⁸ This result does not exclude the possibility of mutation in other exons or the presence of genomic amplification in PDGFR α gene in metastatic melanoma.

We next checked whether targeting simultaneously the RTK pathway and the ubiquitin-proteasome pathway would enhance the growth inhibitory effects obtained by Sunitinib. Of note, cotreatment with Sunitinib and Bortezomib induced a synergistic decrease of cell viability and an increase of apoptotic cell death in Sunitinib sensitive cell lines, *i.e.*, M17 and M16. Moreover, Bortezomib pretreatment was able to enhance cell death induced by Sunitinib in M16 cell line, suggesting that proteasome inhibition sensitizes M16 cells to the apoptotic action of Sunitinib (Supporting Information Fig. 2). In a recent study, Bortezomib has been shown to increase the antitumor effects of Interferon-alpha,³⁹ suggesting that proteasome inhibition may be a good strategy to increase the antitumor effects of cytokines or drugs. The difference in the sensitivity to Bortezomib pretreatment of M16 and M17 cell lines indicates that proteasome inhibition could prime differently melanoma cells. Furthermore, the PI3K inhibitor (LY294002) mimicked Sunitinib effects as the cotreatment of M16 or M17 cells with LY294002 and Bortezomib yielded similar synergistic response. Our results are consistent with other reports where Akt was found responsible of the synergistic cytotoxicity when Bortezomib is combined with other RTK inhibitors, such as Sorafenib,²³ EGFR inhibitors⁴⁰ and lonafarnib,⁴¹ and support a crucial role of PI3K/Akt in mediating synergistic cytotoxicity between Sunitinib and Bortezomib.

In conclusion, this work demonstrates that activated PDGFR α or VEGFR2 can be considered therapeutic targets and predictors of sensitivity to Sunitinib in metastatic malignant melanoma. Proteome profiler arrays, used to assess the RTK activation profile in tumor specimens, could be used in the future to predict the outcome of Sunitinib treatment. Moreover, combinatory therapy using Sunitinib and Bortezomib induces a synergistic effect, in Sunitinib sensitive melanoma cells, through suppression of the Akt pathway. Thus, the combination of Sunitinib and Bortezomib may represent a promising novel treatment strategy for certain cases of disseminated melanoma.

Acknowledgements

A.Y. holds a postdoctoral fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia (Programa Juan de la Cierva). A.S. is recipient of a predoctoral fellowship from Fundación Científica AECC, Catalunya contra el Cancer, Lleida. X.D. holds a postdoctoral fellowship from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo (CP05/00028).

References

- Ibrahim N, Haluska FG. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annu Rev Pathol* 2009;4: 551–79.
- Garrido MC, Bastian BC. KIT as a therapeutic target in melanoma. *J Invest Dermatol* 2010;130:20–7.
- Woodman SE, Davies MA. Targeting KIT in melanoma: a paradigm of molecular medicine and targeted therapeutics. *Biochem Pharmacol* 2010;80:568–74.
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363:809–19.
- Tawbi H, Nimmagadda N. Targeted therapy in melanoma. *Biologics* 2009;3: 475–84.
- Smalley KS. Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. *J Invest Dermatol* 2010;130:28–37.
- Hocker TL, Singh MK, Tsao H. Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *J Invest Dermatol* 2008;128: 2575–95.
- Pawson T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 2004;116:191–203.
- Brychtova S, Bezdekova M, Brychta T, Tichy M. The role of vascular endothelial growth factors and their receptors in malignant melanomas. *Neoplasma* 2008;55: 273–9.
- Graeven U, Fiedler W, Karpinski S, Ergun S, Kilic N, Rodeck U, Schmiegel W, Hossfeld DK. Melanoma-associated expression of vascular endothelial growth factor and its receptors FLT-1 and KDR. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:621–9.
- Shen SS, Zhang PS, Eton O, Prieto VG. Analysis of protein tyrosine kinase expression in melanocytic lesions by tissue array. *J Cutan Pathol* 2003;30:539–47.
- Barnhill RL, Xiao M, Graves D, Antoniades HN. Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-A, PDGF-B and the PDGF- α receptor, but not the PDGF- β receptor, in human malignant melanoma in vivo. *Br J Dermatol* 1996;135:898–904.
- Alexis JB, Martinez AE, Lutzky J. An immunohistochemical evaluation of c-kit (CD-117) expression in malignant melanoma, and results of imatinib mesylate (Gleevec) therapy in three patients. *Melanoma Res* 2005;15:283–5.
- Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai T, Lee LB, Murray LJ, Carver J, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003;9:327–37.
- Atkins M, Jones CA, Kirkpatrick P. Sunitinib maleate. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:279–80.
- Ludwig H, Khayat D, Giaccone G, Facon T. Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies. *Cancer* 2005;104: 1794–807.
- Sorolla A, Yeramian A, Dolcet X, Perez de Santos AM, Llobet D, Schoenenberger JA, Casanova JM, Soria X, Egido R, Llombart A, Vilella R, Matias-Guiu X, et al. Effect of proteasome inhibitors on proliferation and apoptosis of human cutaneous melanoma-derived cell lines. *Br J Dermatol* 2008;158: 496–504.
- Fernandez Y, Verhaegen M, Miller TP, Rush JL, Steiner P, Opiari AW Jr, Lowe SW, Soengas MS. Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res* 2005; 65:6294–304.
- Qin JZ, Ziffra J, Stennett L, Bodner B, Bonish BK, Chaturvedi V, Bennett F, Pollock PM, Trent JM, Hendrix MJ, Rizzo P, Miele L, et al. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res* 2005;65:6282–93.
- Markovic SN, Geyer SM, Dawkins F, Sharfman W, Albertini M, Maples W, Fracasso PM, Fitch T, Lorusso P, Adjei AA, Erlichman C. A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Cancer* 2005;103: 2584–9.
- Amiri KI, Horton LW, LaFleur BJ, Sosman JA, Richmond A. Augmenting chemosensitivity of malignant melanoma tumors via proteasome inhibition: implication for bortezomib (VELCADE, PS-341) as a therapeutic agent for malignant melanoma. *Cancer Res* 2004;64: 4912–8.
- Mlynarczuk-Bialy I, Roeckmann H, Kuckelkorn U, Schmidt B, Umbreen S, Golab J, Ludwig A, Montag C, Wiebusch L, Hagemeyer C, Schadendorf D, Kloetzl PM, et al. Combined effect of proteasome and calpain inhibition on cisplatin-resistant human melanoma cells. *Cancer Res* 2006; 66:7598–605.
- Yu C, Friday BB, Lai JP, Yang L, Sarkaria J, Kay NE, Carter CA, Roberts LR, Kaufmann SH, Adjei AA. Cytotoxic synergy between the multikinase inhibitor sorafenib and the proteasome inhibitor bortezomib in vitro: induction of apoptosis through Akt and c-Jun NH2-terminal kinase pathways. *Mol Cancer Ther* 2006;5: 2378–87.
- An J, Rettig MB. Epidermal growth factor receptor inhibition sensitizes renal cell carcinoma cells to the cytotoxic effects of bortezomib. *Mol Cancer Ther* 2007;6: 61–9.
- Gatto S, Scappini B, Pham L, Onida F, Milella M, Ball G, Ricci C, Divoky V, Verstovsek S, Kantarjian HM, Keating MJ, Cortes-Franco JE, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth and induces apoptosis in Bcr/Abl-positive cell lines sensitive and resistant to imatinib mesylate. *Haematologica* 2003;88:853–63.
- Mayorga ME, Sanchis D, Perez de Santos AM, Velasco A, Dolcet X, Casanova JM, Baradad M, Egido R, Pallares J, Espurz N, Benitez D, Mila J, et al. Antiproliferative effect of STI571 on cultured human cutaneous melanoma-derived cell lines. *Melanoma Res* 2006;16:127–35.
- Pallares J, Martinez-Guitarte JL, Dolcet X, Llobet D, Rue M, Palacios J, Prat J, Matias-Guiu X. Abnormalities in the NF- κ B family and related proteins in endometrial carcinoma. *J Pathol* 2004;204:569–77.
- Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984;22: 27–55.
- Adjei AA, Davis JN, Bruzek LM, Erlichman C, Kaufmann SH. Synergy of the protein farnesyltransferase inhibitor SCH66336 and cisplatin in human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2001;7: 1438–45.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949–54.
- Radisavljevic Z. Locus of fragility in robust breast cancer system. *J Cell Biochem* 2004; 92:1020–4.
- Ikezoe T, Nishioka C, Tasaka T, Yang Y, Komatsu N, Togitani K, Koeffler HP, Taguchi H. The antitumor effects of sunitinib (formerly SU11248) against a variety of human hematologic malignancies: enhancement of growth inhibition via inhibition of mammalian target of rapamycin signaling. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2522–30.
- Ikezoe T, Yang Y, Nishioka C, Bandobashi K, Nakatani H, Taguchi T, Koeffler HP, Taguchi H. Effect of SU11248 on gastrointestinal stromal tumor-T1 cells:

- enhancement of growth inhibition via inhibition of 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling. *Cancer Sci* 2006;97:945–51.
34. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:180–6.
 35. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 1999; 18:813–22.
 36. Graells J, Vinyals A, Figueras A, Llorens A, Moreno A, Marcoval J, Gonzalez FJ, Fabra A. Overproduction of VEGF concomitantly expressed with its receptors promotes growth and survival of melanoma cells through MAPK and PI3K signaling. *J Invest Dermatol* 2004;123: 1151–61.
 37. Kim KB, Eton O, Davis DW, Frazier ML, McConkey DJ, Diwan AH, Papadopoulos NE, Bedikian AY, Camacho LH, Ross MI, Cormier JN, Gershenwald JE, et al. Phase II trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma. *Br J Cancer* 2008;99:734–40.
 38. Curtin JA, Pinkel D, Bastian BC. Absence of PDGFRA mutations in primary melanoma. *J Invest Dermatol* 2008;128: 488–9.
 39. Lesinski GB, Benninger K, Kreiner M, Quimper M, Young G, Carson WE, III. Bortezomib pre-treatment prolongs interferon- α -induced STAT1 phosphorylation in melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58: 2031–7.
 40. Cascone T, Morelli MP, Morgillo F, Kim WY, Rodolico G, Pepe S, Tortora G, Berrino L, Lee HY, Heymach JV, Ciardiello F. Synergistic anti-proliferative and pro-apoptotic activity of combined therapy with bortezomib, a proteasome inhibitor, with anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) drugs in human cancer cells. *J Cell Physiol* 2008;216:698–707.
 41. David E, Sun SY, Waller EK, Chen J, Khuri FR, Lonial S. The combination of the farnesyl transferase inhibitor lonafarnib and the proteasome inhibitor bortezomib induces synergistic apoptosis in human myeloma cells that is associated with down-regulation of p-AKT. *Blood* 2005; 106:4322–9.

ARTICLE 4.

4. Blockade of NFκB activity results in an increase of cell death in Bortezomib-treated endometrial carcinoma cells.

4. El bloqueig de la via NFκB resulta en un increment de la mort cel·lular en les línies cel·lulars de carcinoma d'endometri tractades amb Bortezomib.

4.1 Sunitinib redueix el creixement *in vitro* de les línies cel·lulars de carcinoma d'endometri.

4.2 Sunitinib no actua a través de les dianes més conegudes en les línies cel·lulars de carcinoma d'endometri.

4.3 Sunitinib bloqueja tant la via NFκB basal com la induïda per diferents factors.

4.4 El tractament combinat de Sunitinib i Bortezomib resulta en un efecte sinèrgic de mort cel·lular.

4.5 La inhibició de la NFκB mitjançant shRNA de p65 potencia els efectes citotòxics de Bortezomib, mimetitzant els efectes de Sunitinib en la via NFκB.

Manuscript Number:

Title: Blockade of NFκB activity increases cell death in Bortezomib-treated endometrial carcinoma cells

Article Type: Research Paper

Keywords: Sunitinib; Bortezomib; NFκB; synergy; endometrial carcinoma

Corresponding Author: Dr. Xavier Matias-Guiu, Dr.

Corresponding Author's Institution: Department of Pathology and Molecular Genetics, IRBLleida

First Author: Anabel Sorolla

Order of Authors: Anabel Sorolla; Andree Yeramian, Dr.; Xavier Dolcet, Dr.; Laura Bergada; Joan Valls, Dr.; Rosa M. Marti, Dr.; Xavier Matias-Guiu, Dr.

Abstract: Endometrial carcinoma is one of the most common malignancies in the female genital tract, usually treated by surgery and radiotherapy. Chemotherapy is used when endometrial carcinoma is associated with widespread metastasis or when the tumor recurs after radiation therapy. In the present study, we demonstrate that the tyrosine kinase receptor inhibitor Sunitinib reduces cell viability, proliferation, clonogenicity and induces apoptotic cell death in endometrial carcinoma cell lines, which is not due to its action through the most known targets such EGF. Interestingly, Sunitinib reduces basal NFκB transcriptional activity or induced by EGF or TNF-α. We observed that Sunitinib was able to inhibit the Bortezomib-induced NFκB transcriptional activity which correlates with a decrease of the phosphorylated levels of IKKα and β, p65 and IκBα. We evaluated the nature of the interaction between Sunitinib and Bortezomib by the dose effect method and identified a synergistic effect (combination index < 1). Analogously, silencing of p65 expression by lentiviral-mediated short-hairpin RNA delivery in Bortezomib treated cells lead to a strongly increased sensitivity to Bortezomib apoptotic cell death. Altogether our results suggest that the combination of Sunitinib and Bortezomib could be considered a promising treatment for endometrial carcinoma after failure of surgery and radiation.

TITLE PAGE

Blockade of NFκB activity increases cell death in Bortezomib-treated endometrial carcinoma cells

Anabel Sorolla^{1*}, Andrée Yeramian^{1*}, Xavier Dolcet¹, Joan Valls², Laura Bergadà¹, Llombart-Cussac A3, Rosa Maria Martí^{4ξ}, Xavier Matias-Guiu^{1ξ}

¹Pathology Group, Department of Pathology and Molecular Genetics, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRB-Lleida, Lleida, Spain

²Biostatistics Unit, Hospital Univesitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRB-Lleida, Spain

³Department of Oncology, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRB-Lleida, Spain

⁴Department of Dermatology, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRB-Lleida, Lleida, Spain

*These authors are first authors

ξThese authors are senior authors

Corresponding author: Dr. Xavier Matias-Guiu. Pathology Group,

Address: Department of Pathology and Molecular Genetics, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, 1st floor, 80 Avinguda Alcalde Rovira Roure, Lleida 25198, Spain.

Fax: 973 70 22 01

Email: fjmatias.lleida.ics@gencat.cat

Key words: NFκB, Sunitinib, Bortezomib, endometrial carcinoma

Abbreviations: TNF, tumor necrosis factor; shRNA, short hairpin RNA; CI, combination index; RTK, receptor tyrosine kinase

ABSTRACT

Endometrial carcinoma is one of the most common malignancies in the female genital tract, usually treated by surgery and radiotherapy. Chemotherapy is used when endometrial carcinoma is associated with widespread metastasis or when the tumor recurs after radiation therapy. In the present study, we demonstrate that the tyrosine kinase receptor inhibitor Sunitinib reduces cell viability, proliferation, clonogenicity and induces apoptotic cell death in endometrial carcinoma cell lines, which is not due to its action through the most known targets like VEGFR. Neither through EGFR as demonstrated in this work. Interestingly, Sunitinib reduces NF κ B transcriptional activity either at basal level or activation by EGF or TNF- α . Moreover, we observed that Sunitinib was able to inhibit the Bortezomib-induced NF κ B transcriptional activity which correlates with a decrease of the phosphorylated levels of IKK α and β , p65 and I κ B α . We evaluated the nature of the interaction between Sunitinib and Bortezomib by the dose effect method and identified a synergistic effect (combination index < 1). Analogously, silencing of p65 expression by lentiviral-mediated short-hairpin RNA delivery in Bortezomib treated cells lead to a strongly increased sensitivity to Bortezomib apoptotic cell death. Altogether our results suggest that the combination of Sunitinib and Bortezomib could be considered a promising treatment for endometrial carcinoma after failure of surgery and radiation.

INTRODUCTION

Endometrial carcinoma is one of the most common malignancies in the female genital tract, responsible for one third of deaths related to gynecologic cancers¹. The early stage of endometrial carcinomas are treated by surgery and radiation and the advanced stage has a very poor prognosis². During the past years, many efforts have been undertaken to understand the biology of endometrial carcinoma. Endometrial carcinoma can be divided into two clinicopathological variants, type I and type II³, endometrioid and non-endometrioid endometrial carcinoma. Despite this knowledge, the pharmacological treatment of advanced endometrial carcinoma still remains treated with progesterone⁴ and the combined regimen of doxorubicin and cisplatin^{5, 6}. Often, treatments fail due to the emergence of chemoresistance and new other therapeutic options are very limited⁶. Therefore, further investigations are needed to better understand the signal transduction pathways dysregulated in endometrial carcinoma. This will lead to the identification of novel therapeutic targets that could improve patient's prognosis and treatment outcomes.

It is well known that the NFκB pathway is constitutively activated in many cancers^{7,8}, including endometrial carcinoma⁹. This pathway controls several critical processes such as cell growth, differentiation and apoptosis⁸ and its dysregulation can induce cell transformation. NFκB inhibitors can act on different levels, for example by inhibiting IKKs¹⁰, or preventing the degradation of IκBα by impairing the ubiquitin proteasome pathway. A well described inhibitor of the NFκB pathway is Bortezomib (Velcade[®], also known as PS-341; Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA), a dipeptidyl boronic acid that reversibly inhibits the chymotrypsin like activity of the proteasome and is a well described drug for treating multiple myeloma^{11,12,13}. The ability of proteasome inhibitors to inhibit the NFκB pathway is controversial and conflicting results have been reported for Bortezomib. While proteasome inhibitors inhibit the NFκB pathway in some cancer types, the opposite effect has been demonstrated in various tumours, including endometrial carcinoma¹⁴, multiple myeloma¹⁵, gastrointestinal stromal tumor¹⁶ and in a colon adenocarcinoma cell line¹⁷, despite showing cytotoxic effects.

A recent study by Miller and colleagues¹⁸ revealed a list of known compounds capable of inhibiting NFκB activity, highlighting different means of blocking this pathway. One of the drugs tested was Sunitinib. Sunitinib (SU11248; Sutent[®], Pfizer, New York, NY) is an inhibitor of multiple tyrosine kinase receptors that potently inhibits c-kit, vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), platelet-derived growth factor receptor

(PDGFR) and to a lesser extent EGFR^{19, 20}. Recently, Sunitinib maleate has been approved by the FDA for the treatment of renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumors²¹. Moreover, Sunitinib is currently being tested in two different phase II studies of patients with recurrent and metastatic endometrial carcinoma, showing partial responses and stable disease in some cases [Welch S. and Correa R., unpublished].

A priori, the use of Sunitinib in endometrial carcinoma is rational due to the presence of several tyrosine kinase receptors and their ligands. Examples are both c-kit receptor and its ligand, stem cell factor (SCF), which are expressed in endometrial carcinoma²²⁻²⁵. VEGF showed high expression in endometrial tumor cells in comparison with normal endometria and the receptors VEGFR1, VEGFR-2 and VEGFR-3 have been shown to be expressed in the surrounding endothelial cells^{22, 26, 27}. As for the receptor PDGFR α , its expression has been demonstrated in endometrial carcinoma²². Finally, EGF receptor was also found to be expressed in this cancer²⁸

We have previously demonstrated a synergistic interaction between Bortezomib and Sunitinib in melanoma²⁹. In the present study, we first investigated the effects of Sunitinib in endometrial carcinoma cell lines and found that Sunitinib treatment lead to a decrease in proliferation and apoptotic cell death. Moreover, Sunitinib inhibited the NF κ B pathway, which was induced by different known stimulus such as TNF- α and EGF and even the induction of NF κ B by Bortezomib. Furthermore, we observed a synergistic interaction between Sunitinib and Bortezomib (CI<1) and postulate that this is mediated by the ability of Sunitinib to block the NF κ B pathway via the desphosphorylation of p65.

Our principal goal was to determine if the combined treatment of Sunitinib and Bortezomib could result in a more effective treatment of endometrial carcinoma. In particular, we investigated the ability of Sunitinib to inhibit the NF κ B pathway induced by Bortezomib, which was found to enhance the cell cytotoxicity. The results of this endeavour could provide essential information for the design of future preclinical and clinical studies in endometrial carcinoma.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures and treatment procedures. The Ishikawa 3-H-12 cell line (IK) was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). RL-95 and Hec-1A cells were provided by Dr. Reventos (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona). These endometrial carcinoma cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco, Barcelona, Spain), 20 mmol·L⁻¹ of L-glutamine and antibiotics at 37°C and 5% CO₂. The tyrosine kinase inhibitor and the proteasome inhibitor Bortezomib were dissolved in water at final concentrations of 25mM and 2,6mM respectively, and added to the complete media to the appropriate final concentrations. All treatments were carried out in complete media, performed in triplicate, and repeated at least three times.

Chemical reagents and antibodies. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), RNase A, propidium iodide, monoclonal antibody to tubulin and EGF were obtained from Sigma (St Louis, MO). The proteasome inhibitor Bortezomib was manufactured by Millennium Pharmaceuticals. The tyrosine inhibitor Sunitinib was kindly provided by Pfizer Inc. The EGFR inhibitor AG 1478 was from Merck (Darmstadt, Germany). Antibodies against cleaved caspase 3, PDGFR α , PDGFR β , VEGFR2, EGFR, EGFR-phosphotyrosine 1068, p65-phosphoserine 536, I κ B α -phosphoserine 32, phospho-p44/42 MAPK (ERK 1/2) and IKK α -phosphoserine 180/IKK β -phosphoserine 181 were manufactured by Cell Signaling (Beverly, MA, USA). Dako (Glostrup, Denmark) antibodies against c-kit and Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) antibodies against p65 were used.

Determination of cell viability and clonogenicity. Cell viability was determined by MTT assays. Endometrial carcinoma cell lines were plated on M96 well plates. After the corresponding treatments, cells were incubated for 45 min with 0.5 mg·mL⁻¹ of MTT reagent and lysed with DMSO. Absorbance was measured at 595 nm in a microplate reader (Bio-Rad, Richmond, CA, U.S.A.). For clonogenic assays, 10³ Ishikawa, 3·10³ Hec-1-A and 3·10³ RL-95-2 cells were seeded in 2 ml culture medium per well (6 well plate), left untreated or treated every two days with 0.1 μ M, 0.2 μ M, 0.5 μ M and 1 μ M of Sunitinib and Bortezomib 0.5nM, 1nM and 2nM. After 14 days of culture, colonies were visualized by MTT.

Determination of apoptosis. Apoptotic cells were identified by nuclear staining with bis-benzimide fluorescent dye (Hoechst 33258) that was added to the culture medium at a final concentration of 5µg/mL. Apoptotic nuclei were counted using a fluorescence microscope.

Western Blot analysis. Endometrial carcinoma cell lines were washed twice with cold PBS and lysed with lysis buffer (2% SDS, 125 mM Tris-HCl pH 6.8). Protein concentrations were determined with the Protein Assay Kit (Bio-Rad). Equal amounts of proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore, Bedford, MA). Non-specific binding was blocked by incubation with TBST (20 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) plus 5% of non-fat milk. Membranes were incubated with the primary antibodies overnight at 4°C. The signal was detected with ECL Advance (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK).

Lentiviral production and infection. In order to downregulate the protein expression, we infected endometrial carcinoma cells with lentivirus carrying for the shRNA of interest. Oligonucleotides to produce plasmid-based shRNA were cloned into the FSV vector using AgeI-BamHI restriction sites. shRNA target sequence to *p65* was 5'-ACACTGCCGAGCTCAAGATCT-3'. To produce infective lentiviral particles, 293T cells were co-transfected by PEI method with the virion packaging elements (VSV-G and D8.9) and the FSV on 293T human embryonic kidney. Supernatants were collected after 3 days, concentrated by centrifugation through a filter column of 100 KDa (VWR International LLC, West Chester, PE, USA) for 1 hour at 4000 rpm. Cells were incubated overnight in the presence of medium containing lentiviral particles. After this period, medium was replaced for fresh medium and cells were incubated for at least 72h to allow endogenous protein knockdown.

Detection of changes in cell cycle profiles. Changes in cell cycle profile after drug treatments were determined by propidium iodide (PI) staining and flow cytometry. Following treatment, approximately $1 \cdot 10^6$ cells were fixed in 70% ethanol for at least 1h on ice. The cells were then resuspended in 2mL of cell cycle buffer (20µg·mL⁻¹ propidium iodide, in PBS containing 0,1% Triton X-100 and 50µg·mL⁻¹ Rnase A) for 1h at 37°C. PI fluorescence emission was measured using a FACSCantoII (BD Biosciences, San

Jose, CA, U.S.A), and cell cycle distribution was analyzed with WinMDI 2.9 software (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, U.S.A.).

Luciferase assay. To determine changes in NF κ B transcriptional activity after different stimuli we performed a luciferase report assay. Endometrial carcinoma cell lines were plated in M24 multiwell plates and transfected using Lipofectamine 2000 following the manufacturer's instructions, with the reporter *NF κ B-LUC* construct together with a plasmid encoding *β -galactosidase*. After 16h, cells were treated as indicated in each experiment, lysed with 60 μ L of lysis buffer (25 mmols/L glycylglycine, pH 7.8, 15 mmols/L Mg₂SO₄, 1% Triton X-100, 5 mmols/L EGTA) and rocket on ice for 15 min. 25 μ L of lysates were transferred to M96 multiwell plates and 25 μ L of luciferase assay buffer was added to a final concentration of (25 mmol/L glycylglycine, 15 mmol/L KHPO₄, pH 7.8, 15 mmols/L Mg₂SO₄, 1% Triton X-100, 5 mmols/L EGTA, 1 mmol/L dithiothreitol containing 2mmol/L ATPm 100 mmol/L acetyl-coenzyme A, and 100 mmols/L luciferine). Luciferase was measured using a microplate luminometer. Subsequently, 60 μ L of 2x β -galactosidase buffer (200 mmol/L NaPO₄, 20 mmol/L KCl, 2 mmol/L Mg₂SO₄, 4mg/mL o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside) were added to each well and β -galactosidase activity was measured on a microplate reader at 415 nm.

Analysis of combined drug effects. The combining effect of Sunitinib and Bortezomib was assessed by the median effect method proposed by Chou and Talalay³⁰ using the CalcuSyn software (Biosoft, Oxford, United Kingdom). Sunitinib and Bortezomib were administered at the fixed ratio of 1/1000. This method determines the combination index (CI) between two drugs. CI above 1 indicates antagonism and CI below 1 indicates synergistic interaction between two drugs.

