

Dottorato di ricerca in Oncologia – XXX ciclo

Coordinatore: Prof Bruno Annibale

Responsabile del Curriculum in Oncologia Digestiva: Prof. Bruno Annibale

Tutor: Prof. Francesco D'Angelo

Dottorando: Niccolò Petrucciani

Ottobre 2017

*Ruolo dell'inattivazione del pathway molecolare di Hedgehog (Hh)
nell'adenocarcinoma coloretale primitivo e metastatico*

INDICE

Introduzione	Pag. 4
Dati epidemiologici sul cancro del colon-retto	Pag. 4
Il pathway di Hedgehog	Pag. 6
Pathway di Hedgehog e tumorigenesi	Pag. 10
Via di segnalazione di Hh nel tessuto colico normale	Pag. 12
Via di segnalazione di Hh nei polipi, adenomi, e condizioni non maligne	Pag. 13
Hh e carcinoma coloretale	Pag. 14
Hedgehog, transizione epitelio-mesenchima, HOTAIR	Pag. 15
Scopo dello studio	Pag. 18
Materiali e metodi	Pag. 19
Colture cellulari	Pag. 19
Estrazione dell'RNA	Pag. 19
RT-PCR	Pag. 20
Anticorpi	Pag. 22
Estrazione delle proteine e Western blot	Pag. 22
Scratch assay	Pag. 23
Immunofluorescenza	Pag. 24
Long non-coding RNA	Pag. 25
Analisi statistica	Pag. 25

Risultati	Pag. 26
Correlazione tra espressione di GLI e sopravvivenza in pazienti con carcinoma colo-rettale.	Pag. 26
Diminuzione della proliferazione cellulare di linee di carcinoma colo-rettale in presenza di Hh-Antag	Pag. 28
Hh-Antag inibisce la motilità cellulare e induce la transizione mesenchima-epitelio (MET)	Pag. 34
 Discussione	 Pag. 44
Cancro del colon-retto: fattori molecolari	Pag. 44
<i>Pathway</i> di Hedgehog, correlazione con fattori clinico-patologici e sopravvivenza	Pag. 47
Ruolo degli inibitori del <i>pathway</i> di Hedgehog e chemioterapia	Pag. 51
<i>Pathway</i> di Hedgehog, EMT, long non-coding RNA	Pag. 54
Il long non-coding RNA HOTAIR	Pag. 57
Efficacia del vismodegib su linee cellulari di CRC	Pag. 60
Limiti dello studio	Pag. 62
Possibili sviluppi futuri	Pag. 63
 Bibliografia	 Pag. 66

INTRODUZIONE

Dati epidemiologi sul cancro del colon-retto

Il cancro del colon-retto rappresenta uno dei tumori più frequenti (Marley 2016). Nel 2012, secondo i dati di GLOBOCAN, ci sono stati nel mondo 1360602 nuovi casi di cancro coloretale, come mostrato nelle Tabelle 1 e 2 (Ferlay 2013). Il cancro del colon-retto rappresenta dunque il terzo tumore più frequente a livello mondiale, e il 9.7% di tutti i tumori (esclusi i tumori cutanei non-melanomi). In Europa, è il secondo tumore più frequente, con 447136 nuovi casi ogni anno, e rappresenta il 13% dei tumori (esclusi i tumori cutanei non-melanomi). Nel 2012, sono stati calcolati 693933 decessi per tumore del colon-retto nel mondo. Il cancro del colon-retto rappresenta la quarta causa di morte per tumore rappresentando l'8.5% di decessi legati a patologia tumorale. In Europa, il tumore del colon-retto è stato la seconda causa di morte tra i tumori con 214866 decessi (12.2% dei decessi per neoplasie). La prevalenza di pazienti con cancro coloretale a 5 anni (numero di pazienti vivi 5 anni dopo la diagnosi) è stata stimata a 3543582 in tutto il mondo e 1203943 in Europa (Ferlay 2013).

La ricerca scientifica si è focalizzata negli ultimi anni sull'identificazione di fattori molecolari e di terapie mirate per il cancro colo-rettale. La maggiore comprensione dei diversi profili genetici ha consentito lo sviluppo e l'utilizzazione clinica di nuovi farmaci, che agiscono su bersagli specifici, in combinazione con la terapia citotossica tradizionale (Loree 2017). Gli agenti

biologici utilizzati attualmente hanno come bersaglio fattori angiogenetici (bevacizumab, aflibercept, ramucirumab, and regorafenib) e l'epidermal growth factor receptor (EGFR) (cetuximab and panitumumab) (Obuch 2016). Lo studio di ulteriori *pathway* oncogenetici e lo sviluppo di farmaci mirati rappresenta uno dei campi di ricerca più promettenti, nell'obiettivo di elaborare terapie sempre più efficaci e costruite su misura sul profilo genetico del tumore da trattare (Augestad 2017).