RESULTS

Sunitinib decreases the in vitro growth of endometrial carcinoma cell lines

Antitumoral effects of Sunitinib in endometrial carcinoma were determined by exposing the three endometrial carcinoma cell lines, Ishikawa (IK), RL-95-2 and Hec-1A to different concentrations of Sunitinib (0-40 $\mu\text{mol/L}$) for 24h, 48h and 72h. (figure 1a). The three endometrial carcinoma cells lines showed to be sensitive to Sunitinib, displaying a post-treatment viability of 39,8% (IK), 52,9% (RL-95-2) and 72.1% (Hec-1A) with 5 $\mu\text{mol/L}$ of Sunitinib at 72h. IC50 of Sunitinib at 72h are 4,59 μM (IK), 7,07 μM (RL-95-2) and 6,63 μM (Hec-1A). To assess changes in cell cycle profile after treatment, Sunitinib was administrated to IK, RL-95-2 and Hec-1A cells with a concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$ for 72h. A decrease in S phase and an increase in subG1 phase was observed for all the cell lines (Figure 1b). Moreover, apoptotic cell death was observed after 72h of Sunitinib treatment in IK, RL-95-2 and Hec-1A cells. (figure 1c), demonstrated by the cleavage of the executioner caspase 3. Interestingly, very low Sunitinib doses induced a significant reduction in the number of colonies in the IK, RL-95-2 and Hec-1A cells, supporting the cytotoxic effect of Sunitinib at more physiological concentrations (figure 1d).

Sunitinib does not act through the most known targets in endometrial carcinoma cell lines

To determine the existence of a possible target of Sunitinib in endometrial carcinoma, the expression of various known tyrosine kinase receptors, targets of Sunitinib, were analysed by Western Blot. As shown in figure 2a, the expression of c-kit, PDGFR α , PDGFR β , VEGFR2 and EGFR was measured for IK, RL-95-2 and Hec-1A cells. c-kit was found to be expressed only in IK cells and EGFR in all three endometrial carcinoma cell lines. In contrast, PDGFR α , PDGFR β or VEGFR2 could not be detected in any of the cell lines. As the only shared RTK among all cell lines was EGFR and they were shown to display a similar sensitivity to Sunitinib, we next analysed the tyrosine phosphorylation of EGFR in IK, RL-95-2 and Hec-1A cell lines after Sunitinib treatment. Stimulation with EGF induced a phosphorylation of EGFR. Interestingly, this phosphorylation was not abolished when Sunitinib (at 1 and 10 $\mu\text{mol/L}$) was added for 1 hour before EGF stimulation. Moreover, treatment with AG1478, a selective inhibitor of EGFR did not have any effect in cell viability (figure supplementary figure 1). With these results, we

conclude that the antitumoral effect of Sunitinib is not by inhibition of any of tyrosine kinase receptors.

Sunitinib blocks both basal and induced NFκB pathway

Sunitinib has a pleiotropic mechanism of action. Here, we observe that Sunitinib has no effect neither in MAPK nor in Akt pathway in Ishikawa cells. As shown in figure 3a, Sunitinib at 1μM or 10μM is not able to reduce neither the phosphorylation of ERK nor the phosphorylation of Akt in the residues needed for its fully activation (serine 473 and threonine 308). In a parallel experiment, we wanted to check the effects of Sunitinib on NFκB pathway. The ability of Sunitinib to modify the activation of the NFκB pathway was assessed by luciferase reporter assays and by Western Blot. Sunitinib alone, at 1μmol/L or 10μmol/L, reduced basal NFκB transcriptional activity by 48% and 78% respectively (Figure 3b and 3c). Sunitinib also decreased the basal phosphorylation of four components of the canonical/alternative NFκB pathway, namely IKKα and IKKβ, p65 and IκBα. (Figure 3d). In a further experiment, cell lines were treated with different putative NFκB activators such as EGF and TNF in the presence or absence of Sunitinib at 1μmol/L. As shown in figure 3b, EGF and TNF were potent inducers of NFκB pathway. Interestingly, Sunitinib treatment resulted in a reduced induction of the NFκB pathway activity, regardless of the used ligand. Furthermore, as described in a previous report, Bortezomib induces a clear activation of the NFκB pathway in endometrial carcinoma¹⁴, , which could be prevented by the joined treatment with Sunitinib (Figure 3c). Concordant results were observed when testing the phosphorylation status of NFκB proteins. (figure 3d). A loss of phosphorylation of IKKα and β, p65 and IκBα was observed in IK cells when Sunitinib was combined with Bortezomib at all examined timepoints, demonstrating the ability of Sunitinib to block Bortezomib-induced NFκB pathway.

The combined treatment with Sunitinib and Bortezomib results in a synergistic increase of cell death

Motivated by the results described above, we investigated if Sunitinib enhances the growth inhibitory effects of Bortezomib. To address this point, we carried out a median dose effect analysis, which was determined using the MTT assay. The concentrations used for Bortezomib and Sunitinib were 5-20 nmol/L and 5-20 μmol/L respectively in IK and RL-95-2 cells and 5-40 nmol/L and 5-40 μmol/L in Hec-1A cells. The drugs were

used alone or in combination with a fixed ratio of 1/1000. A clear decrease in cell viability was observed when both drugs were combined (Figure 4a), which indicates a relevant interaction. CI values in respect to the fraction of cells affected by Sunitinib+Bortezomib are plotted in figure 4b. In all three cell lines analysed, CI values are generally significantly below one, indicating a synergistic interaction of Sunitinib and Bortezomib of inducing cell death. In a similar experiment, using clonogenic assays, we observed a synergistic effect between both drugs administered at very low concentrations (Figure 4c).

The blockade of the canonical NFκB pathway by p65 shRNA potentiates the cytotoxic effects of Bortezomib, mimicking the effects of Sunitinib in NFκB pathway.

Afterwards, we decided to check if the synergism between Sunitinib and Bortezomib in endometrial carcinoma could be related to the inhibition of NFκB pathway by Sunitinib. To confirm such hypothesis, we blocked NFκB pathway by shRNA against p65, as simulating the effects of Sunitinib on NFκB pathway. Then, cells subjected to p65 knockdown were exposed to Bortezomib. Lentiviral delivery of shRNA against p65 selectively blocked the expression of the p65 gene product, its phosphorylation (figure 5b) and inhibited NFκB transcriptional activity (figure 5a). Cells with shRNA mediated downregulation of p65 displayed an increase of apoptosis when treated with Bortezomib at 10nmol/L and 25nmol/L as shown by caspase-3 processing (figure 5b). Similar results were obtained quantitatively by flow cytometry analysis (figure 5c) and Hoechst staining (figure 5d). After treatment with 10 nmols/L Bortezomib, we observed a considerable increase of the sub-G1 fraction, hallmark of cell death, in cells where p65 was downregulated when compared to the other conditions. Also when analysed with Hoechst staining, p65 downregulated cells displayed a net increase in apoptotic cell death compared to the remaining conditions. Moreover, the ability to form colonies was considerably diminished in the p65 downregulated cells after 2 nmol/L of Bortezomib treatment. Altogether, these results indicate, that the inhibition of NFκB pathway by Sunitinib could mediate the synergy between Sunitinib and Bortezomib in endometrial carcinoma.

DISCUSSION

Herein, we first demonstrate the ability of Sunitinib to reduce cell viability, cell proliferation and apoptosis in endometrial carcinoma. This is in agreement with earlier reports that described similar cytotoxic effects of Sunitinib in other cancer types^{29, 31-33}. Moreover, we show that Sunitinib has an antitumor effect at closer concentrations to those existing in human plasma, ranging from 0.1 μ M to 1 μ M in the clonogenic assay, demonstrating the antiproliferative ability of the drug at more physiological conditions. We further tested the expression of multiple Sunitinib targets receptors in endometrial carcinoma cell lines. The examined receptors were c-kit, VEGFR2, PDGFR and EGFR, which have been previously found to be expressed in endometrial carcinoma and which are inhibited by Sunitinib with high efficacy, with the lowest IC₅₀²⁰. All three endometrial carcinoma cell lines were sensitive to Sunitinib and EGFR was the only tested target receptor expressed in all three cell lines. We therefore investigated the phosphorylated status of the EGF receptor. Interestingly, Sunitinib was not able to inhibit the EGF-induced phosphorylation. Moreover, selective inhibition of EGFR by AG1478 did not reduce the viability of the endometrial carcinoma cells. These results suggest that Sunitinib acts inhibiting tumor cell growth independently of EGFR and therefore, independently of the most known targets of Sunitinib. Little is known about the survival signaling pathways inhibited by Sunitinib. Some authors point out that the mechanism of action of Sunitinib goes through inhibition of the Akt/mTOR^{29, 31, 32}. Our study demonstrates that Sunitinib has no effect in MAPK nor in Akt pathways but in NF κ B pathway in endometrial carcinoma cells. Of note, this is the first study indicating that the NF κ B pathway is a direct target of Sunitinib in an in vitro cancer model. Our results are in accordance with one report stating that Sunitinib, as well as two further tyrosine kinase inhibitors, could have an inhibitory effect on NF κ B signaling¹⁸. It is known that NF κ B pathway can be activated by numerous stimuli, such as growth factors³⁴, ionizing radiation^{34, 35} and even by chemotherapeutic drugs³⁴. Examples of chemotherapeutic drugs are Temozolomide³⁶, Etoposide³⁷, Vorinostat³⁸ or proteasome inhibitors¹⁴⁻¹⁶. In this line, numerous attempts have been done in order to reduce this induced NF κ B hyper-activation, finally conducting to a chemosensitization³⁶ or radiosensitization effect^{38, 39}. We demonstrate that Sunitinib inhibits both basal and induced NF κ B transcriptional activity by known molecules such as EGF, TNF and Bortezomib. Although Sunitinib does not directly act through EGFR, it could be that it modifies some proteins associated with this receptor. This may explain the observation that Sunitinib can reduce the EGF-induced NF κ B activity. We further observed that Sunitinib attenuated Bortezomib-induced

phosphorylation of IKK α and β , p65 and I κ B α . In addition, we found a synergistic effect when combining Sunitinib, our proposed inhibitor of NF κ B signaling, with Bortezomib, a potent inducer of the NF κ B pathway in endometrial carcinoma cells. This is in line with reports of our group²⁹ and others, which previously described a synergistic effect of Bortezomib and other first-generation tyrosine kinase receptors inhibitors, such as Sorafenib⁴⁰ or Imatinib mesylate⁴¹. In order to confer to NF κ B inhibition by Sunitinib the enhancement of cell death obtained in Bortezomib-treated cells, we downregulated p65 by shRNA, mimicking Sunitinib treatment. As expected, shRNA-mediated downregulation of p65 also reduced NF κ B transcriptional activity and induces apoptotic cell death in Ishikawa cells. In accordance with Sunitinib treatment, also p65 downregulated cells have a considerably increase of apoptotic cell death and a diminution in the clonogenic ability when treated with Bortezomib. Similarly, it has been described that the pharmacologic inhibition of I κ k β significantly enhanced Bortezomib-induced cell death due to the inability of Bortezomib of blocking constitutive NF κ B pathway¹⁵. Altogether these results suggest that the potential mechanism responsible for the synergy observed between Sunitinib and Bortezomib goes through the NF κ B pathway. It is well known that NF κ B is a survival pathway. Although Bortezomib induces cell death in endometrial carcinoma, it is not done by reducing NF κ B activity. Alternative mechanisms have been proposed for Bortezomib-induced cell killing like the up-regulation of BH3 only proteins such as Noxa⁴³, Puma⁴⁴ or the induction of endoplasmic reticulum stress⁴⁵. In contrast, Bortezomib activates NF κ B activity and therefore could induce cell survival even though the net balance conducts to cell death. By the addition of Sunitinib, the possible NF κ B-induced survival effects are prevented resulting in an enhancement of cell toxicity.

In conclusion, the current study shows that Sunitinib can reduce cell growth independently of the most known targets of Sunitinib. Moreover, Sunitinib inhibits the basal activity of the NF κ B pathway, which is induced by several known stimuli, including Bortezomib. Interestingly, Sunitinib mediated downregulation of p65 sensitizes endometrial carcinoma cells to the cytotoxic effects of Bortezomib. There is no optimal treatment for endometrial carcinoma patients with metastasis and recurrence after radiation, since current chemotherapeutic strategies are associated with low frequencies of complete response. Based in our results we suggest the combination of Sunitinib and Bortezomib in advanced stage endometrial carcinoma patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to thank Lutz Krause for critical reading of the manuscript.

This work was supported by grants from FIS 2010 PI100922, FIS 2006 PI060832, RD06/0020/1034, 2009 SGR 794 and Grupos Estables de la Asociación Contra el Cáncer.

A.S. is recipient of a predoctoral fellowship from Fundació Científica AECC, Catalunya contra el Cancer, Lleida. A.Y. holds a postdoctoral fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia (Programa Juan de la Cierva). L.B. holds a predoctoral fellowship from Fundació Alicia Cuello de Merigó.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Sunitinib decreases the in vitro growth of endometrial carcinoma cell lines.

(a) Three endometrial carcinoma cell lines (IK, RL-95-2 and Hec-1-A) were treated with Sunitinib (0-1-5-10-20-30-40 $\mu\text{mol/L}$) for 24, 48 and 72 hours, and cell viability was assessed by MTT assay. (b) The three endometrial carcinoma cell lines were treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ of Sunitinib for 72 hours or left untreated, after which propidium iodide staining was done in order to check the DNA content. (c) Endometrial carcinoma cells were treated with Sunitinib at 5 $\mu\text{mol/L}$ for 24, 48 and 72 hours. Then, cell lysates were subjected to Western Blot so as to determine caspase-3 processing. Tubulin was used as a loading control. (d) IK, RL-95-2 and Hec-1-A cells were cultured for 14 days, with 0.1, 0.2, 0.5 and 1 $\mu\text{mol/L}$ of Sunitinib or without treatment. Sunitinib was added to the media every two days. After 14 days, colonies were stained with MTT, fixed and counted.

Figure 2. Sunitinib does not act through the most known targets in endometrial carcinoma cell lines.

(a) Whole cell lysates of the three endometrial carcinoma cell lines (IK, RL-95-2 and Hec-1A) and the corresponding positive controls were analyzed by Western Blot for c-Kit, PDGFR α , PDGFR β , VEGFR2 and EGFR expression. The positive control for c-Kit, PDGFR α and PDGFR β consisted of M16 cell lysates, for VEGFR2 M28 cell lysates and for EGFR HeLa cell lysates, as previously described³⁴⁶. Tubulin was used as a loading control. (b) IK, RL-95-2 and Hec-1A cell lines were incubated with 1 and 10 $\mu\text{mol/L}$ of Sunitinib for 1 hour with or without the presence of 50 ng/mL EGF for 15 minutes. Subsequently, tyrosine receptor phosphorylation was assessed using a phospho-EGFR antibody.

Figure 3. Sunitinib blocks both basal and induced NF κ B pathway by several stimulus.

(a) IK cells were treated 1h with Sunitinib at 1 μM and 10 μM and additionally with EGF at 50ng/mL for 15 minutes. This was used as a positive control. After the treatments, cell lysates were obtained and subjected to Western Blot for the detection of P-ERK p42/44, P-Akt serine 473 and P-Akt threonine 308. Tubulin was used as a loading control. (b) IK cells were transfected with plasmids encoding for NF κ B-LUC and β -galactosidase constructs, using Lipofectamine. 24 hours posttransfection, cells were treated with 5 ng/mL of EGF and 50ng/mL of TNF alone or in combination with

1 μ mol/L of Sunitinib or left untreated for 16h. After treatments, luciferase reporter assay was performed. The graphic shows NF κ B transcriptional activity expressed in relative luciferase units, normalized with β -galactosidase activity. (c) NF κ B transcriptional activity in IK cells after being treated for 16 hours with 10 nmol/L of Bortezomib, 50 ng/mL of TNF, 10 μ mol/L of Sunitinib and the combination treatment of Sunitinib and Bortezomib. (d) IK cell line was treated with 10 μ mol/L of Sunitinib, 10 nmol/L of Bortezomib and with the combined treatment. Then, total protein lysates were extracted at 0, 12, 24 and 48 hours after the treatments and were subjected to Western Blot for the expression of phospho-IKK α and IKK β , phospho-p65 and phospho-I κ B α . Tubulin was used as a loading control.

Figure 4. The combined treatment with Sunitinib and Bortezomib results in a synergistic increase of cell death. (a) Cell viability (%) of IK, RL-95-2 and Hec-1A cells treated with Sunitinib, Bortezomib or both was examined using the MTT assay at 24h post-treatment. Each point represents the mean of the three independent experiments (n=3), performed in triplicate. Both drug doses are indicated. (b) Combination index obtained for different fractions affected. Dotted lines indicate CI \pm standard deviation, which are computed using Monte Carlo simulation. (c) Clonogenic assays of IK and Hec-1A cell lines after the treatments of Sunitinib, Bortezomib alone or combined.

Figure 5. The blockade of the canonical NF κ B pathway potentiates the cytotoxic effects of Bortezomib. (a) IK cells were infected with the lentiviral vector carrying shRNA for p65. At Seventy-two hours postinfection, cell lysates were analyzed by luciferase reporter assay. (b) After the infection, IK cells were treated for 24 hours with 10 and 25 nmol/L of Bortezomib or maintained untreated. Then, cell lysates were subjected to Western Blot analysis for the detection of p65, phospho-p65 and caspase-3 processing. Tubulin was used as a loading control. (c) IK cell line was treated for 24 hours with Bortezomib 10 nmol/L at 72 hours postinfection. Then, cell cycle profile was determined by flow cytometry using propidium iodide staining. (d) 72 hours postinfection and after 24 hours of treatment with Bortezomib 10 nmol/L, cells were stained with Hoechst. The graph on the right shows the percentage of cells displaying apoptotic nuclei in each condition. (e) IK cells were infected with lentivirus carrying shRNA against p65 and treated with Bortezomib 2nM for 14 days. After that, colonies

were stained, fixed and counted. The graph on the right shows the number of colonies observed in all the conditions.

Supplementary figure 1. Selective inhibition of EGFR does not reduce cell viability in endometrial carcinoma cell lines. (a) IK, RL-95-2 and Hec-1A cells lines were treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ of AG1478 for 48 hours and a MTT was performed. (b) Cells were pretreated with AG1478 at 10 $\mu\text{mol/L}$ for 1h and then treated with or without EGF at 50ng/mL for 15 minutes. After that, cell lysates were analysed for the detection of phospho-EGFR, EGFR and phospho-ERK 1/2. Tubulin was used as a loading control.

REFERENCES

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
2. Wolfson AH, Sightler SE, Markow AM, Schwade JG, Averette HE, Ganjei P, Hilsenbeck SG. The prognostic significance of surgical staging for carcinoma of the endometrium. *Gynecol Oncol* 1992;45:142-6.
3. Bokhman Ia V, Urmancheeva AF, Neustadt EL, Kutusheva GF. [Clinical and morphologic diagnosis of uterine sarcoma]. *Vopr Onkol* 1998;44:175-80.
4. Kauppila A. Progestin therapy of endometrial, breast and ovarian carcinoma. A review of clinical observations. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1984;63:441-50.
5. Lovecchio JL, Averette HE, Lichtinger M, Townsend PA, Girtanner RW, Fenton AN. Treatment of advanced or recurrent endometrial adenocarcinoma with cyclophosphamide, doxorubicin, cis-Platinum, and megestrol acetate. *Obstet Gynecol* 1984;63:557-60.
6. Dizon DS. Treatment options for advanced endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*; 117:373-81.
7. Sosman JA, Puzanov I. Molecular targets melanoma from angiogenesis to apoptosis. *Clin Cancer Res* 2006;12:2376s-83s.
8. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2:301-10.
9. Pallares J, Martinez-Guitarte JL, Dolcet X, Llobet D, Rue M, Palacios J, Prat J, Matias-Guiu X. Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma. *J Pathol* 2004;204:569-77.
10. Tiedemann RE, Schmidt J, Keats JJ, Shi CX, Zhu YX, Palmer SE, Mao X, Schimmer AD, Steward AK. Identification of a potent natural triterpenoid inhibitor of proteasome chymotrypsin-like activity and NF-kappaB with antimyeloma activity in vitro and in vivo. *Blood* 2009;113:4027-37.
11. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001;61:3071-6.
12. Orłowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, Shea TC, Baldwin AS, Stahl S, Adams J, Esseltine DL, Elliott PJ, Pien CS, Guerciolini R, Anderson JK, et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2002;20:4420-7.
13. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet* 2009;374:324-39.
14. Dolcet X, Llobet D, Encinas M, Pallares J, Cabero A, Shoenenberger JA, Comella JX, Matias-Guiu X. Proteasome inhibitors induce death but activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. *J Biol Chem* 2006;281:22118-30.
15. Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, Okawa Y, Raje N, Podar K, Mitsiades C, Munshi NC, Richardson PG, Carrasco RD, Anderson KC. Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood* 2009;114:1046-52.

16. Bauer S, Parry JA, Muhlenberg T, Brown MF, Seneviratne D, Chatterjee P, Chin A, Rubin BP, Kuan SF, Fletcher JA, Duensing S, Duensing A. Proapoptotic activity of bortezomib in gastrointestinal stroma tumor cells. *Cancer Res*;70:150-9.
17. Nemeth ZW, Wong HR, Odoms K, Deitch EA, Szabo C, Vizi ES, Hasko G. Proteasome inhibitors induce inhibitory kappa B (I kappa B) kinase activation, I kappa B alpha degradation, and nuclear factor kappa B activation in HT-29 cells. *Mol Pharmacol* 2004;65:342-9.
18. Miller SC, Huang R, Sakamuru S, Shukla SJ, Attene-Ramos MS, Shinn P, Van Leer D, Leister W, Austin CP, Xia M. Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-KappaB signaling and their mechanism of action. *Biochem Pharmacol*;79:1272-80.
19. Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louise SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams RJ, Ngai TJ, Lee LB, Murray LJ, Carver J, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003;9:327-37.
20. Chow LQ, Eckhardt SG. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol* 2007;25:884-96.
21. Atkins M, Jones CA, Kirkpatrick P. Sunitinib maleate. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:279-80.
22. Slomovitz BM, Broaddus RR, Schmandt R, Wu W, Oh JC, Ramondetta LM, Burke TW, Gershenson DM, Lu KH. Expression of imatinib mesylate-targeted kinases in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;95:32-6.
23. Inoue M, Kyo S, Fujita M, Enomoto T, Kondoh G. Coexpression of c-kit receptor and the stem cell factor in gynecological tumors. *Can Res* 1994;54:3049-53.
24. Elmore LW, Domson K, Moore JR, Kornstein M, Burks RT. Expression of c-kit (CD117) in benign and malignant human endometrial epithelium. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:146-51.
25. Scobie JV, Acs G, Bandera CA, Blank SV, Wheeler JE, Pasha TL, Salscheider M, Zhand PJ. C-kit immunoreactivity in endometrial adenocarcinomas and its clinicopathologic significance. *Int J Gynecol Pathol* 2003;22:149-55.
26. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma. *Cancer* 1996;78:454-60.
27. Yokoyama Y, Charnock-Jones DS, License D, Yanaihara A, Hastings JM, Holland CM, Emoto M, Sakamoto A, Sakamoto T, Maruyama H, Sato S, Mizunuma H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and its receptor, VEGF receptor 3, as a prognostic factor in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:1361-9.
28. Niikura H, Sasano H, Matsunaga G, Watanabe K, Ito K, Sato S, Yajima A. Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in endometrioid endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 1995;26:892-6.
29. Yeramian A, Sorolla A, Velasco A, Santacana M, Dolcet X, Valls J, Abal L, Moreno S, Egido R, Casanova JM, Puig S, Vilella R, et al. Inhibition of activated receptor tyrosine kinases by Sunitinib induces growth arrest and sensitizes melanoma cells to Bortezomib by blocking Akt pathway. *Int J Cancer*

30. Chou TC, Talaly P. A simple generalized equation for the analysis of multiple inhibitions of Michaelis-Menten kinetics systems. *J Biol Chem* 1997;252:6438-42.
31. Ikezoe T, Nishioka C, Tasaka T, Yang Y, Komatsu N, togitani K, Koeffler HP, Taguchi H. The antitumor effects of Sunitinib (formerly SU11248) against a variety of human hematologic malignancies: enhancement of growth inhibition via inhibition of mammalian target of rapamycin signaling. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2522-30.
32. Ikezoe T, Yang Y, Nishioka C, Bandobashi K, Nakatani H, Taguchi T, Koeffler HP, Taguchi H. Effect of SU11248 on gastrointestinal stromal tumor-T1 cells: enhancement of growth inhibition via inhibition of 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling. *Cancer Sci* 2006;97:945-51.
33. Jeong WJ, Mo JH, Park MW, Choi IJ, An SY, Jeon EH, Ahn SH. Sunitinib inhibits papillary thyroid carcinoma with RET/PTC rearrangement but not BRAF mutation. *Cancer Biol Ther*;12.
34. Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 2004;6:203-8.
35. Dristschilo A. Radiosensitivity and transcription factor NF-kappaB inhibition-progress and pitfalls. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1910-1.
36. Amiri KI, Horton LW, LaFleur BJ, Sosman JA, Richmond A. Augmenting chemosensitivity of malignant melanoma tumors via proteasome inhibition: implication for bortezomib (VELCADE, PS-341) as a therapeutic agent for malignant melanoma. *Cancer Res* 2004;64:4912-8.
37. Basu S, Rosenzweig KR, Youmell M, Price BD. The DNA-dependent protein kinase participates in the activation of NF kappa B following DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:79-83.
38. Dai Y, Rahmani M, Dent P, Grant X. Blockade of histone deacetylase inhibitor-induced RelA/p65 acetylation and NF-kappaB activation potentiates apoptosis in leukemia cells through a process mediated by oxidative damage, XIAP downregulation, and c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Mol Cell Biol* 2005;25:5429-44.
39. Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, Chiao PJ, Andreeff M, Meyn RE. Inhibition of constitutively activated nuclear factor-kappaB radiosensitizes human melanoma cells. *Mol Cancer Ther* 2004;3:985-92.
40. Goel A, Dispenzieri A, Geyer SM, Greiner S, Peng KW, Russell SJ. Synergistic activity of the proteasome inhibitor PS-341 with non-myeloablative 153-Sm-EDTMP skeletally targeted radiotherapy in an orthotopic model of multiple myeloma. *Blood* 2006; 107:4063-70.
41. Yu C, Friday BB, Lai JP, Yang L, Sarkaria J, Kay NE, Carter CA, Roberts LR, Kaufmann SH, Adjei AA. Cytotoxic synergy between the multikinase inhibitor sorafenib and the proteasome inhibitor bortezomib in vitro: induction of apoptosis through Akt and c-Jun NH2-terminal kinase pathways. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2378-87.
42. Hu Z, Pan XF, Wu FQ, Ma LY, Liu Y, Feng TT, Meng FY, Liu XL, Jiang QL, Chen XQ, Liu JL, et al. Synergy between proteasome inhibitors and imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *PLoS One* 2009;4:e6257

Figure 1

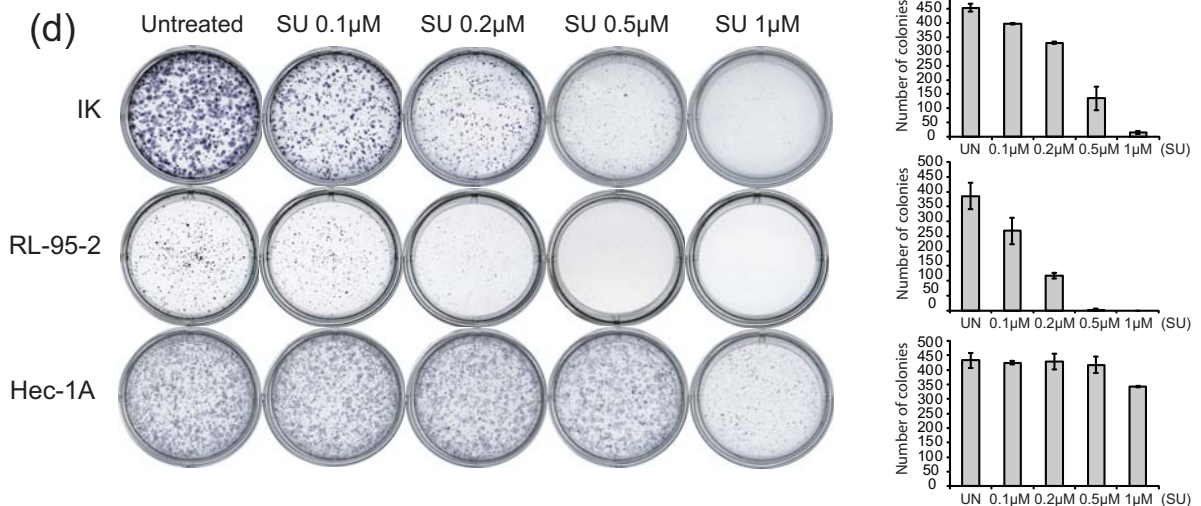
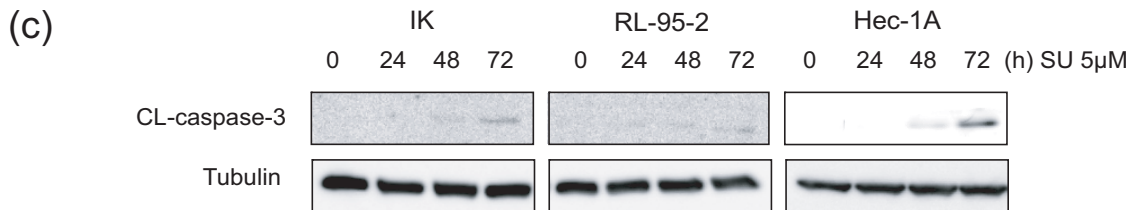
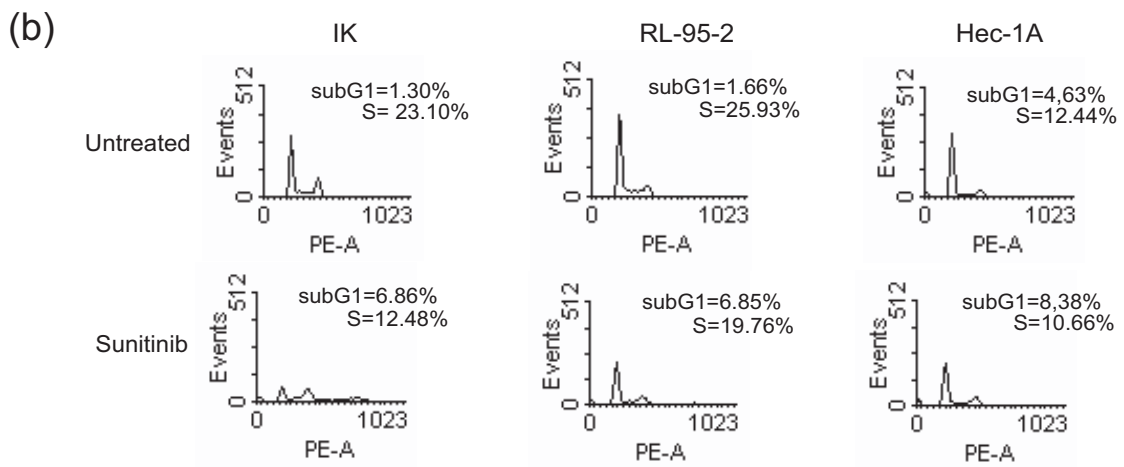
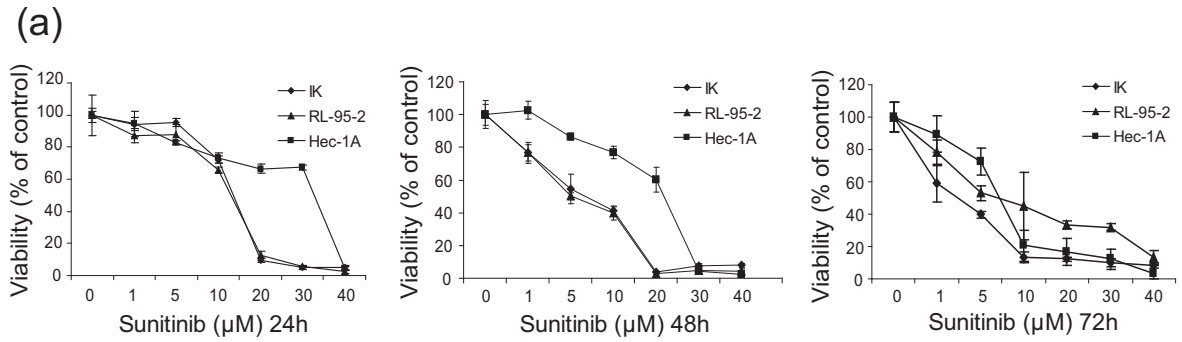


Figure 2

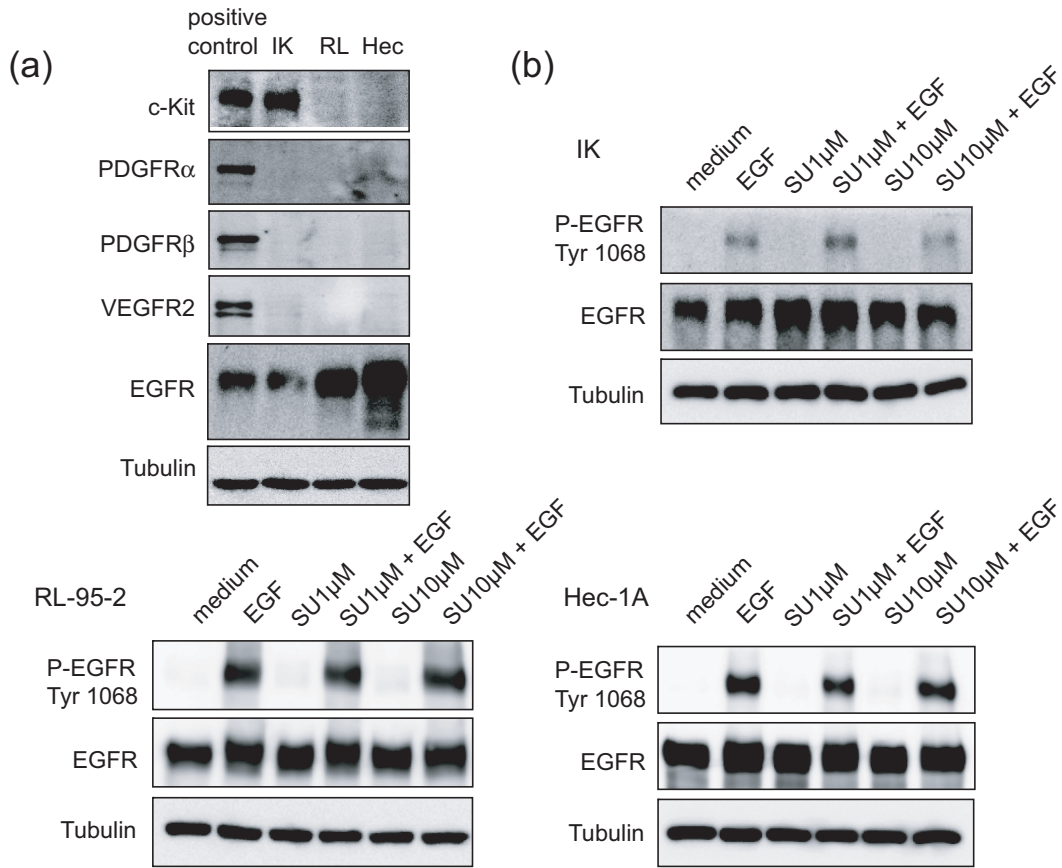


Figure 3

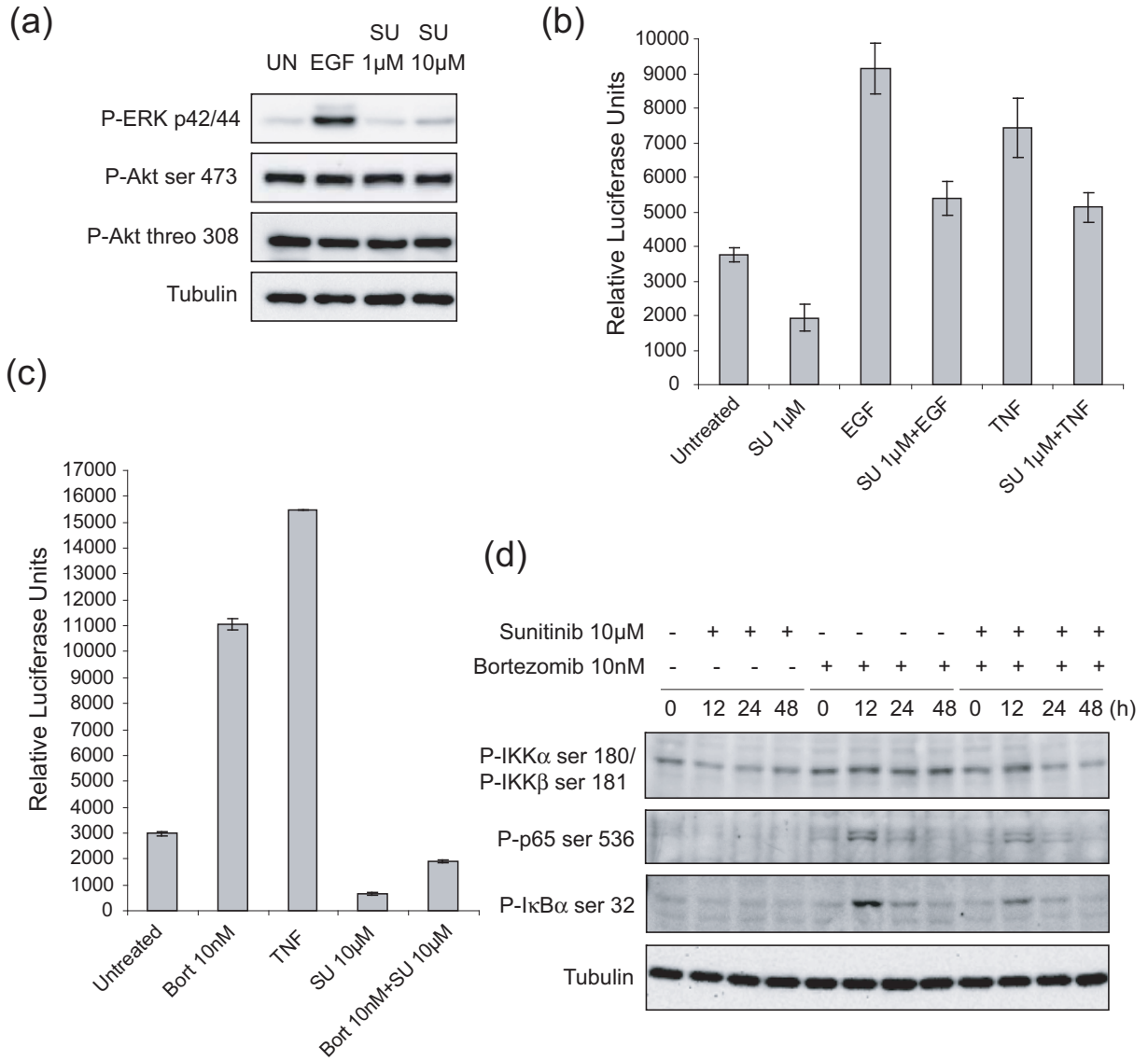


Figure 4

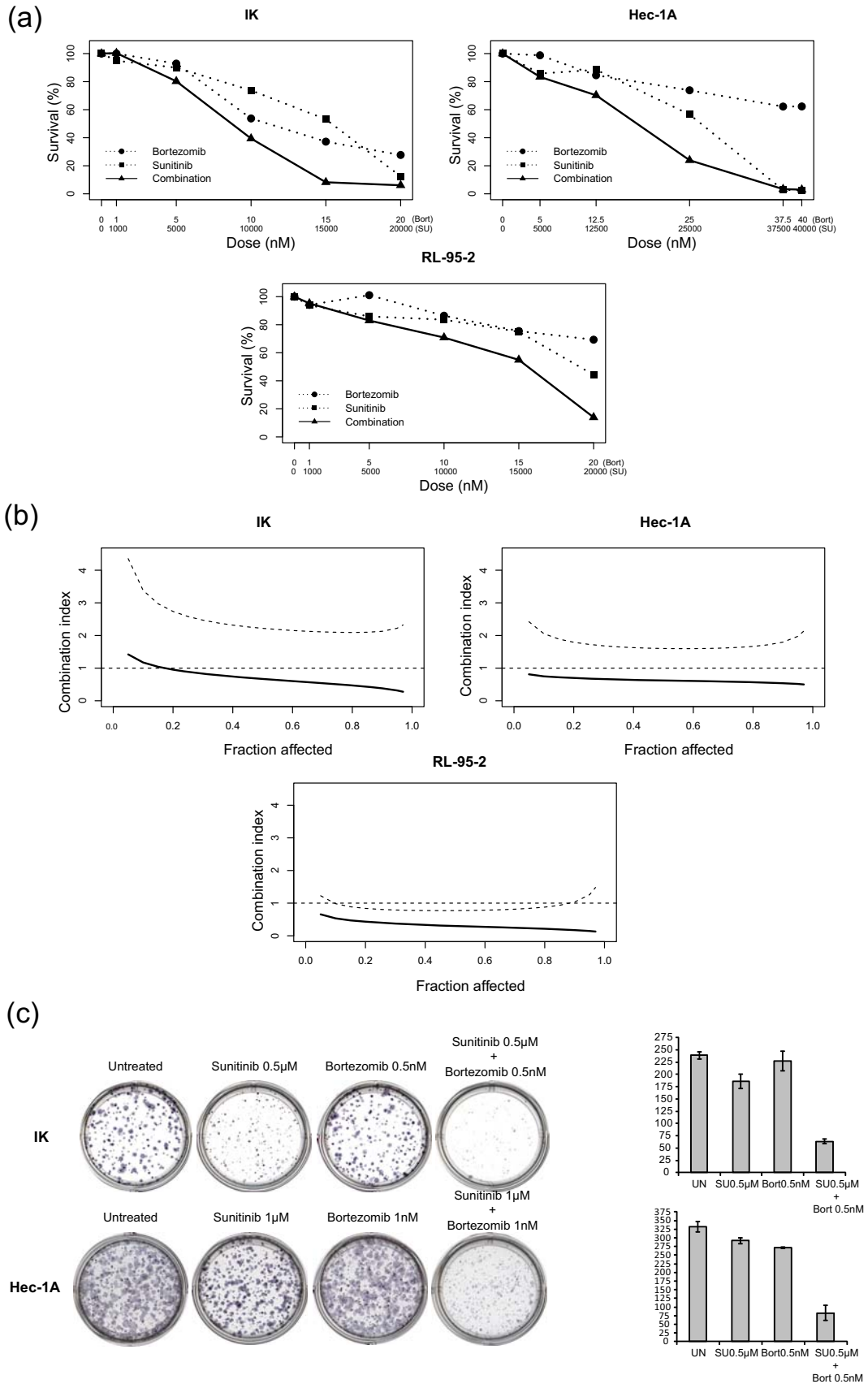
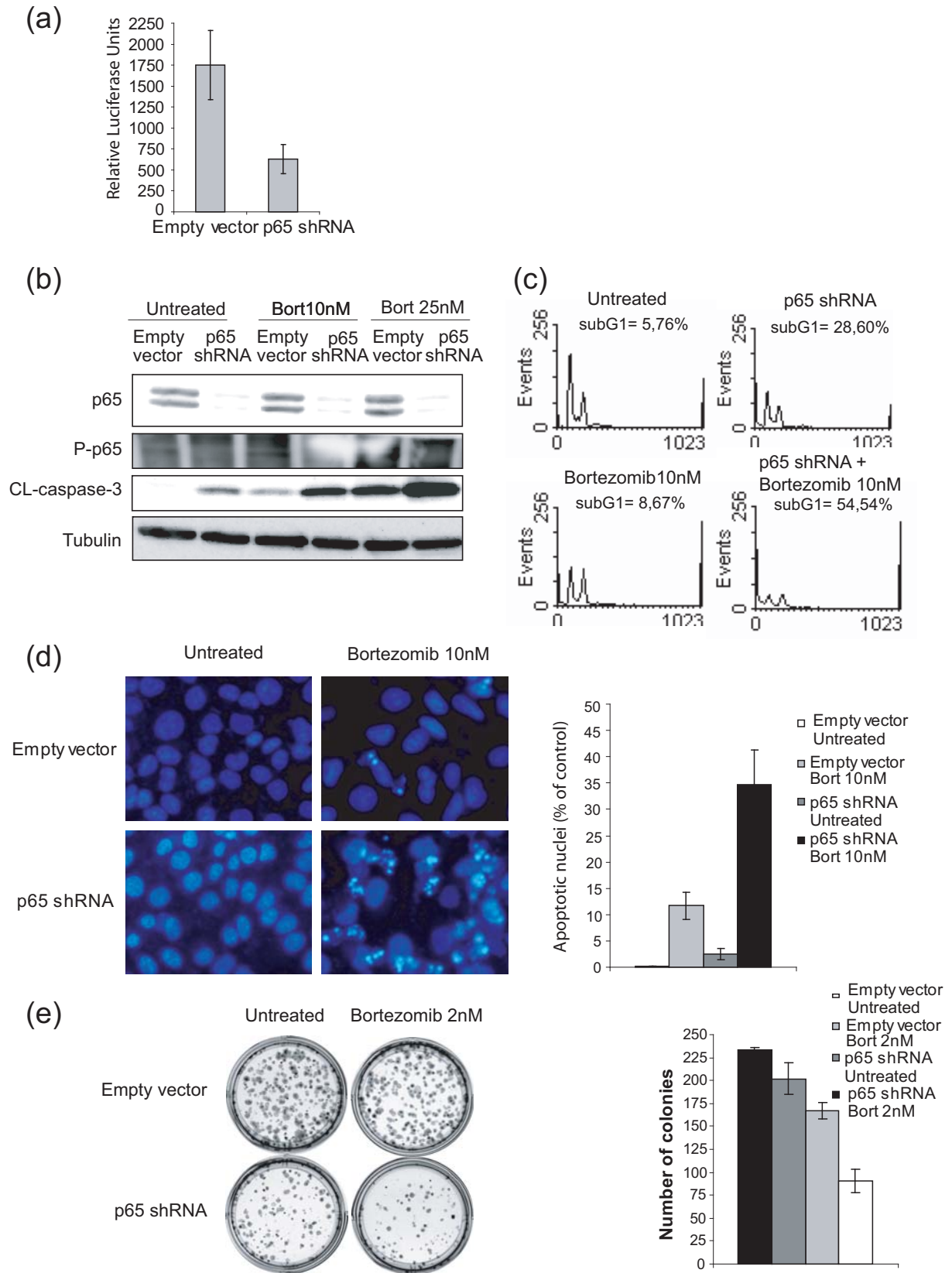
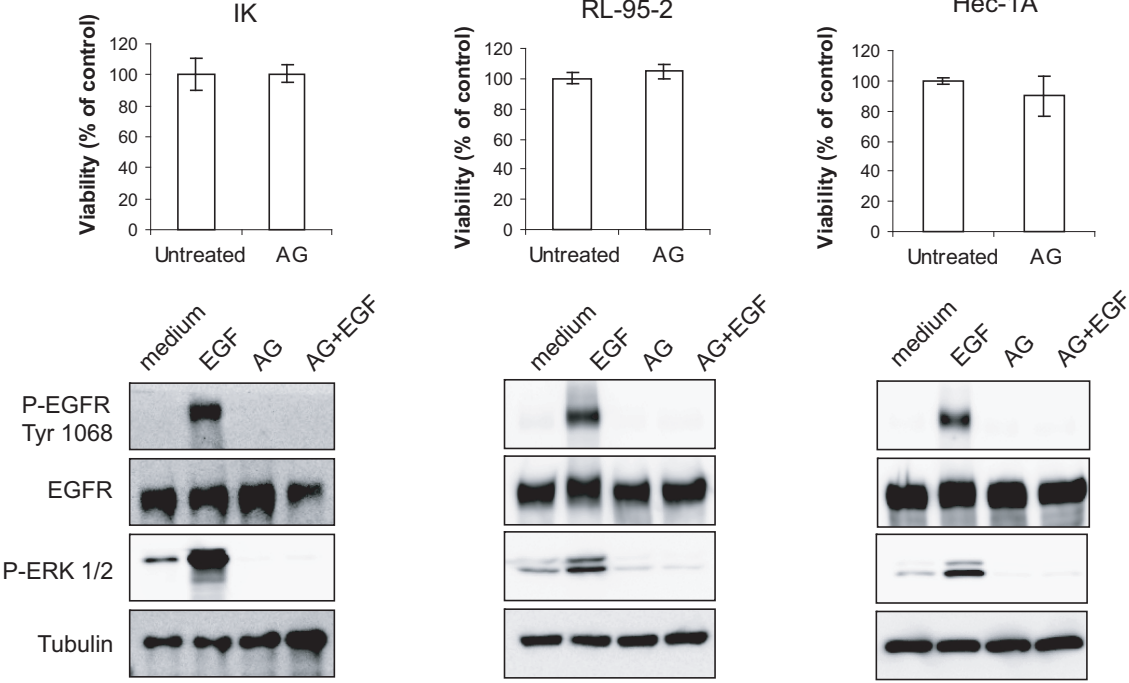


Figure 5



Supplementary figure 1

(a)



Discussió

La discussió està dividida en 4 apartats, corresponent a cada article de la tesi.

1. Les línies cel·lulars de melanoma expressen varis receptors de la somatostatina i són moderadament sensibles als anàlegs de la somatostatina.

L'ús dels anàlegs de la somatostatina com a agents antitumorals s'ha estudiat en nombrosos càncers, partint de la hipòtesi de que podia frenar el creixement tumoral. La somatostatina, apart d'inhibir la secreció de la hormona del creixement, és una substància amb efectes exocrins, endocrins, paracrins i autocrins molt variats, que inclouen la inhibició de la proliferació cel·lular. Es va començar a utilitzar en aquells càncers amb un important component neuroendocrí com el carcinoma pancreàtic. Com era de suposar, aquest càncer presenta expressió del receptor 2 de la somatostatina (SSTR2). El nostre estudi demostra que el SSTR2 és el receptor que es troba més expressat, en nivells i en freqüència, en les nostres línies de melanoma. Aquest fet està d'acord amb altres estudis que indiquen que SSTR2 és el receptor més abundant en la majoria dels tumors¹⁶⁷. A part, de forma interessant, altres treballs demostren l'expressió d'aquest receptor en el melanoma cutani i en el melanoma uveal^{104, 105, 107, 108}. Aquest fet no és d'estranyar, ja que s'ha vist expressió de receptors de la somatostatina en aquells teixits que deriven del neuroectoderm. El melanoma cutani també deriva del neuroectoderm. Els queratinòcits no, però els melanòcits, tant els uveals com els epidèrmics, migren durant el desenvolupament embrionari des de la cresta neural fins a la epidermis. Respecte al paper dels receptors, s'ha vist que SSTR2, juntament amb SSTR3 poden induir apoptosi en nombrosos teixits^{151, 154, 155}, suggerint un possible paper antitumoral dels anàlegs de la somatostatina.

L'expressió de receptors de la somatostatina en el melanoma s'havia examinat en els altres estudis mencionats per tècniques diferents com el Western blot, la RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) i la immunohistoquímica, tant en línies cel·lulars com en teixits, en general en sèries curtes. Això podria explicar la variabilitat vista en els diferents estudis. El nostre estudi és el primer que examina l'expressió de SSTRs (SSTR1, SSTR2, SSTR3 i SSTR5) per PCR en temps real o RT-PCR quantitativa i en un nombre tan gran de línies cel·lulars de melanoma. Està fet en un total de 18 línies cel·lulars de melanoma cutani. No vam analitzar l'expressió de SSTR4, perquè no és diana de cap dels anàlegs de la somatostatina utilitzats en el nostre estudi.

Discussió

La poca estabilitat en plasma i especificitat de la somatostatina, va portar als laboratoris farmacèutics a començar a sintetitzar anàlegs de la somatostatina, com Octreotide i SOM230. Octreotide i SOM230 van demostrar el seu poder antitumoral en models *in vivo* de carcinoma pancreàtic i el poder antimetastàtic en un model experimental de metastasi en el fetge^{69, 163-165}.

En el nostre treball, administrem SOM230 i Octreotide a les línies de melanoma durant 6 dies. Amb aquest tractament, hem observat que la màxima inhibició en la proliferació ocorre en el tercer dia. Els punts temporals estudiats són 1, 3 i 6 dies. Més enllà de 3 dies, en el sisè dia, la inhibició en la proliferació disminueix en tots dos tractaments. Per tant, sembla ser que l'efecte sobre la inhibició arriba al seu pic màxim entre el primer i el tercer dia. Aquest fet, ja ha estat descrit per Octreotide en cèl·lules de carcinoma de colon, en la línia cel·lular SW 620³⁴⁷.

L'ús del SOM230 en el melanoma no ha estat mai reportat en la bibliografia. No obstant, sí que s'ha fet un estudi utilitzant Octreotide en el melanoma¹⁶⁹. En aquest estudi s'examinà la sensibilitat de sis línies cel·lulars a Octreotide i es veié que tres de les sis línies eren medianament sensibles, presentant una inhibició del $36\% \pm 6\%$ en la viabilitat cel·lular. Aquest treball va en consonància amb al nostre, ja que nosaltres observem que en cap línia cel·lular la davallada en la viabilitat induïda per Octreotide, és superior al 40% (inhibició mitjana 21,54%, inhibició màxima 39,2%). Pel que fa referència a la utilització de SOM230 tampoc hi ha cap línia cel·lular que respongui més enllà del 50% (inhibició mitjana 26,92%, inhibició màxima 49,2%). En el nostre cas SOM230 sembla inhibir la proliferació més accentuadament que Octreotide, tot i que no hem trobat diferències significatives en la resposta entre els dos anàlegs. Això podria ser explicat per la presència de SSTR1 i SSTR3 en les línies cel·lulars, receptors diana de SOM230 però no d'Octreotide^{158, 348}. En referència a la utilització d'altres anàlegs de la somatostatina en el melanoma, sí que s'han utilitzat Vaopretide, Lanreotide, TT232 i RC-121. Els efectes sobre la proliferació cel·lular induïts per Vaopretide o per Lanreotide en el melanoma uvel o cutani varen ser també molt discrets^{169, 166}, aquest últim sense demostrar un efecte citotòxic. TT232 s'ha administrat en diferents models *in vivo* de melanoma d'origen humà o murí en ratolins immunodeprimits (model de *xenograft*), demostrant resultats esperançadors¹⁷¹⁻¹⁷⁶. Per últim, en un model de *xenograft* de melanoma d'origen humà en el que es va utilitzar RC-121 unit a 2-pirrolinodoxorubicina (AN-238), en els ratolins que sols rebien RC-121 no es varen observar canvis significatius en el creixement tumoral³⁴⁹.

En el nostre estudi, vam intentar correlacionar els nivells d'expressió positiva de SSTRs i la sensibilitat de les diferents línies cel·lulars a Octreotide i SOM230, però no vam trobar cap relació estadísticament significativa. Aquest fet, pot ser degut a que la senyalització a través de tots quatre SSTRs estudiats dóna lloc a diferents processos fisiològics. A més d'estar involucrats tots quatre receptors en la proliferació, SSTR2 i SSTR3 poden induir apoptosi, SSTR1 està associat amb l'angiogènesi, SSTR2 i SSTR5 estan involucrats en l'alliberament de l'hormona del creixement i SSTR5 controla els nivells d'insulina i glucagó. És a dir, tots els SSTRs estan involucrats en diferents processos cel·lulars, a més de tenir efectes diferencials en la proliferació. Per altra part, Octreotide i SOM230 no comparteixen les mateixes dianes ni la afinitat en que s'uneixen a les mateixes. Octreotide s'uneix amb una alta afinitat a SSTR2 ($IC_{50} = 0,6nM$) i SSTR5 ($IC_{50} = 7nM$), amb una afinitat moderada per SSTR3 ($IC_{50} = 34,5nM$) i amb una molt baixa afinitat per SSTR1 ($IC_{50} < 1000nM$). SOM230 té una afinitat similar per SSTR2 ($IC_{50} = 1nM$), però més afinitat per SSTR3 ($IC_{50} = 1,5nM$) i SSTR5 ($IC_{50} = 0,2nM$) i molta més afinitat per SSTR1 ($IC_{50} = 9nM$)^{154, 156, 158, 167, 348, 350}. Tenint en compte tota aquesta variabilitat, sembla raonable el fet de no haver trobat cap relació estadísticament significativa entre els nivells d'expressió dels SSTRs estudiats i la sensibilitat a Octreotide i SOM230.

Encara que al nostre treball cap línia cel·lular respon inhibint més d'un 50% la seva proliferació davant la presència de Octreotide o de SOM230, creant un model estadístic d'inhibició per concentració, temps i expressió de SSTRs, podem veure que gairebé tots els comportaments de les línies cel·lulars s'adeqüen a aquest model matemàtic. En conseqüència, podem afirmar que la resposta observada en les nostres línies cel·lulars és poc marcada però coherent. Les úniques excepcions són la línia M16 per Octreotide i la línia M48 per SOM230. Podrien haver múltiples explicacions a aquest fet, que poden anar des d'una sota regulació en aquestes línies de l'afinitat pels SSTRs fins a l'existència mutacions en els gens de SSTRs¹⁵⁶, cosa que encara no ha estat estudiada en el melanoma.

Com a conclusió d'aquest apartat de la discussió, podem dir que Octreotide i SOM230 no semblen fàrmacs antineoplàstics adients per al tractament del melanoma metastàtic, al menys, utilitzats en monoteràpia. No obstant, donat que l'expressió de SSTRs ha estat clarament demostrada en el melanoma per diverses fonts i que SSTR2 i SSTR3 poden induir apoptosi, sí que es podria continuar investigant sobre l'ús d'aquests anàlegs de la somatostatina o d'altres més eficients a l'hora d'induir

Discussió

apoptosi, com TT-232^{173, 175}, en combinació amb quimioteràpia, radioteràpia o altres agents citotòxics, com ja s'ha fet amb la Dacarbazina¹⁷⁵, amb el TNF α ¹⁶¹ i amb l'AN-238³⁴⁹. A més a més, els anàlegs de la somatostatina han demostrat tenir propietats antiangiogèniques^{166, 351, 352}, cosa que els faria atractius en combinació amb altres teràpies.

2. Els inhibidors del proteasoma indueixen una reducció en la proliferació i una inducció de mort cel·lular, tant dependent com independent de caspases, en línies cel·lulars de melanoma.

Els principals mecanismes d'acció dels inhibidors del proteasoma sobre les cèl·lules tumorals són la parada en el cicle cel·lular i la inducció de l'apoptosi¹⁷⁷. Per a la progressió del cicle cel·lular és essencial la degradació via proteasoma de nombroses molècules participants en el cicle com les ciclines i les CDKs. D'entre les CDKs degradades via proteasoma cal destacar p27 i 21. p27 o KIP regula la transició de la fase G1 a S i p21 regula la transició de la fase G2 a M. A més, el proteasoma controla la degradació de p53. p53 és una proteïna supressora tumoral que pot induir apoptosi o bé senescència quan transloca al nucli, baix un estímul d'estrès cel·lular, dany al DNA, activació oncogènica i hipòxia. En una situació normal, p53 està unida a MDM2, la qual la dirigeix cap a la seva degradació via proteasoma. En un situació d'estrès, MDM2 queda inhibida, deixant lliure p53, la qual durà a terme la seva funció supressora tumoral. Sumat a l'apoptosi, s'ha observat que el proteasoma decanta el balanç d'interacció de proteïnes de la família de Bcl-2 cap a la senyalització proapoptòtica. A part, el proteasoma regula la via de supervivència NFκB, ja que l'inhibidor IκBα és degradat via proteasoma¹⁸². Quan és degradat, el dímers NFκB, poden translocar lliurement a nucli per activar la via, mitjançant l'activació de la transcripció de diversos gens diana. Per tant, una inhibició del proteasoma indueix una parada en el cicle cel·lular en les fases G1-S i G2-M i indueix apoptosi via p53, via família de proteïnes Bcl-2, via NFκB o totes en un conjunt.

A més, lligant amb l'apoptosi, s'ha descrit que els inhibidors del proteasoma sensibilitzen les cèl·lules tumorals a estímuls propapoptòtics com TRAIL^{353, 354}.

A més, la utilització d'inhibidors del proteasoma és interessant perquè s'ha vist que les cèl·lules tumorals, les quals proliferen més ràpidament, són més sensibles que les mateixes cèl·lules normals en nombrosos tipus cel·lulars, com limfòcits, cèl·lules de l'epiteli, fibroblasts, etc. Per exemple, les cèl·lules de melanoma són més sensibles a la inhibició proteasòmica que els melanòcits¹⁸⁹.

El nostre treball examina els efectes que tenen quatre inhibidors del proteasoma, estructuralment diferents, sobre cèl·lules de melanoma en cultiu. Similar al nostre estudi, s'han realitzat altres estudis preclínic on es demostra l'activitat

Discussió

antitumoral del inhibidors del proteasoma en tumors hematològics i en tumors sòlids com carcinoma d'ovari, de pròstata, de pulmó, de colon, de pàncrees i de cap i coll^{5, 177}.

Bortezomib és l'únic inhibidor del proteasoma que s'està utilitzant en la pràctica clínica, per al tractament del mieloma múltiple i el limfoma no Hodgkin²⁰⁹. També, Bortezomib s'ha utilitzat en un estudi clínic amb pacients amb melanoma disseminat, però no va donar resultats prometedors²³⁸. Malgrat els resultats negatius que ha presentat aquest únic estudi en melanoma, els inhibidors del proteasoma s'estan contínuament combinant amb altres teràpies, les quals sí que han donat resultats esperançadors en aquest tipus de càncer, a nivell experimental. Exemples de combinacions d'inhibidors del proteasoma amb quimioterapèutics i citotòxics són la combinació de Bortezomib amb Temozolomida²³⁹, segon fàrmac utilitzat per al tractament del melanoma metastàtic. També Bortezomib amb inhibidors de calpaina i cisplati²⁴⁰, Camptoesina²⁴¹, inhibidors de desacetilases d'histones³⁵⁵, PPAR- γ i proteïna inactivadora del ribosoma³⁵⁶. A la vegada, també s'ha atribuït a Bortezomib un paper sensibilitzador a la radioteràpia²⁴⁵. Pel que fa referència a la immunoteràpia, s'ha observat que Bortezomib pot tenir un efecte immunosensibilitzador³⁵⁷ i sensibilitzador a l'interferó α ^{243, 244}. També, han sortit al mercats nous inhibidors de proteasoma, com els anomenats de segona generació^{203, 227} com per exemple NPI-005^{167, 358} o com nous pèptids aldehids³⁵⁹ que presenten menys toxicitat que MG132, a la vegada que també nous compostos amb propietats semblants que els inhibidors del proteasoma com Nelfinavir³⁶⁰. Aquest últim ha demostrat tenir un poder antitumoral en cèl·lules de melanoma en cultiu.

L'objectiu principal del nostre treball és investigar els mecanismes moleculars a partir dels quals, els inhibidors del proteasoma indueixen el seu efecte antitumoral en les línies de melanoma. Això, ajudaria a entendre millor els seus mecanismes i poder, en un futur, millorar l'eficàcia dels tractaments futurs per al melanoma que com s'ha vist podrien anar encaminats a la teràpia combinada.

En el nostre treball demostrem que quatre inhibidors del proteasoma estructuralment diferents: Bortezomib, MG-132, ALLN i Epoxomicina són capaços d'induir una reducció de la viabilitat, fins i tot, en aquelles línies cel·lulars que proliferen lentament, mitjançant el perllongament de l'inhibidor en el medi de cultiu i la seva renovació cada dos dies, per aquells inhibidors reversibles (Bortezomib i MG-132). Aquest resultat està d'acord amb aquells treballs que mostren el lligam directe

existent entre la parada en el cicle cel·lular i l'apoptosi. En el nostre treball, ha quedat palesa l'evidència de que aquelles cèl·lules amb un índex proliferatiu més alt són les més susceptibles a l'apoptosi. En aquest, sentit s'ha descrit que l'expressió de l'oncogen c-myc pot iniciar la proliferació i simultàniament incrementar la sensibilitat a l'apoptosi³⁶¹

En les nostres línies cel·lulars, els inhibidors del proteasoma duen a terme la seva acció antitumoral mitjançant la parada en el cicle cel·lular en G2-M i la inducció de l'apoptosi, testimoniada pel tall en les caspases 2, 8, 9 i 3 i l'alliberament de citocrom c en el citosol. Aquest resultat va en la línia d'altres treballs realitzats en melanoma¹⁸⁹. No obstant, el nostre és el primer que demostra el tall de caspasa-2 per part dels inhibidors en el melanoma. Aquest fet és especialment interessant, ja que s'ha vist que la caspasa-2 regula l'alliberament de citocrom c i la externalització de la fosfatidilserina, tal i com s'ha descrit en cèl·lules humanes de carcinoma pancreàtic tractades amb Bortezomib²¹⁶.

En pretractar la línia cel·lular JG amb BAF, un inhibidor de caspases d'ampli espectre, conjuntament amb Bortezomib, observem que la mort cel·lular només es reverteix en part, suggerint que Bortezomib podia induir una mort cel·lular independent de caspases. Com que el major executor de mort independent de caspases és AIF¹¹⁶, vam examinar el què passava en les condicions de Bortezomib i Bortezomib juntament amb BAF. Vam observar que totes dues condicions induïen l'alliberament d'AIF en el citosol. Aquest fet suggereix que AIF és el principal executor de mort independent de caspases en les nostres línies cel·lulars de melanoma. El mecanisme que indueix la sortida d'AIF en el citosol és controvertit. Hi ha autors que creuen que la sortida de citocrom c en el citosol, activaria les caspases, que al seu torn, afavoririen la sortida d'AIF del mitocondri³⁶². En canvi, altres autors postulen que la sortida d'AIF es dona en absència de tall i activació de caspases^{121, 363}. El nostre treball aniria en concordança amb aquesta última hipòtesi

Finalment, amb aquest treball podem concloure que els inhibidors del proteasoma indueixen una parada en el cicle cel·lular i mort cel·lular, tant dependent com independent de caspases, i que AIF és l'executor potencial de la mort independent de caspases en les nostres línies cel·lulars de melanoma. Per últim, podríem dir que els nostres resultats representen una informació útil per a l'ús dels inhibidors del proteasoma conjuntament amb fàrmacs quimioterapèutics i altres agents en el tractament del melanoma.

3. La inhibició de receptors amb activitat tirosina cinasa activats per part de Sunitinib indueix una reducció del creixement i sensibilitza les cèl·lules de melanoma a Bortezomib mitjançant el bloqueig de la via Akt.

Els receptors amb activitat tirosina cinasa són reguladors clau de processos cel·lulars crítics com la proliferació, la diferenciació, la supervivència, el metabolisme, la migració cel·lular, la invasió i el control del cicle cel·lular. En el nostre treball, mostrem com diferents biòpsies i línies cel·lulars de melanoma expressen varis d'aquests receptors com c-Kit, PDGFR α , PDGFR β i VEGFR2. En el cas de c-Kit, veiem una pèrdua d'expressió per immunohistoquímica en les biòpsies procedents de melanoma metastàtic en comparació amb la dels tumors primaris. Aquest fet va en concordança amb el que s'ha descrit en altres treballs^{306, 330} i suggereix que l'expressió de c-Kit disminueix durant la progressió tumoral del melanoma. En el cas de PDGFR α , observem una moderada expressió d'aquest receptor, la qual es manté entre els casos de melanoma primari i metastàtic. Aquest fet confirma el que s'ha vist en la bibliografia, de que PDGFR α s'ha vist sobreexpressat en el melanoma^{306, 327}. Pel que fa referència a PDGFR β , veiem que els seus nivells d'expressió són gairebé escassos, tant en el melanoma primari com en el metastàtic. També aquesta evidència ha estat reportada, la qual descriu una absència total d'expressió d'aquest receptor en el melanoma³²⁷. Per últim, VEGFR2 s'expressa moderadament en les biòpsies de melanoma, tant en els melanomes primaris com metastàtics, els quals presenten una expressió similar. Aquest fet està d'acord amb altres treballs que mostren l'expressió de VEGFR2 en cèl·lules de melanoma^{329, 331}.

De forma similar, hem analitzat l'expressió de c-Kit, PDGFR α , PDGFR β i VEGFR2 en quatre línies cel·lulars de melanoma metastàtic (M16, M17, JG i M28) i en una línia de melanòcits (HEMn-LP), i hem vist que l'expressió de tot els RTKs a excepció de c-Kit es concentra en les línies de melanoma. Aquest fet suggereix que els RTKs podrien ser una bona diana terapèutica en el melanoma. La presència de c-Kit en els melanòcits és un fet normal, ja que la senyalització a través d'aquest receptor juga un paper important en la diferenciació i migració dels melanòcits cap a l'epidermis durant el desenvolupament embrionari³⁰⁴.

Discussió

La presència de RTKs en les línies cel·lulars ens ha fet pensar que Sunitinib seria capaç d'inhibir el creixement de les cèl·lules. El que hem observat és que les quatre línies cel·lulars analitzades presenten diferents graus de sensibilitat a Sunitinib i els melanòcits apareixen ser resistents. Aquest fet suggereix, que en absència de lligands que poguessin activar els RTKs en els melanòcits, l'acció de Sunitinib quedaria restringida a les cèl·lules malignes, Sunitinib indueix una parada en la fase G1 només en les línies sensibles (M16 i M17) i apoptosi en la línia M16. D'altra banda, s'ha analitzat l'estatus dels RTKs en les línies cel·lulars i hem vist que M16 i M17 presenten PDGFR α i VEGFR2 fosforil·lats de forma basal. Cap altra línia de melanoma presenta fosforil·lació basal dels receptors que expressa. A més, de forma interessant, Sunitinib és capaç d'inhibir aquesta fosforil·lació. Amb tot això, podem dir que la sensibilitat de les línies cel·lulars a Sunitinib està relacionada amb la presència de fosforil·lació basal d'aquests RTKs inhibibles per Sunitinib. De forma similar, existeixen nombrosos treballs descrivint l'eficàcia d'Imatinib en aquells melanomes amb una excessiva senyalització a través de c-kit, degut a mutacions amb guany de funció de KIT^{318, 322-326}.

Una possible explicació de la presència de fosforil·lació basal en PDGFR α i VEGFR2 pot ser la presència d'una amplificació gènica, d'un possible bucle autocrí entre el lligand i el receptor o de mutacions amb guany de funció d'aquests receptors. Pel que fa referència a un possible bucle autocrí, s'ha descrit en la bibliografia l'existència d'un mecanisme autocrí donat per VEGFR2, el qual estimularia el creixement de les cèl·lules de melanoma³³¹. De forma similar, s'ha observat la presència del lligand PDGF-A, PDGF-B i del receptor PDGFR α en el melanoma³²⁷, suggerint que la hipòtesi de l'existència d'un bucle autocrí és possible. Pel que fa referència mutacions amb guany de funció, hi ha un estudi que va buscar mutacions en els exons 10, 12, 14 i 18 del gen PDGFRA en el melanoma però se'n van trobar³³³. De totes maneres, no es pot excloure la possibilitat de que puguin existir en altres exons d'aquest gen. Pel que fa referència a VEGFR2, no s'han descrit mutacions d'aquest receptor en el melanoma. També, el fet de trobar-nos amb una fosforil·lació basal de PDGFR α i VEGFR2 pot ser degut a la presència d'una amplificació gènica.

Sunitinib inhibeix la via de senyalització Akt/mTOR només en aquelles línies sensibles, les quals presenten PDGFR α i VEGFR2 activats. Aquest fet està en concordança amb aquells treballs que demostren que Sunitinib indueix el seu efecte citotòxic a través de la inhibició de la via Akt/mTOR en línies cel·lulars provinents de varies neoplàsies hematològiques i en cèl·lules de GIST^{301, 302}.

Per verificar que PDGFR α i VEGFR2 són dianes de Sunitinib en les línies cel·lulars M16 i M17, hem silenciats aquells gens utilitzant construccions lentivirals. Hem vist, que tant el shRNA de PDGFRA com de VEGFR2 mimetitzen els efectes vistos amb Sunitinib (reducció de la viabilitat, inhibició de la via Akt/mTOR i inducció d'apoptosi en la línia M16), amb la qual cosa podem dir que Sunitinib actua a través d'aquests dos receptors en les línies cel·lulars per dur a terme el seu efecte antitumoral.

Malgrat que Sunitinib és capaç d'inhibir la via Akt/mTOR en les línies sensibles M16 i M17, hem vist que només és capaç d'inhibir la via de les MAPK en la línia cel·lular M17. Per donar resposta a aquesta ambivalència, vam examinar el gen B-RAF en aquestes línies i vam veure que la línia M17 presentava un B-RAF salvatge, mentre que la línia M16 presentava la típica mutació de B-RAF vista en el melanoma, l'anomenada V600E. Se sap que el 30-70% dels melanomes presenten aquesta mutació^{56, 128} i que juntament amb altres membres de la família Raf i Ras, pot conduir a una activació de ERK^{364, 365}. Per tant, una possible explicació al fet observat, podria ser que tot i administrant Sunitinib en la línia M16, aquest no sigui capaç d'inhibir la fosforil·lació en ERK degut a la mutació en B-RAF.

Per últim, volíem saber si la teràpia combinada basada en Sunitinib i Bortezomib es traduïa amb un increment del poder antitumoral en el melanoma. Observem que existeix un efecte sinèrgic de citotoxicitat administrant tots dos fàrmacs a la vegada en les línies sensibles. L'efecte sinèrgic observat amb la combinació de Sunitinib i Bortezomib s'ha determinat analíticament utilitzant el mètode proposat per Chou i Talalay (median dose effect)³⁶⁶. Aquest mètode atribueix un valor (combination index) depenent de la naturalesa d'interacció entre dos drogues. Així, dona el valor de 1 quan existeix un efecte additiu, un valor major que 1 quan hi ha un efecte antagònic i menor que 1 quan existeix un efecte sinèrgic. Per totes les concentracions de fàrmacs utilitzats en les línies M16 i M17, hem observat un índex combinatori menor que 1, demostrant que la interacció entre Sunitinib i Bortezomib és sinèrgica. D'altra banda, el pretractament amb Bortezomib incrementa la mort cel·lular induïda pel Sunitinib. Aquest fet va en concordança amb altres treballs que demostren el poder sensibilitzador de Bortezomib en front a altres fàrmacs o citocines en el melanoma, com l'interferó α ^{243, 244}. D'altra banda, amb el tractament conjunt de l'inhibidor de la via PI3K/Akt (LY294002) i Bortezomib també observem un efecte sinèrgic, fet que dona a entendre que el bloqueig de la via Akt és essencial per provocar l'efecte sinèrgic vist entre Sunitinib i Bortezomib. Aquest resultat van en la mateixa línia que aquells en els que s'ha trobat que la via Akt és la responsable de l'efecte sinèrgic de citotoxicitat vist

Discussió

quan s'ha administrat Bortezomib juntament amb altres inhibidors de RTKs com Sorafenib⁴², inhibidors de EGFR³⁹ i Lonafarnib³⁶⁷.

Com a conclusió podem dir que els PDGFR α i VEGFR2 activats es poden considerar bones dianes terapèutiques i predictors de la sensibilitat a Sunitinib en el melanoma, donada la seva presència, i també amb l'experiència que s'ha tingut amb c-Kit mutat. No sabem, la freqüència d'aquests receptors activats en el melanoma. No obstant, sí que se'n pot determinar la seva presència mitjançant arrais proteòmics, amb la qual cosa es podria predir la resposta dels tumors a Sunitinib i, fins i tot, es podria proposar l'administració conjunta amb Bortezomib. Per tant, la teràpia combinada de Sunitinib i Bortezomib podria resultar prometedora en determinats casos de melanoma metastàtic.

4. El bloqueig de la via NFκB resulta en un increment de la mort cel·lular en les línies cel·lulars de carcinoma d'endometri tractades amb Bortezomib.

Ja hem vist que Sunitinib és capaç d'inhibir el creixement de cèl·lules de melanoma, tal i com s'ha descrit en un dels articles inclosos en aquesta tesi³⁶⁸. De forma similar, hem volgut examinar el seu efecte en línies cel·lulars de carcinoma d'endometri i observem que Sunitinib indueix una reducció de la viabilitat cel·lular, una parada en el cicle cel·lular, apoptosi i un descens en la clonogenicitat en totes les línies cel·lulars. Hem utilitzat el Sunitinib a 24, 48 i 72h a la concentració de 5μM. Aquest resultat, igualment que el treball realitzat en línies de melanoma, està en concordança amb aquells que mostren un efecte citotòxic de Sunitinib en altres models cel·lulars com neoplàsies hematològiques, GIST i carcinoma de tiroides^{301, 302, 369}.

Hem examinat l'expressió de varis RTKs dianes de Sunitinib (c-Kit, PDGFRα, PDGFRβ, VEGFR2 i EGFR) en les tres línies de carcinoma d'endometri: Ishikawa, RL-95-2 i Hec-1A. Vam analitzar aquests receptors perquè se sap que Sunitinib els inhibeix amb la més baixa IC50¹², i perquè alguns s'han trobat expressats en el carcinoma d'endometri. Tots els receptors, a excepció de VEGFR2, PDGFRα i β, es troben clarament expressats en les línies cel·lulars. C-Kit només es troba expressat en les cèl·lules Ishikawa i EGFR es troba fortament expressat en totes les línies cel·lulars. De forma similar, treballs previs confirmen l'expressió de c-Kit³³⁴⁻³³⁷, i EGFR³⁴¹ en el carcinoma d'endometri. Alhora, també s'ha vist l'expressió de PDGFRα³³⁴ i VEGFR2^{339, 340}. Pel que fa a PDGFRβ, no hi ha cap treball que descriu la seva expressió en aquest càncer. La presència de SCF en les cèl·lules tumorals com la presència de VEGF, tant en les cèl·lules tumorals com en les cèl·lules endotelials del carcinoma d'endometri, suggereix que l'existència de bucles autocrins i paracrins en aquests receptors són essencials per permetre la progressió del carcinoma. Nosaltres observem que totes tres línies de carcinoma d'endometri són sensibles a Sunitinib i que l'únic receptor analitzat comú en les tres és EGFR. Per aquesta raó vam voler aprofundir en l'estudi del seu estatus fosforil·lat en les tres línies cel·lulars i vam observar que l'aplicació de Sunitinib (tant a 1μM com a 10μM) previ a l'estimulació amb EGF, no era capaç d'inhibir la fosforil·lació induïda per EGF. A més a més, el tractament amb un inhibidor selectiu de EGFR, AG1478, no induïa cap efecte sobre la viabilitat en les línies cel·lulars de carcinoma d'endometri. Els fets observats suggereixen que Sunitinib no actua a través

Discussió

de EGFR per inhibir el creixement de les cèl·lules tumorals, i per tant, independentment dels receptors més coneguts, els quals hem analitzat en el nostre estudi.

Se sap molt poc sobre la via de senyalització en la qual actua Sunitinib per dur a terme el seu efecte citotòxic. Varis treballs com el nostre en melanoma, en varies neoplàsies hematològiques i en GIST^{301, 302, 368} demostren que Sunitinib podria inhibir la via Akt/mTOR. De forma interessant, un treball recent mostra que inhibidors de RTKs com Sunitinib, Sorafenib i Lestaurtinib poden inhibir la via NFκB a través de diferents mecanismes³⁰³. Nosaltres demostrem, per primera vegada, que la via NFκB és una diana directa de Sunitinib en el carcinoma d'endometri. Hem vist, que Sunitinib pot inhibir tant la via NFκB basal com la induïda per factors de creixement (EGF) i pel clàssic inductor de la via clàssica, el TNF. Tot i que hem vist que Sunitinib no actua a través de EGFR per induir el seu poder tumoral en les línies de carcinoma d'endometri és capaç de reduir la via NFκB induïda pel seu lligand, el EGF. Una possible explicació a aquest fet podria ser perquè el Sunitinib modifiqués alguna de les proteïnes adaptadores o associades al receptor. Estudiant vies de senyalització de supervivència com la via de les MAPK i Akt després de l'administració de Sunitinib, no vam veure que s'haguéssin inhibit, cosa que suggereix que Sunitinib actua at través de la via NFκB per dur a terme el seu efecte antitumoral. S'ha descrit que els inhibidors del proteasoma activen la via NFκB en línies de carcinoma d'endometri²⁴⁷, contràriament a l'efecte assumit d'inhibició d'aquesta via. No obstant, altres treballs recolzen aquesta activació de la via NFκB per part dels inhibidors del proteasoma en cèl·lules de mieloma múltiple, de GIST i d'adenocarcinoma de colon^{202, 370, 371}. Aquesta activació pot resultar perillosa donat el paper de la via NFκB en la resistència a l'apoptosi. Apart s'ha vist que la radioteràpia i una gran varietat de quimioterapèutics poden activar la via NFκB de forma indesitjada, com la Temozolomida, el Vorinostat o el Etoposide^{239, 245, 372-375}. Freqüentment, la combinació d'un inhibidor de la via NFκB aquests agents aconseguix un efecte radiosensibilitzador^{245, 373} o quimiosensibilitzador^{239, 375}. En aquesta línia, observem que Sunitinib redueix l'activació de la via NFκB induïda per Sunitinib, tornant-la a valors d'activitat basal i veiem que la combinació de Sunitinib i Bortezomib indueix un efecte sinèrgic en la viabilitat cel·lular, tal i com ho corrobora l'anàlisi de l'índex combinatori.

La utilització de teràpies combinades per interferir vies activades de forma indesitjada per un agent A mitjançant l'aplicació d'un agent B no és un concepte nou en el tractament del càncer.

Nombrosos són els treballs en la bibliografia que demostren que és més eficient la combinació de dos fàrmacs que la monoteràpia per al tractament de determinats càncers. Així doncs, pel que fa referència a la utilització d'inhibidors de RTKs juntament amb inhibidors del proteasoma s'han descrits efectes sinèrgics amb les combinacions de Bortezomib amb Imatinib^{40, 41}, Sorafenib^{42, 43}. Aquests dos inhibidors són inhibidors de receptors tirosina cinasa de primera generació, igual que Sunitinib.

Un forma de demostrar que l'efecte sinèrgic de citotoxicitat és degut a l'acció inhibidora de Sunitinib de l'activitat NFκB induïda per Bortezomib, és silenciant p65 i alhora tractant amb Bortezomib les línies de carcinoma d'endometri. Fent això, observem que hi ha un increment significatiu de l'apoptosi comparat amb la condició de cèl·lules tractades contenint p65 i amb la condició de cèl·lules no tractades on p65 ha estat silenciada. De forma similar, s'ha descrit que la inhibició farmacològica de IKKβ potencia els efectes de Bortezomib en un model en què Bortezomib no és capaç d'inhibir la via NFκB³⁷⁰. Podem hipotetitzar que el què està passant en les cèl·lules de carcinoma d'endometri és que Bortezomib, per una banda, induïx mort cel·lular i per l'altra activa la via NFκB, la qual cosa induïria supervivència. Llavors, amb l'administració de Sunitinib bloquegem les possibles sortides de supervivència que vagin via NFκB i juntament amb l'administració de Sunitinib es tradueix en un efecte potenciador de la mort cel·lular.

Com a conclusió d'aquest apartat de la discussió podem dir que Sunitinib redueix el creixement cel·lular de línies cel·lulars de carcinoma d'endometri i c-Kit podria ser la diana a través de la qual actua Sunitinib en aquest càncer. A més, Sunitinib inhibeix la via NFκB i potencia els efectes citotòxics de Bortezomib possiblement per l'habilitat d'inhibir la via NFκB induïda per Bortezomib, suggerint que la teràpia combinada de Sunitinib i Bortezomib pot ser una possible estratègia terapèutica en el carcinoma d'endometri.

Conclusions

Les conclusions derivades d'aquesta tesi són les següents:

Primera

En les condicions utilitzades en el nostre estudi els anàlegs de la somatostatina Octreotide i SOM230 no semblen ser útils per al tractament del melanoma metastàtic, malgrat l'expressió de receptors de la somatostatina en les línies cel·lulars de melanoma.

Segona

Els inhibidors del proteasoma indueixen una reducció de la viabilitat, una parada en el cicle cel·lular i apoptosi en les línies cel·lulars de melanoma.

Tercera

Els inhibidors del proteasoma duen a terme mort cel·lular, tant dependent com independent de caspases.

Quarta

L'alliberament d'AIF al citosol en absència d'activació de caspases suggereix que AIF pugui ser l'executor de mort independent de caspases.

Cinquena

La presència de PDGFR α i VEGFR2 activats de forma basal en les línies cel·lulars de melanoma prediu la sensibilitat a Sunitinib.

Sisena

El tractament combinat de Sunitinib i Bortezomib pot ser una possible estratègia terapèutica en determinats casos de melanoma disseminat, donat el seu efecte sinèrgic d'inducció d'apoptosi via PI3K/Akt en aquelles línies cel·lulars expressores de receptors tirosina cinasa activats.

Setena

Sunitinib inhibeix la via NF κ B en les línies cel·lulars de carcinoma d'endometri.

Vuitena

La teràpia combinada de Sunitinib i Bortezomib indueix un efecte sinèrgic mitjançant la inhibició de la via NF κ B induïda per Bortezomib, evidenciant ser una possible opció terapèutica per al carcinoma d'endometri.

Annex

1. PUBLICACIONS

1.1 Articles

* Aquests autors es consideren primers autors

“” Aquests articles són els inclosos en aquesta tesi

1. **“Sorolla A**, Yeramian A, Dolcet X, Pérez de Santos AM, Llobet D, Schoenenberger JA, Casanova JM, Soria X, Egido R, Llombart A, Vilella R, Matias-Guiu X, Martí RM. Effect of proteasome inhibitors on proliferation and apoptosis of human cutaneous melanoma-derived cell lines. *British Journal of Dermatology*, 158:496-504. 2008.”
2. Ortega E, Martí RM, Yeramian A, **Sorolla A**, Dolcet X, Llobet D, Abal L, Santacana M, Pallarés J, Llombart-Cussac, Matias-Guiu X. Targeted therapies in gynecologic cancers and melanoma. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 25:262-73. 2008.
3. Llobet D, Eritja N, **Sorolla A**, Yeramian A, Schoenenberger JA, Llombart-Cussac, Martí RM, Matias-Guiu X, Dolcet X. Antioxidants block proteasome inhibitors function in endometrial carcinoma cells. *Anti-Cancer Drugs*, 19:115-124. 2008.
4. Velasco A, Pallarés J, Santacana M, Yeramian A, Dolcet X, Eritja N, Puente S, **Sorolla A**, Llecha N, Matias-Guiu X. Loss of heterozygosity in endometrial carcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology*, 3:305-17. 2008.
5. Llobet D, Eritja N, Encinas M, Llecha N, Yeramian A, Pallarés J, **Sorolla A**, González-Tallada FJ, Matias-Guiu X. CK2 controls TRAIL and Fas sensitivity by regulation FLIP levels in endometrial carcinoma cells. *Oncogene*, 27:2513-24. 2008.
6. **“Martinez-Alonso M**, Mayorga ME, Llecha N, **Sorolla A**, Dolcet X, Casanova JM, Baradad M, Yeramian A, Puig S, Vilella R, Matias-Guiu X, Martí RM. Expression of somatostatin receptors (SSTR) in melanoma cell lines. Effect of somatostatin analogues on their proliferation. *The Journal of International Medical Research*, 6:1813-22. 2009.”

7. Pallarés J, Santacana M, Puente S, López S, Yeramian A, Eritja N, **Sorolla A**, Llobet D, Dolcet X, Matias-Guiu X. A review of the applications of tissue microarray technology in understanding the molecular features of endometrial carcinoma.
Analytical and Quantitative Cytology and Histology, 4:217-26. 2009.
8. Llobet D, Eritja N, Yeramian A, Pallares J, **Sorolla A**, Domingo M, Santacana M, Gonzalez-Tallada FJ, Matias-Guiu X, Dolcet X. The multikinase inhibitor Sorafenib induces apoptosis and sensitises endometrial cancer cells to TRAIL by different mechanisms.
European Journal of Cancer, 46:836-50. 2010.
9. **“Yeramian A*, Sorolla A***, Velasco A, Santacana M, Dolcet X, Valls J, Abal L, Moreno S, Egido R, Casanova JM, Puig X, Vilella R, Llombart-Cussac A, Matias-Guiu X, Martí RM. Inhibition of activated receptor tyrosine kinases by Sunitinib induces growth arrest and sensitizes melanoma cells to Bortezomib by blocking Akt pathway. International Journal of Cancer.
International Journal of Cancer, 130:967-78. 2011”
10. Yeramian A*, Santacana M*, **Sorolla A**, Llobet D, Encinas M, Velasco A, Bahi N, Eritja N, Domingo M, Oliva E, Dolcet X, Matias-Guiu X. Nuclear factor- κ B2/p100 promotes endometrial cell survival under hypoxia in a HIF-1 α independent manner.
Laboratory Investigations, 91:859-71. 2011.
11. **“Sorolla A***, Yeramian A*, Dolcet X, Valls J, Bergadà L, Llombart-Cussac A, Martí RM, Matias-Guiu X. Blockade of NF κ B activity results in an increase of cell death in Bortezomib-treated endometrial carcinoma cells. [Resubmitted revision in Molecular Oncology].”
12. Das A, Pushparaj C, Bahí N, **Sorolla A**, Herreros J, Pamplona R, Vilella R, Matias-Guiu X, Marti RM, Cantí C. Functional expression of voltage-gated calcium channels in human melanoma.
Pigment Cell & Melanoma Research, 2012 [Epub ahead of print].
13. Martí RM, **Sorolla A**, Yeramian A. Nuevas dianas terapéuticas en el melanoma. Actas Dermosifiliográficas, 2012 [Epub ahead of print].

1.2 Capítols de llibre

Sorolla A, Yeramian A, Dolcet X, Abal L, Ortega E, Egido R, Matias-Guiu X, Marti RM. Targeting the proteasome in melanoma. En: Tanaka Y. Breakthroughs in Melanoma Research. In Tech Open Access Publisher. Rijeka, Croatia 2011: 461-480 (ISBN 978-953-307-291-3).

2. COMUNICACIONS A CONGRESSOS

1. RM. Martí Laborda, M.E. Mayorga, N. Llecha, **A. Sorolla**, X. Dolcet, J. Manel Casanova, M. Baradad, R. Egido, S. Puig, R. Vilella, X. Matias-Guiu. Expresión de receptores de somatostatina (SSTR) en líneas celulares de melanoma humano. Respuesta de las mismas a dos análogos de la somatostatina: OCTEOTRIDE y SOM-230.
XXXIV Congreso Nacional de Dermatología y Venereología. Madrid, Spain 2006.
2. Martí RM, **Sorolla A**, Yeramian A, Dolcet X, Pérez de Santos AM, Llobet D, Casanova JMA, Soria X, Vilella R, Matias-Guiu X. Effect of proteasome inhibitors on proliferation and apoptosis of melanoma cell lines.
First World Meeting of Interdisciplinary Melanoma/Skin Cancer Centers. Barcelona, Spain 2007.
3. Yeramian A, **Sorolla A**, Dolcet X, Llobet D, Abal L, Sanmartin V, Aguado R, Casanova JM, Baradad M, Soria X, Egido R, Schoenenberger JA, Vilella R, Matias-Guiu X, Martí RM. Effect of proteasome inhibitors on melanoma cell lines as single agents or in combination with tyrosine-kinase inhibitors.
7th World Congress on Melanoma. Vienna, Austria 2009.
4. **Sorolla A**, Mayorga M, Yeramian A, de Santos AMP, Velasco A, Egido R, Abal L, Matias-Guiu X, Martí RM. C-kit expression in cutaneous melanoma. In vitro effects of drugs targeting c-kit.
98th Annual Meeting of the United-States and Canadian Academy of Pathology. Boston, MA, 2009.
5. **Sorolla A**, Bergadà L, García V, Yeramian A, Colomer M, Carceller JA, Dolcet X, Matias-Guiu X. Sunitinib sensitizes endometrial carcinoma cell lines to ionizing radiation.
29th Annual Congress of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. Barcelona, Spain 2010.

6. Bergadà L, **Sorolla A**, García V, Colomer M, Carceller JA, Dolcet X, Matias-Guiu X. Study of genes responses to ionizing radiation in endometrial carcinoma. 29th Annual Congress of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. Barcelona, Spain 2010.
7. **Sorolla A**, Bergada L, Gatus S, Garcia V, Yeramian A, Colomer M, Carceller JA, Matias-Guiu X. The tyrosine kinase inhibitor Sunitinib sensitizes endometrial carcinoma cell lines to ionizing radiation. 9th Catalan Congress of Pathologic Anatomy. Lleida, Spain 2010.
8. Das A, Bahí N, **Sorolla A**, Herreros J, Vilella R, Matias-Guiu X, Marti RM, Cantí A. Role of calcium channels type T on viability and proliferation of melanoma. 2ª Reunión del grupo de investigación dermatológica de la AEDV - Actualización de investigación dermatológica. Valencia, Spain 2010.
9. **Sorolla A**, Yeramian A, Velasco A, Santacana M, Dolcet X, Valls J, Llobet D, Egidio R, Casanova JM, Vilella R, Llombart-Cussac A, Matias-Guiu X, Marti RM. Targeting the proteasome in melanoma. 3ª Reunión del Grupo de Investigación Dermatológica. Barcelona, Spain 2011.
10. **Sorolla A**, Yeramian A, Velasco A, Santacana M, Dolcet X, Valls J, Llobet D, Egidio R, Casanova JM, Vilella R, Llombart-Cussac A, Matias-Guiu X, Marti RM. Targeting the proteasome in melanoma. 41st Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research. Barcelona, Spain 2011.
11. Das A, **Sorolla A**, Herreros J, Vilella R, Matias-Guiu X, Marti, RM, Canti C. Role of voltage-gated calcium channels in the viability of melanoma. 41st Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research. Barcelona, Spain 2011.

3. PROJECTES DE RECERCA EN ELS QUE HE PARTICIPAT

FISS 2006-2009. PI060832. *Efecto de los inhibidores del proteasoma en células de melanoma*. Investigadora principal: Dra. Rosa Martí Laborda.

Volia aprofitar l'avinentsa per agrair el suport a les següents entitats, mitjançant la concessió dels projectes: FIS 2010 PI100922, FIS 2006 PI060832, RD06/0020/1034, 2009 SGR 794 and Grupos Estables de la Asociación Contra el Cáncer.

Apèndix

Herein, I want to describe briefly in which consisted my short-stay research abroad. During this stay, I had the opportunity of working with different mice models.

Title of the project: Molecular mechanisms of melanoma genesis involving the Atf2 and pRB pathways

Group: Skin Carcinogenesis Group

Group leader and Supervisor: Dr. Graeme Walker

Centre: Queensland Institute of Medical Research (Q.M.I.R.), Brisbane, Queensland, Australia

Duration: Six months (12/2010 – 06/2011)

During my short stay, I have been performing two different projects. One project (Part I) was related to the role of the Atf2 transcription factor in melanocyte responses to UVR. In addition, another part of the project (Part II) consisted of examining the mutational status of the RAS family, and B-RAF, in melanomas developing in pocket protein knockout mice. Moreover, although not strictly part of the projects reported here, I gained experience in the use of various xenotransplantation systems for studying melanoma cell growth in immunocompromised mice. This experience will be valuable for me in setting up these systems in our laboratory in Lleida.

Part I. ROLE OF ATF2 IN MELANOCYTE PROLIFERATIVE RESPONSE AFTER UVR

Introduction

Malignant melanoma is the most aggressive skin cancer and its incidence is increasing in an alarming way. Important advances in understanding melanoma biology have been made over the past few years, thanks to identification of genetic changes along the MAPK signaling pathway. The constitutive activation of this pathway commonly occurs as a result of receptor tyrosine kinase activation due to KIT mutation, or mutations in members of RAS and RAF families¹. In particular, activating mutations of B-RAF² are observed in most melanomas. A new player in the field of

Appendix

melanoma is Atf2, a member of bZIP family. It is activated by stress kinases including, JNK and p38 and is implicated in transcriptional regulation of immediate early genes regulating stress and DNA damage responses and the control of cell cycle. Atf2 is also implicated in the DNA damage response through phosphorylation by ATM/ATR. Peptides that attenuate endogenous Atf2 activity inhibits melanoma development and progression in xenograft models³. Intriguingly, melanocyte-specific deletion of Atf2 in melanoma prone mice ($p16^{-/-}::Tyr-Hras^{G12V}$) essentially prevents melanoma development⁴.

Numerous epidemiological studies showed that ultraviolet radiation is the major environmental risk factor for melanoma. Accompanying the induction of melanoma in mice with a single UVB exposure is a proliferative response of melanocytes and their migration from the upper hair follicle to the epidermis. We believe that this melanocyte proliferation is part of an exacerbated tanning response, This would be assumed to be protective. However, the propensity of an individual's melanocytes to proliferate in response to sun damage has been suggested as a factor that may play a role in malignant melanoma risk, at least in a subset of malignant melanoma cases⁵. Little is known about intra-melanocyte pathways that regulate this response. Because deletion of Atf2 in melanocytes prevented the development of melanoma after UVR exposure in $p16^{-/-}::Tyr-Hras^{G12V}$ mice, we wanted to assess whether the proliferative response of melanocytes was decreased after Atf2 deletion. This will help us to better understand the early events in UVR-induced melanoma development.

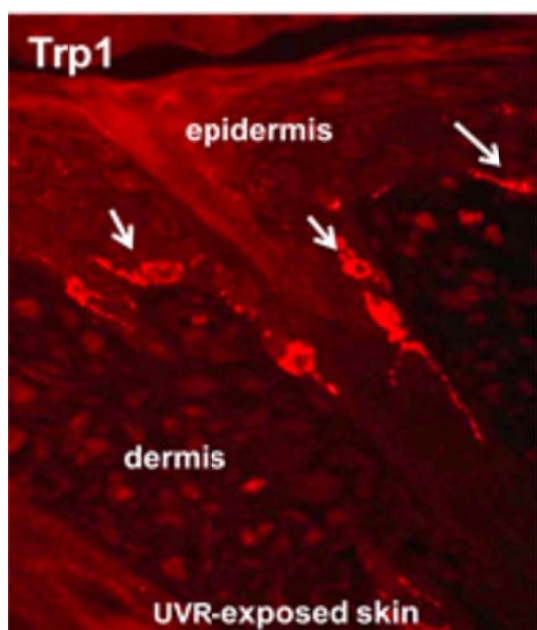


Figure 1. Immunofluorescence staining of UVR-treated neonatal mouse skin. At 3-5 days after UVR Trp1-staining melanocytes can be seen in the basal layer of the epidermis, and in the upper hair follicle (white arrows).

Materials and methods

Animals

In this project, we used melanocyte-specific Atf2 mutant mice previously generated⁴. Constitutional Atf2 knockout in mice leads to early post-natal death. Therefore, the Cre-LoxP system was utilized to disrupt Atf2 in melanocytes. *Atf2^{f/f}* mice were crossed with mice harboring a 4-hydroxytamoxifen (OHT)-inducible Cre recombinase-estrogen receptor fusion transgene under the control of the melanocyte-specific tyrosinase promoter, designated *Tyr::Cre^{ER}*. Upon administration of OHT, Cre-mediated recombination would induce *Atf2* deletion in melanocytes. 15 ng/ μ L of OHT was administered topically in the skin of the pups at least twice before they were 3 days old.

UVR treatments and obtention of skin samples

Pups (3-days-old) were given a 10 minutes exposure to UVB from a bank of six cellulose acetate-filtered Phillips TL100W 12RS UVB lamps (Total UVB dose, 5.9 kJ·m⁻², or an erythemally weighted dose of 1.8 kJ·m⁻²). Each pup was placed into a well of a six-well tissue culture plate for the treatment, to prevent them huddling and screening each other from the UVR. Animals were sacrificed with CO₂ at 0, 2, 4, 6, 8, 11 and 14 days post-UVR and a portion of exposed skin excised. Skin biopsies were either fixed with formalin and embedded in pA-raffin.

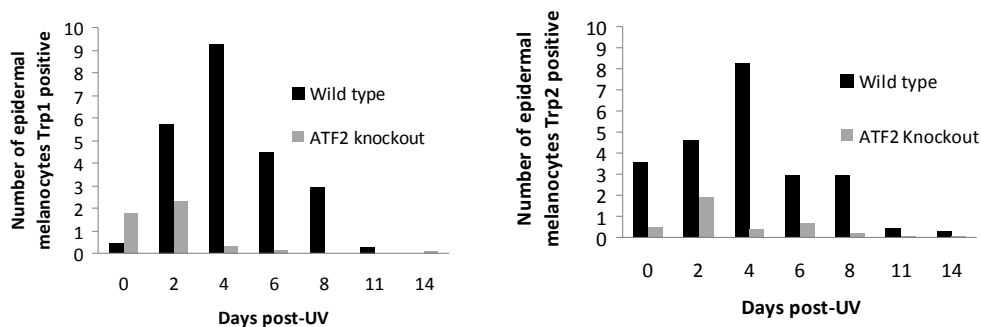
Immunofluorescence staining

Section were dewaxed in xylene and rehydrated through a graded ethanol series. Antigen retrieval was achieved by heat treatment in decloaking chamber for 5 minutes at 125 degrees in citric acid dilution (pH 6.0). Next, the slides were blocked first with 3% H₂O₂ for 15 minutes and with 10% of donkey serum for 30 minutes. The primary antibodies used were anti-Trp-1 and Trp-2 in 1/400 dilution. Then, the slides were incubated with an anti-rabbit secondary fluorescent antibody for 30 minutes in 1/500 dilution and stained with DAPI for 10 minutes. Staining were visualized using the fluorescence microscope and epidermal melanocytes were counted per field along the length of skin (about 20 fields per skin), and epidermal melanocytes number quantitated. The results were expressed as the mean of two independent blind counts (at least two different mice at each timepoint).

Results

Atf2 diminishes the melanocyte proliferative response after UV exposure

To address the role of Atf2 in the response of melanocytes after UV irradiation, we checked for the localization and the number of melanocytes in the epidermis at different time-points after the UV insult. For this purpose, we extracted skin of mice after being irradiated with UV at 2, 4, 6, 8, 11 and 14 days and we localized the melanocytes using the typical melanocyte markers such as Trp1 and Trp2⁶. We observed that at all time points post UVR the number of epidermal melanocytes per field in OHT-treated Atf2^{-/-}TyrCre⁺ was lower than for the same genotype not treated with OHT as controls. Similar results were observed when staining for either Trp1 or Trp2 as shown in figure 2.



Conclusion

We have shown that deletion of Atf2 inhibits the proliferative response of melanocytes to UVR exposure, in line with its role of the transcription factor in preventing melanoma development. At present it is difficult to speculate whether these phenomena are due to the influence of Atf2 on DNA damage response, cell cycle regulation, or melanocyte differentiation status, as Atf2 is part of the signalling pathways connecting these three processes. Now that we have solid data connecting Atf2 to the melanocyte UVR response we can begin to construct a molecular model of pathways that control this response, and also infer that it may be worth looking for ways to inhibit Atf2 as a way to abrogate melanoma development after sun exposure. Further *in vivo* and *in vitro* work on melanocytes deleted for Atf2 are warranted. This will include further multilabel immunohistochemical analysis of the skin sections harvested, to look for changes on the melanocyte expression of other molecules.

Part II. ANALYSIS OF B-RAF, HRAS, NRAS AND KRAS MUTATIONAL STATUS FROM *Tyr-CreER::PP^{F/F}* MICE

Introduction

In addition to this project, I have performed another project concerning the role of retinoblastoma proteins (pRb) in the genesis of melanoma. One of the most commonly deregulated pathways in melanoma development is the p16/Cdk4/pRb pathway. p16 is not only a melanoma susceptibility gene when mutated in the germline, but it is frequently somatically deleted in melanoma. It has recently become evident that pRb (encoded by the Rb1 gene) is not the only target of p16/Cdk4 signaling, and that two other proteins, p107 (Rb2) and p130 (Rb3). Rb, p107 and p130 are collectively called the pocket proteins (PPs). Upon p16 loss Cdk4 phosphorylates all pocket proteins, not just pRb. Hence we hypothesised that at least for melanoma, the dogma that pRb was the most important target of p16 deregulation is wrong, and the downstream effects of all PPs must be taken into account. To test this hypothesis we used gene targeting in mice to selectively knock out each of the PPs in melanocytes. Melanoma was not induced by knockout of any single or double combination of them, but we found that when all 3 PPs were deleted melanoma developed rapidly. Notably, this is the first instance of spontaneous melanoma development in mice without an engineered Ras pathway mutation. In this project we aimed to sequence all of the Ras genes (*Hras*, *Kras*, *Nras*) as well as *B-raf*, in the PP-null murine melanomas.

Materials and methods

PCR and DNA Sequencing

Sequence analysis was performed by direct sequencing of polymerase chain reaction (PCR)-amplified products, generated with specific primers designed to amplify the regions of hotspot mutations in *B-RAF*, *NRAS*, *HRAS* and *KRAS*. The primers used are indicated in the table 1. The PCR cycling conditions were as follows: an initial denaturation at 94°C for 1 minute, followed by 25 cycles of 94°C for 30 seconds, 50°C for 15 seconds, 60°C for 30 seconds and 60°C for 30 seconds. PCR products were purified and sequenced with the original primer pair using BigDye v3.1 in combination with an ABI PRISM 3100 DNA sequencer.

Results

To explore the presence of mutations in *B-RAF*, *HRAS*, *NRAS*, and *KRAS* genes, DNA sequencing was performed. DNA sequencing was done for 17 different tumour biopsies of cutaneous melanoma corresponding to 5 different mice. These mice were knockout for either PPs, or PPs and Tp53. The sequencing reaction needed careful optimization, and if traces were not clear new primers were synthesized. For all the biopsies analyzed, we did not observe any mutation in any of these genes, as summarised in table 1.

Gene		PCR primers (5'-3')	Amplicon size (bp)	Hotspot	Mutations found
B-RAF exon 18	Forward	TTC CTT TAC TTA CTG CAC CTC AGA	143	codon 600: GTG	None
	Reverse	AGC GCT GCT CCG GTT CAT AGA TTC CAT CCA AAT AGA TCC AGA			
NRAS exon 1	Forward	AGA GGT TTT TGC TGG TGT GA	115	codon 12: GGT codon 13: GGT	None
	Reverse	AGC GCT GCT CCG GTT CAT AGA TTC ATC CAC AAA GTG GTT CTG G			
NRAS exon 2	Forward	CCT TCG CCT GTC CTC ATG TA	125	codon 61: CAA	None
	Reverse	GGG ACA CCG CTG ATC GTT TAT CCC AGG ATT CTT ACC GAA A			
HRAS exon 1	Forward	TTG GCT AAG TGT GCT TC	198	codon 12: GGC codon 13: GGT	None
	Reverse	GCA AAT ACA CAG AGG AAG CC			
HRAS exon 2	Forward	CGT GTT GTT TTG CAG GAC TC	119	codon 61: CAG	None
	Reverse	ATG TAC TGG TCC CGC ATG G			
KRAS exon 1	Forward	AGG CCT GCT GAA AAT GAC TG	119	codon 12: GGT codon 13: GGC	None
	Reverse	AGC GCT GCT CCG GTT CAT AGA TTC GTA TCA TAC TCA TCC AC			
KRAS exon 2	Forward	TTG GAT ATT CTC GAC ACA GCA	142	codon 61: CAA	None
	Reverse	AGC GCT GCT CCG GTT CAT AGA TTT TAA ACC CAC CTA TAA TGG TGA A			

Table 1. Melanoma from PP knockout mice do not carry mutations in B-RAF, HRAS, NRAS or KRAS. A total of 17 biopsies of melanoma were analyzed for mutations in the specified genes. In this table, are indicated the size of the obtained amplicon, the hotspot examined and the primers used for the study.

Discussion

It is now apparent that dephosphorylation of all pocket protein PPs, pRb, p107 and p130 is needed to prevent melanocyte transformation. This redundancy of pocket protein function provides an explanation for why none of these proteins are not commonly mutated in melanoma and only the upstream mutations (e.g. CDKN2A etc) have been detected. In terms of mouse models of melanoma, this is the first to spontaneously develop melanoma without carrying an engineered oncogenic activation (e.g. Ras or B-raf) or carcinogen treatment. We have now sequenced all tumours from the PP null mice and found that none harbour mutations in B-raf or any of the Ras family members. It is clear that pocket proteins are critical, arguably the most critical, molecules that keep the melanocyte in check. It is hypothesised that PPs may also act downstream of RAS pathway due to its activation of CyclinD/Cdk4/pRb signaling. Our finding of melanoma development without RAS mutation via deletion of all PPs somewhat supports this view. A cure for melanoma is not yet available despite significant progress. The pocket proteins or their downstream effectors could be drug targets in spite of the major cell cycle and oncogenic mutations in melanoma generally being located upstream of them.

Overall summary

Identifying mechanisms underlying early phases of melanocyte transformation and melanoma development is crucial for understanding the etiology of the neoplasm, as well as for developing novel treatment approaches. It has special importance due to the fact that is an aggressive cancer which tends to generate metastasis easily and once disseminated present a very poor prognosis. One important discovery was the presence of mutant B-RAF in melanocytic lesions. However B-RAF inhibitors are promising but not entirely successful treatments. We have used genetically engineered mouse models to study reveal novel roles for Atf2 and the pocket proteins in melanoma development.

References

1. Chin L, Garraway LA, Fisher DE: Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era, *Genes Dev* 2006, 20:2149-2182

Appendix

2. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS: High frequency of B-RAF mutations in nevi, *Nat Genet* 2003, 33:19-20
3. Bhoumik A, Huang TG, Ivanov V, Gangi L, Qiao RF, Woo SL, Chen SH, Ronai Z: An ATF2-derived peptide sensitizes melanomes to apoptosis and inhibits their growth and metastasis, *J Clin Invest* 2002, 110:643-650
4. Shah M, Bhoumik A, Goel V, Dewing A, Breitwieser W, Kluger H, Krajewski S, Krajewska M, Dehart J, Lau E, Kallenberg DM, Jeong H, Eroshkin A, Bennett DC, Chin L, Bosenberg M, Jones N, Ronai ZA: A role for ATF2 in regulating MITF and melanoma development, *PLoS Genet* 2010, 6:e1001258
5. Lin JY, Fisher DE: Melanocyte biology and skin pigmentation, *Nature* 2007, 445:843-850
6. Walker GJ, Kimlin MG, Hacker E, Ravishankar S, Muller HK, Beermann F, Hayward NK: Murine neonatal melanocytes exhibit a heightened proliferative response to ultraviolet radiation and migrate to the epidermal basal layer, *J Invest Dermatol* 2009, 129:184-193

Bibliografia

1. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM: The biology of chronic myeloid leukemia, *N Engl J Med* 1999, 341:164-172
2. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ: Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia, *N Engl J Med* 2003, 348:994-1004
3. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2, *N Engl J Med* 2001, 344:783-792
4. Lane AA, Chabner BA: Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy, *J Clin Oncol* 2009, 27:5459-5468
5. Adams J: The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs, *Cancer Cell* 2004, 5:417-421
6. Wang ES, O'Connor O, She Y, Zelenetz AD, Sirotinak FM, Moore MA: Activity of a novel anti-folate (PDX, 10-propargyl 10-deazaaminopterin) against human lymphoma is superior to methotrexate and correlates with tumor RFC-1 gene expression., *Leuk Lymphoma* 2003, 44:1027-1035
7. Mulgrew K, Kinneer K, Yao XT, Ward BK, Damschroder MM, Walsh B, Mao SY, Gao C, Kiener PA, Coats S, Kinch MS, Tice DA: Direct targeting of alphavbeta3 integrin on tumor cells with a monoclonal antibody, *Abegrin.*, *Mol Cancer Ther* 2006, 5:3122-3129
8. Landen CN, Kim TJ, Lin YG, Merritt WM, Kamat AA, Han LY, Spannuth WA, Nick AM, Jennings NB, Kinch MS, Tice D, Sood AK: Tumor-selective response to antibody-mediated targeting of alphavbeta3 integrin in ovarian cancer., *Neoplasia* 2008, 10:1259-1267
9. Augustine CK, Yoshimoto Y, Gupta M, Zipfel PA, Selim MA, Febbo P, Pendergast AM, Peters WP, Tyler DS: Targeting N-cadherin enhances antitumor activity of cytotoxic therapies in melanoma treatment., *Cancer Res* 2008, 68:3777-3784
10. Dickson PV, Hamner JB, Sims TL, Fraga CH, Ng CY, Rajasekeran S, Hagedorn NL, McCarville MB, Stewart CF, Davidoff AM: Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy, *Clin Cancer Res* 2007, 13:3942-3950
11. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S: Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer, *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5:835-844
12. Chow LQ, Eckhardt SG: Sunitinib: from rational design to clinical efficacy, *J Clin Oncol* 2007, 25:884-896
13. Damle NK, Klussman K, Leytze G, Linsley PS: Proliferation of human T lymphocytes induced with superantigens is not dependent on costimulation by the CD28 counter-receptor B7., *J Immunol* 1993, 150:726-735
14. Kirkwood JM, Tarhini AA, Panelli MC, Moschos SJ, Zarour HM, Butterfield LH, Gogas HJ: Next generation of immunotherapy for

Bibliografia

- melanoma., *J Clin Oncol* 2008, 26:3445-3455
15. Traynor K: Ipilimumab approved for metastatic melanoma., *Am J Health Syst Pharm* 2011, 68:768
 16. Heinrich MC, Owzar K, Corless CL, Hollis D, Borden EC, Fletcher CD, Ryan CW, von Mehren M, Blanke CD, Rankin C, Benjamin RS, Bramwell VH, Demetri GD, Bertagnolli MM, Fletcher JA: Correlation of kinase genotype and clinical outcome in the North American Intergroup Phase III Trial of imatinib mesylate for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor: CALGB 150105 Study by Cancer and Leukemia Group B and Southwest Oncology Group, *J Clin Oncol* 2008, 26:5360-5367
 17. Solit D, Sawyers CL: Drug discovery: How melanomas bypass new therapy, *Nature* 2010, 468:902-903
 18. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee MK, Attar N, Sazegar H, Chodon T, Nelson SF, McArthur G, Sosman JA, Ribas A, Lo RS: Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation, *Nature* 2010, 468:973-977
 19. Eichhorn PJ, Gili M, Scaltriti M, Serra V, Guzman M, Nijkamp W, Beijersbergen RL, Valero V, Seoane J, Bernards R, Baselga J: Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BE235, *Cancer Res* 2008, 68:9221-9230
 20. Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, Daban A, Bardet E, Beny A, Ollier JC: Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer, *N Engl J Med* 2006, 355:1114-1123
 21. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK: Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck, *N Engl J Med* 2006, 354:567-578
 22. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer, *N Engl J Med* 2004, 350:2335-2342
 23. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC, Papa A, Nardella C, Cantley LC, Baselga J, Pandolfi PP: Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer, *J Clin Invest* 2008, 118:3065-3074
 24. Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, Ye Q, Lobo JM, She Y, Osman I, Golub TR, Sebolt-Leopold J, Sellers WR, Rosen N: BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition, *Nature* 2006, 439:358-362
 25. Bertino P, Piccardi F, Porta C, Favoni R, Cilli M, Mutti L, Gaudino G: Imatinib mesylate enhances therapeutic effects of gemcitabine in human malignant mesothelioma xenografts, *Clin Cancer Res* 2008, 14:541-548
 26. Ogawa Y, Kawamura T, Furuhashi M, Tsukamoto K, Shimada S: Improving chemotherapeutic drug penetration in melanoma by imatinib mesylate, *J Dermatol Sci* 2008, 51:190-199

27. Pietras K, Stumm M, Hubert M, Buchdunger E, Rubin K, Heldin CH, McSheehy P, Wartmann M, Ostman A: STI571 enhances the therapeutic index of epothilone B by a tumor-selective increase of drug uptake, *Clin Cancer Res* 2003, 9:3779-3787
28. Augustine CK, Toshimitsu H, Jung SH, Zipfel PA, Yoo JS, Yoshimoto Y, Selim MA, Burchette J, Beasley GM, McMahon N, Padussis J, Pruitt SK, Ali-Osman F, Tyler DS: Sorafenib, a multikinase inhibitor, enhances the response of melanoma to regional chemotherapy, *Mol Cancer Ther* 2010, 9:2090-2101
29. Cuneo KC, Geng L, Fu A, Orton D, Hallahan DE, Chakravarthy AB: SU11248 (sunitinib) sensitizes pancreatic cancer to the cytotoxic effects of ionizing radiation, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008, 71:873-879
30. Plataras JP, Kim SH, Liu YY, Dicker DT, Dorsey JF, McDonough J, Cerniglia G, Rajendran RR, Gupta A, Rustgi AK, Diehl JA, Smith CD, Flaherty KT, El-Deiry WS: Cell cycle dependent and schedule-dependent antitumor effects of sorafenib combined with radiation, *Cancer Res* 2007, 67:9443-9454
31. Wang M, Morsbach F, Sander D, Gheorghiu L, Nanda A, Benes CH, Kriegs M, Krause M, Dikomey E, Baumann M, Dahm-Daphi J, Settleman JE, Willers H: EGF receptor inhibition radiosensitizes NSCLC cells by inducing senescence in cells sustaining DNA double-strand breaks, *Cancer Res* 2011,
32. Solomon B, Hagekyriakou J, Trivett MK, Stacker SA, McArthur GA, Cullinane C: EGFR blockade with ZD1839 ("Iressa") potentiates the antitumor effects of single and multiple fractions of ionizing radiation in human A431 squamous cell carcinoma. Epidermal growth factor receptor, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003, 55:713-723
33. Molhoek KR, Brautigan DL, Slingluff CL, Jr.: Synergistic inhibition of human melanoma proliferation by combination treatment with B-Raf inhibitor BAY43-9006 and mTOR inhibitor Rapamycin, *J Transl Med* 2005, 3:39
34. Ricci MS, Kim SH, Ogi K, Plataras JP, Ling J, Wang W, Jin Z, Liu YY, Dicker DT, Chiao PJ, Flaherty KT, Smith CD, El-Deiry WS: Reduction of TRAIL-induced Mcl-1 and cIAP2 by c-Myc or sorafenib sensitizes resistant human cancer cells to TRAIL-induced death, *Cancer Cell* 2007, 12:66-80
35. Rosato RR, Almenara JA, Coe S, Grant S: The multikinase inhibitor sorafenib potentiates TRAIL lethality in human leukemia cells in association with Mcl-1 and cFLIPL down-regulation, *Cancer Res* 2007, 67:9490-9500
36. Heim M, Scharifi M, Zisowsky J, Jaehde U, Voliotis D, Seeber S, Strumberg D: The Raf kinase inhibitor BAY 43-9006 reduces cellular uptake of platinum compounds and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines, *Anticancer Drugs* 2005, 16:129-136
37. An J, Rettig MB: Epidermal growth factor receptor inhibition sensitizes renal cell carcinoma cells to the cytotoxic effects of bortezomib, *Mol Cancer Ther* 2007, 6:61-69
38. Pedeboscq S, L'Azou B, Passagne I, De Giorgi F, Ichas F, Pometan JP, Cambar J: Cytotoxic and apoptotic effects of bortezomib and gefitinib compared to alkylating agents on human glioblastoma cells, *J Exp Ther Oncol* 2008, 7:99-111
39. Cascone T, Morelli MP, Morgillo F, Kim WY, Rodolico G,

Bibliografia

- Pepe S, Tortora G, Berrino L, Lee HY, Heymach JV, Ciardiello F: Synergistic anti-proliferative and pro-apoptotic activity of combined therapy with bortezomib, a proteasome inhibitor, with anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) drugs in human cancer cells, *J Cell Physiol* 2008, 216:698-707
40. Gatto S, Scappini B, Pham L, Onida F, Milella M, Ball G, Ricci C, Divoky V, Verstovsek S, Kantarjian HM, Keating MJ, Cortes-Franco JE, Beran M: The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth and induces apoptosis in Bcr/Abl-positive cell lines sensitive and resistant to imatinib mesylate, *Haematologica* 2003, 88:853-863
41. Hu Z, Pan XF, Wu FQ, Ma LY, Liu DP, Liu Y, Feng TT, Meng FY, Liu XL, Jiang QL, Chen XQ, Liu JL, Liu P, Chen Z, Chen SJ, Zhou GB: Synergy between proteasome inhibitors and imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia, *PLoS One* 2009, 4:e6257
42. Yu C, Friday BB, Lai JP, Yang L, Sarkaria J, Kay NE, Carter CA, Roberts LR, Kaufmann SH, Adjei AA: Cytotoxic synergy between the multikinase inhibitor sorafenib and the proteasome inhibitor bortezomib in vitro: induction of apoptosis through Akt and c-Jun NH2-terminal kinase pathways, *Mol Cancer Ther* 2006, 5:2378-2387
43. Chen KF, Yu HC, Liu TH, Lee SS, Chen PJ, Cheng AL: Synergistic interactions between sorafenib and bortezomib in hepatocellular carcinoma involve PP2A-dependent Akt inactivation, *J Hepatol* 2010, 52:88-95
44. Lin JY, Fisher DE: Melanocyte biology and skin pigmentation, *Nature* 2007, 445:843-850
45. Miller AJ, Mihm MC, Jr.: Melanoma, *N Engl J Med* 2006, 355:51-65
46. Garbe C, Leiter U: Melanoma epidemiology and trends, *Clin Dermatol* 2009, 27:3-9
47. Diepgen TL, Mahler V: The epidemiology of skin cancer, *Br J Dermatol* 2002, 146 Suppl 61:1-6
48. Burton RC: Malignant melanoma in the year 2000, *CA Cancer J Clin* 2000, 50:209-213
49. Garbe C, Blum A: Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide, *Skin pharmacology and applied skin physiology* 2001, 14:280-290
50. De Fabo EC, Noonan FP, Fears T, Merlino G: Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma, *Cancer Res* 2004, 64:6372-6376
51. Phillipson RP, Tobi SE, Morris JA, McMillan TJ: UV-A induces persistent genomic instability in human keratinocytes through an oxidative stress mechanism, *Free Radic Biol Med* 2002, 32:474-480
52. Applegate LA, Ley RD, Alcalay J, Kripke ML: Identification of the molecular target for the suppression of contact hypersensitivity by ultraviolet radiation, *J Exp Med* 1989, 170:1117-1131
53. Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, et al.: Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus, *Nat Genet* 1994, 8:23-26
54. Chin L: The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man, *Nat Rev Cancer* 2003, 3:559-570
55. Valverde P, Healy E, Sikkink S, Haldane F, Thody AJ, Carothers A, Jackson IJ, Rees JL: The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is

- associated with melanoma, *Hum Mol Genet* 1996, 5:1663-1666
56. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA: Mutations of the BRAF gene in human cancer, *Nature* 2002, 417:949-954
57. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Brocker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC: Distinct sets of genetic alterations in melanoma, *N Engl J Med* 2005, 353:2135-2147
58. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhim R, Milner DA, Granter SR, Du J, Lee C, Wagner SN, Li C, Golub TR, Rimm DL, Meyerson ML, Fisher DE, Sellers WR: Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma, *Nature* 2005, 436:117-122
59. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC: Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma, *J Clin Oncol* 2006, 24:4340-4346
60. Van Raamsdonk CD, Bezroukove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, Simpson EM, Barsh GS, Bastian BC: Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi, *Nature* 2009, 457:599-602
61. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK: Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification., *J Clin Oncol* 2009, 27:6199-6206
62. Ibrahim N, Haluska FG: Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms, *Annu Rev Pathol* 2009, 4:551-579
63. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ: Cancer statistics, 2008, *CA Cancer J Clin* 2008, 58:71-96
64. Bokhman JV: Two pathogenetic types of endometrial carcinoma, *Gynecol Oncol* 1983, 15:10-17
65. Prat J, Gallardo A, Cuatrecasas M, Catusus L: Endometrial carcinoma: pathology and genetics, *Pathology* 2007, 39:72-87
66. Matias-Guiu X, Catusus L, Bussaglia E, Lagarda H, Garcia A, Pons C, Munoz J, Arguelles R, Machin P, Prat J: Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma, *Hum Pathol* 2001, 32:569-577
67. Kauppila A: Progestin therapy of endometrial, breast and ovarian carcinoma. A review of clinical observations, *Acta Obstet Gynecol Scand* 1984, 63:441-450
68. Lovecchio JL, Averette HE, Lichtinger M, Townsend PA, Girtanner RW, Fenton AN: Treatment of advanced or recurrent endometrial adenocarcinoma with cyclophosphamide, doxorubicin, cis-Platinum, and megestrol acetate, *Obstet Gynecol* 1984, 63:557-560
69. Wenger FA, Kilian M, Jacobi CA, Mautsch I, Peter FJ, Guski H,

Bibliografia

- Schimke I, Muller JM: Effects of octreotide on liver metastasis and intrametastatic lipid peroxidation in experimental pancreatic cancer, *Oncology* 2001, 60:282-288
70. Kerr JF: A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes, *J Pathol Bacteriol* 1965, 90:419-435
71. Ellis HM, Horvitz HR: Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*, *Cell* 1986, 44:817-829
72. Hengartner MO: The biochemistry of apoptosis, *Nature* 2000, 407:770-776
73. Nicholson DW, Thornberry NA: Caspases: killer proteases, *Trends Biochem Sci* 1997, 22:299-306
74. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR: The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme, *Cell* 1993, 75:641-652
75. Xue D, Shaham S, Horvitz HR: The *Caenorhabditis elegans* cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease, *Genes Dev* 1996, 10:1073-1083
76. Kumar S, Doumanis J: The fly caspases, *Cell Death Differ* 2000, 7:1039-1044
77. Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES: Spodoptera frugiperda caspase-1, a novel insect death protease that cleaves the nuclear immunophilin FKBP46, is the target of the baculovirus antiapoptotic protein p35, *J Biol Chem* 1997, 272:1421-1424
78. Madeo F, Herker E, Maldener C, Wissing S, Lachelt S, Herlan M, Fehr M, Lauber K, Sigrist SJ, Wesselborg S, Frohlich KU: A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast, *Mol Cell* 2002, 9:911-917
79. Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenaabeele P: Caspases in cell survival, proliferation and differentiation, *Cell Death Differ* 2007, 14:44-55
80. Riedl SJ, Shi Y: Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, 5:897-907
81. Ashkenazi A: Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily, *Nat Rev Cancer* 2002, 2:420-430
82. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J: Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP, *Nature* 1997, 388:190-195
83. Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME, Yang X: c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis, *EMBO J* 2002, 21:3704-3714
84. Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, Briand C, Grutter MG: The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex, *J Biol Chem* 2002, 277:45162-45171
85. Green DR, Kroemer G: The pathophysiology of mitochondrial cell death, *Science* 2004, 305:626-629
86. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X: An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9, *J Biol Chem* 1999, 274:11549-11556
87. Wang X: The expanding role of mitochondria in apoptosis, *Genes Dev* 2001, 15:2922-2933

88. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell* 1997, 91:479-489
89. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES: Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization, *Mol Cell* 1998, 1:949-957
90. Riedl SJ, Salvesen GS: The apoptosome: signalling platform of cell death, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8:405-413
91. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM: Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma, *Science* 1985, 228:1440-1443
92. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ: Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18, *Cell* 1985, 41:899-906
93. Vaux DL, Cory S, Adams JM: Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells, *Nature* 1988, 335:440-442
94. Youle RJ, Strasser A: The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, 9:47-59
95. Huang DC, Cory S, Strasser A: Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death, *Oncogene* 1997, 14:405-414
96. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC: Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak, *Science* 2007, 315:856-859
97. Youle RJ: Cell biology. Cellular demolition and the rules of engagement, *Science* 2007, 315:776-777
98. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S: Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death, *Cell* 2003, 112:481-490
99. Puthalakath H, Strasser A: Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins, *Cell Death Differ* 2002, 9:505-512
100. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR: Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario, *Cell Death Differ* 2006, 13:1396-1402
101. Tsujimoto Y, Shimizu S: VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins, *Cell Death Differ* 2000, 7:1174-1181
102. Zamzami N, Kroemer G: The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, 2:67-71
103. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N: Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis, *Science* 2000, 288:1053-1058
104. Nakano K, Vousden KH: PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53, *Mol Cell* 2001, 7:683-694
105. Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B: PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells, *Mol Cell* 2001, 7:673-682
106. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ: Expression of the pro-

Bibliografia

- apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1, *Curr Biol* 2000, 10:1201-1204
107. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A: ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim, *Cell* 2007, 129:1337-1349
108. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ: Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L), *Cell* 1996, 87:619-628
109. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, *Cell* 1998, 94:491-501
110. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X: Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors, *Cell* 1998, 94:481-490
111. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A: The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex, *Mol Cell* 1999, 3:287-296
112. Akiyama T, Bouillet P, Miyazaki T, Kadono Y, Chikuda H, Chung UI, Fukuda A, Hikita A, Seto H, Okada T, Inaba T, Sanjay A, Baron R, Kawaguchi H, Oda H, Nakamura K, Strasser A, Tanaka S: Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim, *EMBO J* 2003, 22:6653-6664
113. Ley R, Ewings KE, Hadfield K, Cook SJ: Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK, *Cell Death Differ* 2005, 12:1008-1014
114. Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A: Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis, *Science* 2001, 293:1829-1832
115. Shimazu T, Degenhardt K, Nur EKA, Zhang J, Yoshida T, Zhang Y, Mathew R, White E, Inouye M: NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-XL and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition, *Genes Dev* 2007, 21:929-941
116. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G: Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature* 1999, 397:441-446
117. van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenabeele P: Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation, *Cell Death Differ* 2001, 8:1136-1142
118. Li LY, Luo X, Wang X: Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria, *Nature* 2001, 412:95-99
119. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G: Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis, *J Exp Med* 2000, 192:571-580

120. Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS: Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death, *J Cell Biol* 2002, 158:507-517
121. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM: Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death, *Nature* 2001, 410:549-554
122. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G: Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease, *J Exp Med* 1996, 184:1331-1341
123. Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, Ishihara N, Mihara K: Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space, *EMBO J* 2005, 24:1375-1386
124. Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Susin SA: NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *J Biol Chem* 2001, 276:16391-16398
125. Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL: The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor, *Nature* 2002, 419:367-374
126. Cregan SP, Dawson VL, Slack RS: Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death, *Oncogene* 2004, 23:2785-2796
127. Loeffler M, Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Metivier D, Nieminen AL, Brothers G, Penninger JM, Kroemer G: Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor, *FASEB J* 2001, 15:758-767
128. Garnett MJ, Marais R: Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene, *Cancer Cell* 2004, 6:313-319
129. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS: High frequency of BRAF mutations in nevi, *Nat Genet* 2003, 33:19-20
130. Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey RD, Berghmans S, Mayhall EA, Traver D, Fletcher CD, Aster JC, Granter SR, Look AT, Lee C, Fisher DE, Zon LI: BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma, *Curr Biol* 2005, 15:249-254
131. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS: BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi, *Nature* 2005, 436:720-724
132. Murphy DA, Makonnen S, Lassoued W, Feldman MD, Carter C, Lee WM: Inhibition of tumor endothelial ERK activation, angiogenesis, and tumor growth by sorafenib (BAY43-9006), *Am J Pathol* 2006, 169:1875-1885
133. Inamdar GS, Madhunapantula SV, Robertson GP: Targeting the MAPK pathway in melanoma: why some approaches succeed and other fail,

Bibliografia

- Biochem Pharmacol 2010, 80:624-637
134. Shepherd C, Puzanov I, Sosman JA: B-RAF inhibitors: an evolving role in the therapy of malignant melanoma, *Curr Oncol Rep* 2010, 12:146-152
135. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB: Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma, *N Engl J Med* 2010, 363:809-819
136. Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H, Spevak W, Zhang C, Zhang Y, Habets G, Burton EA, Wong B, Tsang G, West BL, Powell B, Shellooe R, Marimuthu A, Nguyen H, Zhang KY, Artis DR, Schlessinger J, Su F, Higgins B, Iyer R, D'Andrea K, Koehler A, Stumm M, Lin PS, Lee RJ, Grippo J, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, Chapman PB, Flaherty KT, Xu X, Nathanson KL, Nolop K: Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma, *Nature* 2010, 467:596-599
137. Ivan D, Niveiro M, Diwan AH, Eton O, Kim KB, Lacey C, Gonzalez C, Prieto VG: Analysis of protein tyrosine kinases expression in the melanoma metastases of patients treated with Imatinib Mesylate (STI571, Gleevec), *J Cutan Pathol* 2006, 33:280-285
138. Smalley KS, Contractor R, Nguyen TK, Xiao M, Edwards R, Muthusamy V, King AJ, Flaherty KT, Bosenberg M, Herlyn M, Nathanson KL: Identification of a novel subgroup of melanomas with KIT/cyclin-dependent kinase-4 overexpression, *Cancer Res* 2008, 68:5743-5752
139. Hamada S, Masago K, Mio T, Hirota S, Mishima M: Good clinical response to imatinib mesylate in atypical thymic carcinoid With KIT overexpression, *J Clin Oncol* 2011, 29:e9-10
140. Faderl S, Pal A, Bornmann W, Albitar M, Maxwell D, Van Q, Peng Z, Harris D, Liu Z, Hazan-Halevy I, Kantarjian HM, Estrov Z: Kit inhibitor APcK110 induces apoptosis and inhibits proliferation of acute myeloid leukemia cells, *Cancer Res* 2009, 69:3910-3917
141. Leach DR, Krummel MF, Allison JP: Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade, *Science* 1996, 271:1734-1736
142. Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Restifo NP, Haworth LR, Seipp CA, Freezer LJ, Morton KE, Mavroukakis SA, Duray PH, Steinberg SM, Allison JP, Davis TA, Rosenberg SA: Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:8372-8377
143. Attia P, Phan GQ, Maker AV, Robinson MR, Quezado MM, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Kammula US, Royal RE, Restifo NP, Haworth LR, Levy C, Mavroukakis SA, Nichol G, Yellin MJ, Rosenberg SA: Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4, *J Clin Oncol* 2005, 23:6043-6053
144. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ: Improved survival with ipilimumab in patients with

- metastatic melanoma, *N Engl J Med* 2010, 363:711-723
145. Gagnon V, St-Germain ME, Parent S, Asselin E: Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1, *Int J Oncol* 2003, 23:803-810
146. Chon HS, Hu W, Kavanagh JJ: Targeted therapies in gynecologic cancers, *Curr Cancer Drug Targets* 2006, 6:333-363
147. Khalifa MA, Abdoh AA, Mannel RS, Haraway SD, Walker JL, Min KW: Prognostic utility of epidermal growth factor receptor overexpression in endometrial adenocarcinoma, *Cancer* 1994, 73:370-376
148. Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N, Cohn DE, Kelbick N, Copeland L, Maxwell GL, Fowler JM: HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients, *J Clin Oncol* 2006, 24:2376-2385
149. Catusus L, Matias-Guiu X, Machin P, Munoz J, Prat J: BAX somatic frameshift mutations in endometrioid adenocarcinomas of the endometrium: evidence for a tumor progression role in endometrial carcinomas with microsatellite instability, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1998, 78:1439-1444
150. Dedes KJ, Wetterskog D, Mendes-Pereira AM, Natrajan R, Lambros MB, Geyer FC, Vatcheva R, Savage K, Mackay A, Lord CJ, Ashworth A, Reis-Filho JS: PTEN deficiency in endometrioid endometrial adenocarcinomas predicts sensitivity to PARP inhibitors., *Sci Transl Med* 2010, 2:53ra75
151. Patel YC: Somatostatin and its receptor family, *Front Neuroendocrinol* 1999, 20:157-198
152. Hejna M, Schmidinger M, Raderer M: The clinical role of somatostatin analogues as antineoplastic agents: much ado about nothing?, *Ann Oncol* 2002, 13:653-668
153. Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA: Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands, *Eur J Nucl Med* 2001, 28:836-846
154. Pawlikowski M, Melen-Mucha G: Perspectives of new potential therapeutic applications of somatostatin analogs, *Neuro Endocrinol Lett* 2003, 24:21-27
155. Sharma K, Patel YC, Srikant CB: Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3, *Mol Endocrinol* 1996, 10:1688-1696
156. Hofland LJ, Lamberts SW: The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance, *Endocr Rev* 2003, 24:28-47
157. Bauer W, Briner U, Doepfner W, Haller R, Huguenin R, Marbach P, Petcher TJ, Pless: SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action, *Life Sci* 1982, 31:1133-1140
158. Bruns C, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G: SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile, *Eur J Endocrinol* 2002, 146:707-716
159. Buscail L, Saint-Laurent N, Chastre E, Vaillant JC, Gespach C, Capella G, Kalthoff H, Lluís F, Vaysse N, Susini C: Loss of sst2 somatostatin receptor gene expression in human pancreatic

Bibliografia

- and colorectal cancer, *Cancer Res* 1996, 56:1823-1827
160. Guillermet J, Saint-Laurent N, Rochaix P, Cuvillier O, Levade T, Schally AV, Pradayrol L, Buscail L, Susini C, Bousquet C: Somatostatin receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:155-160
161. Guillermet-Guibert J, Saint-Laurent N, Davenne L, Rochaix P, Cuvillier O, Culler MD, Pradayrol L, Buscail L, Susini C, Bousquet C: Novel synergistic mechanism for sst2 somatostatin and TNFalpha receptors to induce apoptosis: crosstalk between NF-kappaB and JNK pathways, *Cell Death Differ* 2007, 14:197-208
162. Bousquet C, Guillermet-Guibert J, Saint-Laurent N, Archer-Lahlou E, Lopez F, Fanjul M, Ferrand A, Fourmy D, Pichereaux C, Monsarrat B, Pradayrol L, Esteve JP, Susini C: Direct binding of p85 to sst2 somatostatin receptor reveals a novel mechanism for inhibiting PI3K pathway, *EMBO J* 2006, 25:3943-3954
163. Kilian M, Gregor JI, Heukamp I, Helmecke K, Hanel M, Wassersleben B, Walz MK, Schimke I, Kristiansen G, Wenger FA: Impact of Octreotide and SOM-230 on liver metastasis and hepatic lipidperoxidation in ductal pancreatic adenocarcinoma in Syrian Hamster, *Clin Exp Metastasis* 2009, 26:719-727
164. Wenger FA, Kilian M, Mautsch I, Jacobi CA, Steiert A, Peter FJ, Guski H, Schimke I, Muller JM: Influence of octreotide on liver metastasis and hepatic lipid peroxidation in BOP-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters, *Pancreas* 2001, 23:266-272
165. Wenger FA, Kilian M, Mautsch I, Jacobi CA, Schimke I, Saul GJ, Guski H, Muller JM: Influence of octreotide and tamoxifen on tumor growth and liver metastasis in N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters, *Horm Res* 2000, 54:74-77
166. Valencak J, Heere-Ress E, Traub-Weidinger T, Raderer M, Schneeberger A, Thalhammer T, Aust S, Hamilton G, Virgolini I, Pehamberger H: Somatostatin receptor scintigraphy with 111In-DOTA-lanreotide and 111In-DOTA-Tyr3-octreotide in patients with stage IV melanoma: in-vitro and in-vivo results, *Melanoma Res* 2005, 15:523-529
167. Hofland LJ, Lamberts SW: Somatostatin receptor subtype expression in human tumors, *Ann Oncol* 2001, 12 Suppl 2:S31-36
168. Martinez-Alonso M, Llecha N, Mayorga ME, Sorolla A, Dolcet X, Sanmartin V, Abal L, Casanova JM, Baradad M, Yeramian A, Egido R, Puig S, Vilella R, Matias-Guiu X, Marti RM: Expression of somatostatin receptors in human melanoma cell lines: effect of two different somatostatin analogues, octreotide and SOM230, on cell proliferation, *J Int Med Res* 2009, 37:1813-1822
169. Ardjomand N, Schaffler G, Radner H, El-Shabrawi Y: Expression of somatostatin receptors in uveal melanomas, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, 44:980-987
170. Lum SS, Fletcher WS, O'Dorisio MS, Nance RW, Pommier RF, Caprara M: Distribution and functional significance of somatostatin receptors in malignant melanoma, *World J Surg* 2001, 25:407-412
171. Schwab RE, Froidevaux S, Paku S, Tejada M, Szende B, Pap A, Beglinger C, Eberle AN, Keri G: Antiproliferative efficacy of the

- somatostatin analogue TT-232 in human melanoma cells and tumours, *Anticancer Res* 2001, 21:71-75
172. Tejada M, Gaal D, Barna K, Csuka O, Keri G: The antitumor activity of the somatostatin structural derivative (TT-232) on different human tumor xenografts, *Anticancer Res* 2003, 23:4061-4066
173. Tejada M, Gaal D, Hullan L, Hegymegi-Barakonyi B, Keri G: Evaluation of the antitumor efficacy of the somatostatin structural derivative TT-232 on different tumor models, *Anticancer Res* 2006, 26:3477-3483
174. Keri G, Erchegeyi J, Horvath A, Mezo I, Idei M, Vantus T, Balogh A, Vadasz Z, Bokonyi G, Seprodi J, Teplan I, Csuka O, Tejada M, Gaal D, Szegedi Z, Szende B, Roze C, Kalthoff H, Ullrich A: A tumor-selective somatostatin analog (TT-232) with strong in vitro and in vivo antitumor activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93:12513-12518
175. Szende B, Horvath A, Bokonyi G, Keri G: Effect of a novel somatostatin analogue combined with cytotoxic drugs on human tumour xenografts and metastasis of B16 melanoma, *Br J Cancer* 2003, 88:132-136
176. Szende B, Keri G: TT-232: a somatostatin structural derivative as a potent antitumor drug candidate, *Anticancer Drugs* 2003, 14:585-588
177. Adams J: The proteasome: a suitable antineoplastic target, *Nat Rev Cancer* 2004, 4:349-360
178. Brooks P, Fuertes G, Murray RZ, Bose S, Knecht E, Rechsteiner MC, Hendil KB, Tanaka K, Dyson J, Rivett J: Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells, *Biochem J* 2000, 346 Pt 1:155-161
179. Peters JM, Cejka Z, Harris JR, Kleinschmidt JA, Baumeister W: Structural features of the 26 S proteasome complex, *J Mol Biol* 1993, 234:932-937
180. Schrader EK, Harstad KG, Matouschek A: Targeting proteins for degradation, *Nat Chem Biol* 2009, 5:815-822
181. Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP: Proteasome system of protein degradation and processing, *Biochemistry (Mosc)* 2009, 74:1411-1442
182. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T: The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B, *Cell* 1994, 78:773-785
183. Ling YH, Liebes L, Ng B, Buckley M, Elliott PJ, Adams J, Jiang JD, Muggia FM, Perez-Soler R: PS-341, a novel proteasome inhibitor, induces Bcl-2 phosphorylation and cleavage in association with G2-M phase arrest and apoptosis, *Mol Cancer Ther* 2002, 1:841-849
184. Yuan BZ, Chapman J, Reynolds SH: Proteasome inhibitors induce apoptosis in human lung cancer cells through a positive feedback mechanism and the subsequent Mcl-1 protein cleavage, *Oncogene* 2009, 28:3775-3786
185. Chen S, Blank JL, Peters T, Liu XJ, Rappoli DM, Pickard MD, Menon S, Yu J, Driscoll DL, Lingaraj T, Burkhardt AL, Chen W, Garcia K, Sappal DS, Gray J, Hales P, Leroy PJ, Ringeling J, Rabino C, Spelman JJ, Morgenstern JP, Lightcap ES: Genome-wide siRNA screen for modulators of cell death induced by proteasome inhibitor bortezomib, *Cancer Res* 2010, 70:4318-4326
186. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, Munshi NC, Treon SP, Anderson KC: Apoptotic signaling induced by

Bibliografia

- immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications, *Blood* 2002, 99:4525-4530
187. Yin D, Zhou H, Kumagai T, Liu G, Ong JM, Black KL, Koeffler HP: Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM), *Oncogene* 2005, 24:344-354
188. Bogner C, Schnell F, Hipp S, Ringshausen I, Peschel C, Decker T: Cycling B-CLL cells are highly susceptible to inhibition of the proteasome: involvement of p27, early D-type cyclins, Bax, and caspase-dependent and -independent pathways, *Exp Hematol* 2003, 31:218-225
189. Fernandez Y, Verhaegen M, Miller TP, Rush JL, Steiner P, Pipari AW, Jr., Lowe SW, Soengas MS: Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications, *Cancer Res* 2005, 65:6294-6304
190. Dai Y, Chen S, Wang L, Pei XY, Kramer LB, Dent P, Grant S: Bortezomib interacts synergistically with belinostat in human acute myeloid leukaemia and acute lymphoblastic leukaemia cells in association with perturbation in NF-kappaB and Bim, *Br J Haematol* 2011,
191. Chen D, Dou QP: The ubiquitin-proteasome system as a prospective molecular target for cancer treatment and prevention, *Curr Protein Pept Sci* 2010, 11:459-470
192. Voorhees PM, Orlowski RZ: The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006, 46:189-213
193. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW: NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit, *Nat Rev Cancer* 2002, 2:301-310
194. Gilmore TD: Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel, *Oncogene* 1999, 18:6925-6937
195. Ghosh S, May MJ, Kopp EB: NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses, *Annu Rev Immunol* 1998, 16:225-260
196. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X: NF-kB in development and progression of human cancer, *Virchows Arch* 2005, 446:475-482
197. Karin M, Ben-Neriah Y: Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity, *Annu Rev Immunol* 2000, 18:621-663
198. Solan NJ, Miyoshi H, Carmona EM, Bren GD, Paya CV: RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100, *J Biol Chem* 2002, 277:1405-1418
199. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M: Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway, *Science* 2001, 293:1495-1499
200. Masdehors P, Omura S, Merle-Beral H, Mentz F, Cosset JM, Dumont J, Magdelenat H, Delic J: Increased sensitivity of CLL-derived lymphocytes to apoptotic death activation by the proteasome-specific inhibitor lactacystin, *Br J Haematol* 1999, 105:752-757
201. Kudo Y, Takata T, Ogawa I, Kaneda T, Sato S, Takekoshi T, Zhao M, Miyauchi M, Nikai H: p27Kip1 accumulation by inhibition of proteasome function induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells, *Clin Cancer Res* 2000, 6:916-923

202. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC: The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells, *Cancer Res* 2001, 61:3071-3076
203. Dick LR, Fleming PE: Building on bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anti-cancer therapy, *Drug Discov Today* 2010, 15:243-249
204. Wilk S, Orłowski M: Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex, *J Neurochem* 1983, 40:842-849
205. Elliott PJ, Zollner TM, Boehncke WH: Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy, *J Mol Med (Berl)* 2003, 81:235-245
206. Ong DS, Mu TW, Palmer AE, Kelly JW: Endoplasmic reticulum Ca²⁺ increases enhance mutant glucocerebrosidase proteostasis, *Nat Chem Biol* 2010, 6:424-432
207. Meng L, Mohan R, Kwok BH, Elofsson M, Sin N, Crews CM: Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:10403-10408
208. Adams J: Development of the proteasome inhibitor PS-341, *Oncologist* 2002, 7:9-16
209. Adams J, Behnke M, Chen S, Cruickshank AA, Dick LR, Grenier L, Klunder JM, Ma YT, Plamondon L, Stein RL: Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids, *Bioorg Med Chem Lett* 1998, 8:333-338
210. Jones MD, Liu JC, Barthel TK, Hussain S, Lovria E, Cheng D, Schoonmaker JA, Mulay S, Ayers DC, Bouxsein ML, Stein GS, Mukherjee S, Lian JB: A proteasome inhibitor, bortezomib, inhibits breast cancer growth and reduces osteolysis by downregulating metastatic genes, *Clin Cancer Res* 2010, 16:4978-4989
211. Periyasamy-Thandavan S, Jackson WH, Samaddar JS, Erickson B, Barrett JR, Raney L, Gopal E, Ganapathy V, Hill WD, Bhalla KN, Schoenlein PV: Bortezomib blocks the catabolic process of autophagy via a cathepsin-dependent mechanism, affects endoplasmic reticulum stress and induces caspase-dependent cell death in antiestrogen-sensitive and resistant ER+ breast cancer cells, *Autophagy* 2010, 6:19-35
212. Bavi P, Uddin S, Ahmed M, Jehan Z, Bu R, Abubaker J, Sultana M, Al-Sanea N, Abduljabbar A, Ashari LH, Alhomoud S, Al-Dayel F, Prabhakaran S, Hussain AR, Al-Kuraya KS: Bortezomib stabilizes mitotic cyclins and prevents cell cycle progression via inhibition of UBE2C in colorectal carcinoma, *Am J Pathol* 2011, 178:2109-2120
213. Uddin S, Ahmed M, Bavi P, El-Sayed R, Al-Sanea N, Abduljabbar A, Ashari LH, Alhomoud S, Al-Dayel F, Hussain AR, Al-Kuraya KS: Bortezomib (Velcade) induces p27Kip1 expression through S-phase kinase protein 2 degradation in colorectal cancer, *Cancer Res* 2008, 68:3379-3388
214. Pasquini L, Petronelli A, Petrucci E, Saulle E, Mariani G, Scambia G, Benedetti-Panici P, Greggi S, Cognetti F, Testa U: Primary ovarian cancer cells are sensitive to the proapoptotic effects of proteasome inhibitors, *Int J Oncol* 2010, 36:707-713
215. Bruning A, Burger P, Vogel M, Rahmeh M, Friese K, Lenhard M, Burges A: Bortezomib treatment of ovarian cancer cells mediates endoplasmic reticulum

Bibliografia

- stress, cell cycle arrest, and apoptosis, *Invest New Drugs* 2008,
216. Yeung BH, Huang DC, Sinicrope FA: PS-341 (bortezomib) induces lysosomal cathepsin B release and a caspase-2-dependent mitochondrial permeabilization and apoptosis in human pancreatic cancer cells, *J Biol Chem* 2006, 281:11923-11932
217. Christian PA, Thorpe JA, Schwarze SR: Velcade sensitizes prostate cancer cells to TRAIL induced apoptosis and suppresses tumor growth in vivo, *Cancer Biol Ther* 2009, 8:73-80
218. Lashinger LM, Zhu K, Williams SA, Shrader M, Dinney CP, McConkey DJ: Bortezomib abolishes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance via a p21-dependent mechanism in human bladder and prostate cancer cells, *Cancer Res* 2005, 65:4902-4908
219. Lioni M, Noma K, Snyder A, Klein-Szanto A, Diehl JA, Rustgi AK, Herlyn M, Smalley KS: Bortezomib induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells through activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, *Mol Cancer Ther* 2008, 7:2866-2875
220. Lorch JH, Thomas TO, Schmoll HJ: Bortezomib inhibits cell-cell adhesion and cell migration and enhances epidermal growth factor receptor inhibitor-induced cell death in squamous cell cancer, *Cancer Res* 2007, 67:727-734
221. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, Rajkumar SV, Srkalovic G, Alsina M, Alexanian R, Siegel D, Orlovski RZ, Kuter D, Limentani SA, Lee S, Hideshima T, Esseltine DL, Kauffman M, Adams J, Schenkein DP, Anderson KC: A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma, *N Engl J Med* 2003, 348:2609-2617
222. Kupperman E, Lee EC, Cao Y, Bannerman B, Fitzgerald M, Berger A, Yu J, Yang Y, Hales P, Bruzzese F, Liu J, Blank J, Garcia K, Tsu C, Dick L, Fleming P, Yu L, Manfredi M, Rolfe M, Bolen J: Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer, *Cancer Res* 2010, 70:1970-1980
223. Piva R, Ruggeri B, Williams M, Costa G, Tamagno I, Ferrero D, Gai V, Coscia M, Peola S, Massaia M, Pezzoni G, Allievi C, Pescalli N, Cassin M, di Giovine S, Nicoli P, de Feudis P, Strepponi I, Roato I, Ferracini R, Bussolati B, Camussi G, Jones-Bolin S, Hunter K, Zhao H, Neri A, Palumbo A, Berkers C, Ova H, Bernareggi A, Inghirami G: CEP-18770: A novel, orally active proteasome inhibitor with a tumor-selective pharmacologic profile competitive with bortezomib, *Blood* 2008, 111:2765-2775
224. Sterz J, von Metzler I, Hahne JC, Lamottke B, Rademacher J, Heider U, Terpos E, Sezer O: The potential of proteasome inhibitors in cancer therapy, *Expert Opin Investig Drugs* 2008, 17:879-895
225. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, Demo SD, Bennett MK, van Leeuwen FW, Chanan-Khan AA, Orlovski RZ: Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma, *Blood* 2007, 110:3281-3290
226. Zhou HJ, Aujay MA, Bennett MK, Dajee M, Demo SD, Fang Y, Ho MN, Jiang J, Kirk CJ, Laidig GJ, Lewis ER, Lu Y, Muchamuel T, Parlanti F, Ring E, Shenk KD, Shields J, Shwonek PJ, Stanton T, Sun CM, Sylvain C, Woo TM, Yang J: Design and synthesis of

- an orally bioavailable and selective peptide epoxyketone proteasome inhibitor (PR-047), *J Med Chem* 2009, 52:3028-3038
227. Joazeiro CA, Anderson KC, Hunter T: Proteasome inhibitor drugs on the rise, *Cancer Res* 2006, 66:7840-7842
228. Feling RH, Buchanan GO, Mincer TJ, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W: Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus salinospora, *Angew Chem Int Ed Engl* 2003, 42:355-357
229. Chauhan D, Catley L, Li G, Podar K, Hideshima T, Velankar M, Mitsiades C, Mitsiades N, Yasui H, Letai A, Ovaia H, Berkers C, Nicholson B, Chao TH, Neuteboom ST, Richardson P, Palladino MA, Anderson KC: A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib, *Cancer Cell* 2005, 8:407-419
230. Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM: Toward a molecular classification of melanoma, *J Clin Oncol* 2007, 25:1606-1620
231. Rother J, Jones D: Molecular markers of tumor progression in melanoma, *Curr Genomics* 2009, 10:231-239
232. Nathanson KL: Using genetics and genomics strategies to personalize therapy for cancer: focus on melanoma, *Biochem Pharmacol* 2010, 80:755-761
233. Borner C, Schlagbauer Wadl H, Fellay I, Selzer E, Polterauer P, Jansen B: Mutated N-ras upregulates Bcl-2 in human melanoma in vitro and in SCID mice, *Melanoma Res* 1999, 9:347-350
234. Satyamoorthy K, Chehab NH, Waterman MJ, Lien MC, El-Deiry WS, Herlyn M, Halazonetis TD: Aberrant regulation and function of wild-type p53 in radioresistant melanoma cells, *Cell Growth Differ* 2000, 11:467-474
235. Yang J, Amiri KI, Burke JR, Schmid JA, Richmond A: BMS-345541 targets inhibitor of kappaB kinase and induces apoptosis in melanoma: involvement of nuclear factor kappaB and mitochondria pathways, *Clin Cancer Res* 2006, 12:950-960
236. Sosman JA, Puzanov I: Molecular targets in melanoma from angiogenesis to apoptosis, *Clin Cancer Res* 2006, 12:2376s-2383s
237. Qin JZ, Ziffra J, Stennett L, Bodner B, Bonish BK, Chaturvedi V, Bennett F, Pollock PM, Trent JM, Hendrix MJ, Rizzo P, Miele L, Nickoloff BJ: Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells, *Cancer Res* 2005, 65:6282-6293
238. Markovic SN, Geyer SM, Dawkins F, Sharfman W, Albertini M, Maples W, Fracasso PM, Fitch T, Lorusso P, Adjei AA, Erlichman C: A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma, *Cancer* 2005, 103:2584-2589
239. Amiri KI, Horton LW, LaFleur BJ, Sosman JA, Richmond A: Augmenting chemosensitivity of malignant melanoma tumors via proteasome inhibition: implication for bortezomib (VELCADE, PS-341) as a therapeutic agent for malignant melanoma, *Cancer Res* 2004, 64:4912-4918
240. Mlynarczuk-Bialy I, Roeckmann H, Kuckelkorn U, Schmidt B, Umbreen S, Golab J, Ludwig A, Montag C, Wiebusch L, Hagemeyer C, Schadendorf D, Kloetzel PM, Seifert U: Combined effect of proteasome and calpain inhibition on cisplatin-resistant human melanoma cells, *Cancer Res* 2006, 66:7598-7605

Bibliografia

241. Amschler K, Schon MP, Pletz N, Wallbrecht K, Erpenbeck L, Schon M: NF-kappaB inhibition through proteasome inhibition or IKKbeta blockade increases the susceptibility of melanoma cells to cytostatic treatment through distinct pathways, *J Invest Dermatol* 2010, 130:1073-1086
242. Su Y, Amiri KI, Horton LW, Yu Y, Ayers GD, Koehler E, Kelley MC, Puzanov I, Richmond A, Sosman JA: A phase I trial of bortezomib with temozolomide in patients with advanced melanoma: toxicities, antitumor effects, and modulation of therapeutic targets, *Clin Cancer Res* 2010, 16:348-357
243. Lesinski GB, Benninger K, Kreiner M, Quimper M, Young G, Carson WE, 3rd: Bortezomib pre-treatment prolongs interferon-alpha-induced STAT1 phosphorylation in melanoma cells, *Cancer Immunol Immunother* 2009, 58:2031-2037
244. Lesinski GB, Raig ET, Guenterberg K, Brown L, Go MR, Shah NN, Lewis A, Quimper M, Hade E, Young G, Chaudhury AR, Ladner KJ, Guttridge DC, Bouchard P, Carson WE, 3rd: IFN-alpha and bortezomib overcome Bcl-2 and Mcl-1 overexpression in melanoma cells by stimulating the extrinsic pathway of apoptosis, *Cancer Res* 2008, 68:8351-8360
245. Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, Chiao PJ, Andreeff M, Meyn RE: Inhibition of constitutively activated nuclear factor-kappaB radiosensitizes human melanoma cells, *Mol Cancer Ther* 2004, 3:985-992
246. Pallares J, Martinez-Guitarte JL, Dolcet X, Llobet D, Rue M, Palacios J, Prat J, Matias-Guiu X: Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma, *J Pathol* 2004, 204:569-577
247. Dolcet X, Llobet D, Encinas M, Pallares J, Cabero A, Schoenenberger JA, Comella JX, Matias-Guiu X: Proteasome inhibitors induce death but activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants, *J Biol Chem* 2006, 281:22118-22130
248. Blume-Jensen P, Hunter T: Oncogenic kinase signalling, *Nature* 2001, 411:355-365
249. Ullrich A, Schlessinger J: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity, *Cell* 1990, 61:203-212
250. Lemmon MA, Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell* 2010, 141:1117-1134
251. Ward CW, Lawrence MC, Streltsov VA, Adams TE, McKern NM: The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation, *Trends Biochem Sci* 2007, 32:129-137
252. Clayton AH, Walker F, Orchard SG, Henderson C, Fuchs D, Rothacker J, Nice EC, Burgess AW: Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-A multidimensional microscopy analysis, *J Biol Chem* 2005, 280:30392-30399
253. Cobb MH, Sang BC, Gonzalez R, Goldsmith E, Ellis L: Autophosphorylation activates the soluble cytoplasmic domain of the insulin receptor in an intermolecular reaction, *J Biol Chem* 1989, 264:18701-18706
254. Pawson T: Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems, *Cell* 2004, 116:191-203
255. Schlessinger J, Lemmon MA: SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling, *Sci STKE* 2003, 2003:RE12

256. Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell* 2000, 103:211-225
257. Massie C, Mills IG: The developing role of receptors and adaptors, *Nat Rev Cancer* 2006, 6:403-409
258. Temin HM: Studies on carcinogenesis by avian sarcoma viruses. 3. The differential effect of serum and polyanions on multiplication of uninfected and converted cells, *J Natl Cancer Inst* 1966, 37:167-175
259. Doolittle RF, Hunkapiller MW, Hood LE, Devare SG, Robbins KC, Aaronson SA, Antoniades HN: Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor, *Science* 1983, 221:275-277
260. Waterfield MD, Scrace GT, Whittle N, Stroobant P, Johnsson A, Wasteson A, Westermark B, Heldin CH, Huang JS, Deuel TF: Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus, *Nature* 1983, 304:35-39
261. Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger J, Waterfield MD: Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences, *Nature* 1984, 307:521-527
262. Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, Whittle N, Waterfield MD, Ullrich A, Schlessinger J: Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin, *Nature* 1985, 313:144-147
263. Forbes SA, Tang G, Bindal N, Bamford S, Dawson E, Cole C, Kok CY, Jia M, Ewing R, Menzies A, Teague JW, Stratton MR, Futreal PA: COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer, *Nucleic Acids Res* 2010, 38:D652-657
264. Corless CL, Heinrich MC: Molecular pathobiology of gastrointestinal stromal sarcomas, *Annu Rev Pathol* 2008, 3:557-586
265. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S: An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors, *Mol Cell* 2003, 12:541-552
266. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al.: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, *Science* 1989, 244:707-712
267. Lee JC, Vivanco I, Beroukhim R, Huang JH, Feng WL, DeBiasi RM, Yoshimoto K, King JC, Nghiemphu P, Yuza Y, Xu Q, Greulich H, Thomas RK, Paez JG, Peck TC, Linhart DJ, Glatt KA, Getz G, Onofrio R, Ziaugra L, Levine RL, Gabriel S, Kawaguchi T, O'Neill K, Khan H, Liau LM, Nelson SF, Rao PN, Mischel P, Pieper RO, Cloughesy T, Leahy DJ, Sellers WR, Sawyers CL, Meyerson M, Mellinghoff IK: Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain, *PLoS Med* 2006, 3:e485
268. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA: Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer, *Nat Rev Cancer* 2007, 7:169-181
269. Red Brewer M, Choi SH, Alvarado D, Moravcevic K, Pozzi A, Lemmon MA, Carpenter G: The juxtamembrane region of the EGF

Bibliografia

- receptor functions as an activation domain, *Mol Cell* 2009, 34:641-651
270. Parikh AA, Ellis LM: The vascular endothelial growth factor family and its receptors, *Hematol Oncol Clin North Am* 2004, 18:951-971, vii
271. Ranieri G, Patruno R, Ruggieri E, Montemurro S, Valerio P, Ribatti D: Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: from the biology to the clinic, *Curr Med Chem* 2006, 13:1845-1857
272. Heldin CH, Westermark B, Wasteson A: Specific receptors for platelet-derived growth factor on cells derived from connective tissue and glia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, 78:3664-3668
273. Goustin AS, Betsholtz C, Pfeifer-Ohlsson S, Persson H, Rydnert J, Bywater M, Holmgren G, Heldin CH, Westermark B, Ohlsson R: Coexpression of the sis and myc proto-oncogenes in developing human placenta suggests autocrine control of trophoblast growth, *Cell* 1985, 41:301-312
274. Jones AV, Cross NC: Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors, *Cell Mol Life Sci* 2004, 61:2912-2923
275. Sedlacek HH: Kinase inhibitors in cancer therapy: a look ahead, *Drugs* 2000, 59:435-476
276. Sundberg C, Ljungstrom M, Lindmark G, Gerdin B, Rubin K: Microvascular pericytes express platelet-derived growth factor-beta receptors in human healing wounds and colorectal adenocarcinoma, *Am J Pathol* 1993, 143:1377-1388
277. Brazil DP, Hemmings BA: Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow, *Trends Biochem Sci* 2001, 26:657-664
278. Lawlor MA, Alessi DR: PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?, *J Cell Sci* 2001, 114:2903-2910
279. Cantley LC, Neel BG: New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:4240-4245
280. Hay N, Sonenberg N: Upstream and downstream of mTOR, *Genes Dev* 2004, 18:1926-1945
281. Inoki K, Zhu T, Guan KL: TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival, *Cell* 2003, 115:577-590
282. Tokunaga C, Yoshino K, Yonezawa K: mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways, *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 313:443-446
283. Hay N: The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer, *Cancer Cell* 2005, 8:179-183
284. Katz M, Amit I, Yarden Y: Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases, *Biochim Biophys Acta* 2007, 1773:1161-1176
285. Levy DE, Darnell JE, Jr.: Stats: transcriptional control and biological impact, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3:651-662
286. Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J: Raf-1 activates MAP kinase-kinase, *Nature* 1992, 358:417-421
287. Yoon S, Seger R: The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions, *Growth Factors* 2006, 24:21-44
288. Murphy LO, Blenis J: MAPK signal specificity: the right place at the right time, *Trends Biochem Sci* 2006, 31:268-275
289. Shawver LK, Slamon D, Ullrich A: Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy, *Cancer Cell* 2002, 1:117-123

290. Arora A, Scholar EM: Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy, *J Pharmacol Exp Ther* 2005, 315:971-979
291. Reichert JM, Valge-Archer VE: Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics, *Nat Rev Drug Discov* 2007, 6:349-356
292. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB: Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells, *Nat Med* 1996, 2:561-566
293. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y: Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors, *Science* 1998, 279:577-580
294. Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Ziegler AJ: Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor, *Blood* 2000, 96:925-932
295. Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB, Murray LJ, Carver J, Chan E, Moss KG, Haznedar JO, Sukbuntherng J, Blake RA, Sun L, Tang C, Miller T, Shirazian S, McMahon G, Cherrington JM: In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, *Clin Cancer Res* 2003, 9:327-337
296. Atkins M, Jones CA, Kirkpatrick P: Sunitinib maleate, *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5:279-280
297. Smolich BD, Yuen HA, West KA, Giles FJ, Albitar M, Cherrington JM: The antiangiogenic protein kinase inhibitors SU5416 and SU6668 inhibit the SCF receptor (c-kit) in a human myeloid leukemia cell line and in acute myeloid leukemia blasts, *Blood* 2001, 97:1413-1421
298. Giles FJ, Stopeck AT, Silverman LR, Lancet JE, Cooper MA, Hannah AL, Cherrington JM, O'Farrell AM, Yuen HA, Louie SG, Hong W, Cortes JE, Verstovsek S, Albitar M, O'Brien SM, Kantarjian HM, Karp JE: SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes, *Blood* 2003, 102:795-801
299. Sun L, Liang C, Shirazian S, Zhou Y, Miller T, Cui J, Fukuda JY, Chu JY, Nematalla A, Wang X, Chen H, Sistla A, Luu TC, Tang F, Wei J, Tang C: Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase, *J Med Chem* 2003, 46:1116-1119
300. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer, *Cell* 2000, 100:57-70
301. Ikezoe T, Nishioka C, Tasaka T, Yang Y, Komatsu N, Togitani K, Koeffler HP, Taguchi H: The antitumor effects of sunitinib (formerly SU11248) against a variety of human hematologic malignancies: enhancement of growth inhibition via inhibition of mammalian target of rapamycin signaling, *Mol Cancer Ther* 2006, 5:2522-2530
302. Ikezoe T, Yang Y, Nishioka C, Bandobashi K, Nakatani H,

Bibliografia

- Taguchi T, Koeffler HP, Taguchi H: Effect of SU11248 on gastrointestinal stromal tumor-T1 cells: enhancement of growth inhibition via inhibition of 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling, *Cancer Sci* 2006, 97:945-951
303. Miller SC, Huang R, Sakamuru S, Shukla SJ, Attene-Ramos MS, Shinn P, Van Leer D, Leister W, Austin CP, Xia M: Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-kappaB signaling and their mechanism of action, *Biochem Pharmacol* 2010, 79:1272-1280
304. Yoshida H, Kunisada T, Grimm T, Nishimura EK, Nishioka E, Nishikawa SI: Review: melanocyte migration and survival controlled by SCF/c-kit expression, *J Invest Dermatol Symp Proc* 2001, 6:1-5
305. Natali PG, Nicotra MR, Winkler AB, Cavaliere R, Bigotti A, Ullrich A: Progression of human cutaneous melanoma is associated with loss of expression of c-kit proto-oncogene receptor, *Int J Cancer* 1992, 52:197-201
306. Shen SS, Zhang PS, Eton O, Prieto VG: Analysis of protein tyrosine kinase expression in melanocytic lesions by tissue array, *J Cutan Pathol* 2003, 30:539-547
307. Zakut R, Perlis R, Eliyahu S, Yarden Y, Givol D, Lyman SD, Halaban R: KIT ligand (mast cell growth factor) inhibits the growth of KIT-expressing melanoma cells, *Oncogene* 1993, 8:2221-2229
308. Huang S, Luca M, Gutman M, McConkey DJ, Langley KE, Lyman SD, Bar-Eli M: Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential, *Oncogene* 1996, 13:2339-2347
309. Ugurel S, Hildenbrand R, Zimpfer A, La Rosee P, Paschka P, Sucker A, Keikavoussi P, Becker JC, Rittgen W, Hochhaus A, Schadendorf D: Lack of clinical efficacy of imatinib in metastatic melanoma, *Br J Cancer* 2005, 92:1398-1405
310. Wyman K, Atkins MB, Prieto V, Eton O, McDermott DF, Hubbard F, Byrnes C, Sanders K, Sosman JA: Multicenter Phase II trial of high-dose imatinib mesylate in metastatic melanoma: significant toxicity with no clinical efficacy, *Cancer* 2006, 106:2005-2011
311. Mayorga ME, Sanchis D, Perez de Santos AM, Velasco A, Dolcet X, Casanova JM, Baradad M, Egido R, Pallares J, Espurz N, Benitez D, Mila J, Malveyh J, Castel T, Comella JX, Matias-Guiu X, Vilella R, Marti RM: Antiproliferative effect of STI571 on cultured human cutaneous melanoma-derived cell lines, *Melanoma Res* 2006, 16:127-135
312. Lefevre G, Glotin AL, Calipel A, Mouriaux F, Tran T, Kherrouche Z, Maurage CA, Auclair C, Mascarelli F: Roles of stem cell factor/c-Kit and effects of Glivec/STI571 in human uveal melanoma cell tumorigenesis, *J Biol Chem* 2004, 279:31769-31779
313. Went PT, Dirnhofer S, Bundi M, Mirlacher M, Schraml P, Mangialaio S, Dimitrijevic S, Kononen J, Lugli A, Simon R, Sauter G: Prevalence of KIT expression in human tumors, *J Clin Oncol* 2004, 22:4514-4522
314. Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, Layfield LJ: Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis, *Hum Pathol* 2005, 36:486-493
315. Becker JC, Brocker EB, Schadendorf D, Ugurel S: Imatinib

- in melanoma: a selective treatment option based on KIT mutation status?, *J Clin Oncol* 2007, 25:e9
316. Fisher DE, Barnhill R, Hodi FS, Herlyn M, Merlino G, Medrano E, Bastian B, Landi MT, Sosman J: Melanoma from bench to bedside: meeting report from the 6th international melanoma congress, *Pigment Cell Melanoma Res* 2010, 23:14-26
317. Davies MA, Samuels Y: Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma, *Oncogene* 2010, 29:5545-5555
318. Handolias D, Hamilton AL, Salemi R, Tan A, Moodie K, Kerr L, Dobrovic A, McArthur GA: Clinical responses observed with imatinib or sorafenib in melanoma patients expressing mutations in KIT, *Br J Cancer* 2010, 102:1219-1223
319. Garrido MC, Bastian BC: KIT as a therapeutic target in melanoma, *J Invest Dermatol* 2010, 130:20-27
320. Woodman SE, Davies MA: Targeting KIT in melanoma: a paradigm of molecular medicine and targeted therapeutics, *Biochem Pharmacol* 2010, 80:568-574
321. Friedlander P, Hodi FS: Advances in targeted therapy for melanoma, *Clin Adv Hematol Oncol* 2010, 8:619-627
322. Hodi FS, Friedlander P, Corless CL, Heinrich MC, Mac Rae S, Kruse A, Jagannathan J, Van den Abbeele AD, Velazquez EF, Demetri GD, Fisher DE: Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma, *J Clin Oncol* 2008, 26:2046-2051
323. Lutzky J, Bauer J, Bastian BC: Dose-dependent, complete response to imatinib of a metastatic mucosal melanoma with a K642E KIT mutation, *Pigment Cell Melanoma Res* 2008, 21:492-493
324. Satzger I, Kuttler U, Volker B, Schenck F, Kapp A, Gutzmer R: Anal mucosal melanoma with KIT-activating mutation and response to imatinib therapy--case report and review of the literature, *Dermatology* 2010, 220:77-81
325. Woodman SE, Trent JC, Stemke-Hale K, Lazar AJ, Pricl S, Pavan GM, Fermeglia M, Gopal YN, Yang D, Podoloff DA, Ivan D, Kim KB, Papadopoulos N, Hwu P, Mills GB, Davies MA: Activity of dasatinib against L576P KIT mutant melanoma: molecular, cellular, and clinical correlates, *Mol Cancer Ther* 2009, 8:2079-2085
326. Ashida A, Takata M, Murata H, Kido K, Saida T: Pathological activation of KIT in metastatic tumors of acral and mucosal melanomas, *Int J Cancer* 2009, 124:862-868
327. Barnhill RL, Xiao M, Graves D, Antoniades HN: Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-A, PDGF-B and the PDGF-alpha receptor, but not the PDGF-beta receptor, in human malignant melanoma in vivo, *Br J Dermatol* 1996, 135:898-904
328. Brychtova S, Bezdekova M, Brychta T, Tichy M: The role of vascular endothelial growth factors and their receptors in malignant melanomas, *Neoplasma* 2008, 55:273-279
329. Graeven U, Fiedler W, Karpinski S, Ergun S, Kilic N, Rodeck U, Schmiegel W, Hossfeld DK: Melanoma-associated expression of vascular endothelial growth factor and its receptors FLT-1 and KDR, *J Cancer Res Clin Oncol* 1999, 125:621-629
330. Alexis JB, Martinez AE, Lutzky J: An immunohistochemical evaluation of c-kit (CD-117) expression in malignant melanoma, and results of imatinib mesylate (Gleevec) therapy in

Bibliografia

- three patients, *Melanoma Res* 2005, 15:283-285
331. Graells J, Vinyals A, Figueras A, Llorens A, Moreno A, Marcoval J, Gonzalez FJ, Fabra A: Overproduction of VEGF concomitantly expressed with its receptors promotes growth and survival of melanoma cells through MAPK and PI3K signaling, *J Invest Dermatol* 2004, 123:1151-1161
332. Kim KB, Eton O, Davis DW, Frazier ML, McConkey DJ, Diwan AH, Papadopoulos NE, Bedikian AY, Camacho LH, Ross MI, Cormier JN, Gershenwald JE, Lee JE, Mansfield PF, Billings LA, Ng CS, Charnsangavej C, Bar-Eli M, Johnson MM, Murgo AJ, Prieto VG: Phase II trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma, *Br J Cancer* 2008, 99:734-740
333. Curtin JA, Pinkel D, Bastian BC: Absence of PDGFRA mutations in primary melanoma, *J Invest Dermatol* 2008, 128:488-489
334. Slomovitz BM, Broaddus RR, Schmandt R, Wu W, Oh JC, Ramondetta LM, Burke TW, Gershenson DM, Lu KH: Expression of imatinib mesylate-targeted kinases in endometrial carcinoma, *Gynecol Oncol* 2004, 95:32-36
335. Inoue M, Kyo S, Fujita M, Enomoto T, Kondoh G: Coexpression of the c-kit receptor and the stem cell factor in gynecological tumors, *Cancer Res* 1994, 54:3049-3053
336. Elmore LW, Domson K, Moore JR, Kornstein M, Burks RT: Expression of c-kit (CD117) in benign and malignant human endometrial epithelium, *Arch Pathol Lab Med* 2001, 125:146-151
337. Scobie JV, Acs G, Bandera CA, Blank SV, Wheeler JE, Pasha TL, Salscheider M, Zhang PJ: C-kit immunoreactivity in endometrial adenocarcinomas and its clinicopathologic significance, *Int J Gynecol Pathol* 2003, 22:149-155
338. Adams SF, Hickson JA, Hutto JY, Montag AG, Lengyel E, Yamada SD: PDGFR-alpha as a potential therapeutic target in uterine sarcomas, *Gynecol Oncol* 2007, 104:524-528
339. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF: Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma, *Cancer* 1996, 78:454-460
340. Yokoyama Y, Charnock-Jones DS, Licence D, Yanaihara A, Hastings JM, Holland CM, Emoto M, Sakamoto A, Sakamoto T, Maruyama H, Sato S, Mizunuma H, Smith SK: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and its receptor, VEGF receptor 3, as a prognostic factor in endometrial carcinoma, *Clin Cancer Res* 2003, 9:1361-1369
341. Niikura H, Sasano H, Matsunaga G, Watanabe K, Ito K, Sato S, Yajima A: Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in endometrioid endometrial carcinoma, *Hum Pathol* 1995, 26:892-896
342. Kacinski BM: CSF-1 and its receptor in ovarian, endometrial and breast cancer, *Ann Med* 1995, 27:79-85
343. Toy EP, Chambers JT, Kacinski BM, Flick MB, Chambers SK: The activated macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) receptor as a predictor of poor outcome in advanced epithelial ovarian carcinoma, *Gynecol Oncol* 2001, 80:194-200
344. Dutt A, Salvesen HB, Chen TH, Ramos AH, Onofrio RC, Hatton C, Nicoletti R, Winckler W, Grewal R, Hanna M, Wyhs N, Ziaugra L, Richter DJ, Trovik J, Engelsens IB, Stefansson IM, Fennell T, Cibulskis

- K, Zody MC, Akslen LA, Gabriel S, Wong KK, Sellers WR, Meyerson M, Greulich H: Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:8713-8717
345. Byron SA, Gartside MG, Wellens CL, Mallon MA, Keenan JB, Powell MA, Goodfellow PJ, Pollock PM: Inhibition of activated fibroblast growth factor receptor 2 in endometrial cancer cells induces cell death despite PTEN abrogation, *Cancer Res* 2008, 68:6902-6907
346. Yeramian A, Sorolla A, Velasco A, Santacana M, Dolcet X, Valls J, Abal L, Moreno S, Egido R, Casanova JM, Puig S, Vilella R, Llombart-Cussac A, Matias-Guiu X, Marti RM: Inhibition of activated receptor tyrosine kinases by Sunitinib induces growth arrest and sensitizes melanoma cells to Bortezomib by blocking Akt pathway, *Int J Cancer*
347. El-Salhy M, Starefeldt A: Direct effects of octreotide, galanin and serotonin on human colon cancer cells, *Oncology reports* 2003, 10:1723-1728
348. Lamberts SW, van der Lely AJ, Hofland LJ: New somatostatin analogs: will they fulfil old promises?, *Eur J Endocrinol* 2002, 146:701-705
349. Keller G, Schally AV, Nagy A, Baker B, Halmos G, Engel JB: Effective therapy of experimental human malignant melanomas with a targeted cytotoxic somatostatin analogue without induction of multi-drug resistance proteins, *Int J Oncol* 2006, 28:1507-1513
350. Weckbecker G, Briner U, Lewis I, Bruns C: SOM230: a new somatostatin peptidomimetic with potent inhibitory effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in rats, primates, and dogs, *Endocrinology* 2002, 143:4123-4130
351. Adams RL, Adams IP, Lindow SW, Atkin SL: Inhibition of endothelial proliferation by the somatostatin analogue SOM230, *Clinical endocrinology* 2004, 61:431-436
352. Arena S, Pattarozzi A, Corsaro A, Schettini G, Florio T: Somatostatin receptor subtype-dependent regulation of nitric oxide release: involvement of different intracellular pathways, *Mol Endocrinol* 2005, 19:255-267
353. LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, Lentzsch S, Mitsiades CS, Mitsiades N, Neuberg D, Goloubeva O, Pien CS, Adams J, Gupta D, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC: Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model, *Cancer Res* 2002, 62:4996-5000
354. Nagy K, Szekely-Szuts K, Izeradjene K, Douglas L, Tillman M, Barti-Juhasz H, Dominici M, Spano C, Luca Cervo G, Conte P, Houghton JA, Mihalik R, Kopper L, Petak I: Proteasome inhibitors sensitize colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via enhanced release of Smac/DIABLO from the mitochondria, *Pathology oncology research : POR* 2006, 12:133-142
355. Pei XY, Dai Y, Grant S: Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors, *Clin Cancer Res* 2004, 10:3839-3852
356. Freudlsperger C, Thies A, Pfuller U, Schumacher U: The proteasome inhibitor bortezomib augments anti-proliferative effects of mistletoe lectin-I and the PPAR-gamma agonist rosiglitazone in human melanoma cells, *Anticancer Res* 2007, 27:207-213

Bibliografia

357. Schumacher LY, Vo DD, Garban HJ, Comin-Anduix B, Owens SK, Dissette VB, Glaspy JA, McBride WH, Bonavida B, Economou JS, Ribas A: Immunosensitization of tumor cells to dendritic cell-activated immune responses with the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341, Velcade), *J Immunol* 2006, 176:4757-4765
358. Chauhan D, Hideshima T, Anderson KC: A novel proteasome inhibitor NPI-0052 as an anticancer therapy, *Br J Cancer* 2006, 95:961-965
359. Vivier M, Jarrousse AS, Bouchon B, Galmier MJ, Auzeloux P, Sauzieres J, Madelmont JC: Preliminary studies of new proteasome inhibitors in the tumor targeting approach: synthesis and in vitro cytotoxicity, *J Med Chem* 2005, 48:6731-6740
360. Jiang W, Mikochik PJ, Ra JH, Lei H, Flaherty KT, Winkler JD, Spitz FR: HIV protease inhibitor nelfinavir inhibits growth of human melanoma cells by induction of cell cycle arrest, *Cancer Res* 2007, 67:1221-1227
361. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC: Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein, *Cell* 1992, 69:119-128
362. Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ: Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization, *EMBO J* 2003, 22:4385-4399
363. Dumont C, Durrbach A, Bidere N, Rouleau M, Kroemer G, Bernard G, Hirsch F, Charpentier B, Susin SA, Senik A: Caspase-independent commitment phase to apoptosis in activated blood T lymphocytes: reversibility at low apoptotic insult, *Blood* 2000, 96:1030-1038
364. Robinson MJ, Cobb MH: Mitogen-activated protein kinase pathways, *Current opinion in cell biology* 1997, 9:180-186
365. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M: Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors, *Oncogene* 1999, 18:813-822
366. Chou TC, Talalay P: Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, *Advances in enzyme regulation* 1984, 22:27-55
367. David E, Sun SY, Waller EK, Chen J, Khuri FR, Lonial S: The combination of the farnesyl transferase inhibitor lonafarnib and the proteasome inhibitor bortezomib induces synergistic apoptosis in human myeloma cells that is associated with down-regulation of p-AKT, *Blood* 2005, 106:4322-4329
368. Yeramian A, Sorolla A, Velasco A, Santacana M, Dolcet X, Valls J, Abal L, Moreno S, Egado R, Casanova JM, Puig S, Vilella R, Llombart-Cussac A, Matias-Guiu X, Marti RM: Inhibition of activated receptor tyrosine kinases by Sunitinib induces growth arrest and sensitizes melanoma cells to Bortezomib by blocking Akt pathway, *Int J Cancer* 2011,
369. Jeong WJ, Mo JH, Park MW, Choi IJ, An SY, Jeon EH, Ahn SH: Sunitinib inhibits papillary thyroid carcinoma with RET/PTC rearrangement but not BRAF mutation, *Cancer Biol Ther* 2011, 12:458-465
370. Bauer S, Parry JA, Muhlenberg T, Brown MF, Seneviratne D, Chatterjee P, Chin A, Rubin BP, Kuan SF, Fletcher JA, Duensing S, Duensing A:

- Proapoptotic activity of bortezomib in gastrointestinal stromal tumor cells, *Cancer Res* 2010, 70:150-159
371. Nemeth ZH, Wong HR, Odoms K, Deitch EA, Szabo C, Vizi ES, Hasko G: Proteasome inhibitors induce inhibitory kappa B (I kappa B) kinase activation, I kappa B alpha degradation, and nuclear factor kappa B activation in HT-29 cells, *Molecular pharmacology* 2004, 65:342-349
372. Aggarwal BB: Nuclear factor-kappaB: the enemy within, *Cancer Cell* 2004, 6:203-208
373. Goel A, Dispenzieri A, Geyer SM, Greiner S, Peng KW, Russell SJ: Synergistic activity of the proteasome inhibitor PS-341 with non-myeloablative 153-Sm-EDTMP skeletally targeted radiotherapy in an orthotopic model of multiple myeloma, *Blood* 2006, 107:4063-4070
374. Basu S, Rosenzweig KR, Youmell M, Price BD: The DNA-dependent protein kinase participates in the activation of NF kappa B following DNA damage, *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 247:79-83
375. Dai Y, Rahmani M, Dent P, Grant S: Blockade of histone deacetylase inhibitor-induced RelA/p65 acetylation and NF-kappaB activation potentiates apoptosis in leukemia cells through a process mediated by oxidative damage, XIAP downregulation, and c-Jun N-terminal kinase 1 activation, *Molecular and cellular biology* 2005, 25:5429-5444