Tabella 1. Epidemiologia del cancro colo-rettale nel mondo, dati di GLOBOCAN 2012

Parameter	Males	Females	Persons
Incidence rates			
number of new cases	746,298	614,304	1,360,602
number of new cases per 100,000 population	21.0	17.6	19.3
ASR(W)	20.6	14.3	17.2
proportion of all newly diagnosed cancers (apart from skin cancers)	10.0%	9.2%	9.7%
rank among all newly diagnosed cancers (apart from skin cancers)	3rd	2nd	3rd
Mortality rates			
number of deaths	373,639	320,294	693,933
number of deaths per 100,000 population	10.5	9.2	9.8
ASR(W)	10.0	6.9	8.4
proportion of all cancer-related deaths (apart from skin cancers)	8.0%	9.0%	8.5%
rank among all cancer-related deaths (apart from skin cancers)	4th	3rd	4th
Prevalence rates (patients still alive five years after diagnosis)			
absolute number of survivors	1,953,431	1,590,151	3,543,582
rate per 100,000 population	75.3	61.2	68.2
Cumulative risk of developing colorectal cancer			
from birth until the age of 75	2.36%	1.57%	1.95%

Tabella 2. Epidemiologia del cancro colo-rettale in Europa, dati di GLOBOCAN 2012

Parameter	Males	Females	Persons
Incidence rates			
number of new cases	241,813	205,323	447,136
number of new cases per 100,000 population	67.6	53.5	60.3
ASR(W)	37.3	23.6	29.5
proportion of all newly diagnosed cancers (apart from skin cancers)	13.2%	12.7%	13.0%
rank among all newly diagnosed cancers (apart from skin cancers)	3rd	2nd	2nd
Mortality rates			
number of deaths	113,246	101,620	214,866
number of deaths per 100,000 population	31.7	26.5	29.0
ASR(W)	16.2	9.9	12.5
proportion of all cancer-related deaths (apart from skin cancers)	11.6%	13.0%	12.2%
rank among all cancer-related deaths (apart from skin cancers)	2nd	2nd	2nd
Prevalence rates (patients still alive five years after diagnosis)			
absolute number of survivors	656,384	547,559	1,203,943
rate per 100,000 population	220.1	167.1	192.3
Cumulative risk of developing colorectal cancer			
from birth until the age of 75	4.48%	2.73%	3.51%

Il *pathway* di Hedgehog

Il *pathway* di Hedgehog (Hh) è stato oggetto di numerosi studi in seguito alla sua scoperta nell'organismo modello *Drosophila Melanogaster* (Li 2014, Taipale 2001, Ingham 2001, Papadopoulos 2016, Seow 2016). Molte ricerche hanno dimostrato il suo ruolo nello sviluppo dell'embrione umano e nella regolazione dello sviluppo dei vari organi e tessuti, tra cui l'apparato gastrointestinale, di cui il *pathway* di Hh regola la crescita e il differenziamento (Mehlen 2014,

Konstantinou 2016). Nell'adulto il *pathway* di Hh partecipa al rinnovo continuo delle cellule intestinali epiteliali. Tale osservazione ha portato a formulare l'ipotesi che una disregolazione di questo *pathway* possa provocare un'iperplasia patologica delle cellule epiteliali e contribuire allo sviluppo e alla progressione dei tumori gastrointestinali (Taipale 2001, Haveri 2008).

I tre omologhi di Hh che partecipano al differenziamento e allo sviluppo tissutale nei vertebrati sono *Sonic Hedgehog* (Shh), *Indian Hedgehog* (Ihh) e *Desert Hedgehog* (Dhh) (Katoh 2005). Nel tratto gastrointestinale, Shh e Ihh sono espressi mentre Dhh è espresso nel sistema nervoso e nei testicoli (Lin 2014, Parfitt 2007). Nei mammiferi, la prima tappa della via di segnalazione di Hedgehog consiste nella produzione e nella secrezione dei ligandi di Hh. Successivamente i ligandi di Hh si legano al recettore transmembrana Patched 1 (Ptch1), che causa l'attivazione della proteina transmembrana Smo (Smoothened), accoppiata a una proteina G, membro di un recettore transmembrana correlato alla famiglia di recettori Frizzled (Figura 1 e 2) (Watt 2004). In assenza di Hh, Ptch inibisce Smo. Il rilascio di Smo attiva i fattori di trascrizione della famiglia Gli (Gli1, Gli2, Gli3) (van der Brink 2006). In presenza del ligando di Hh, l'attività di inattivazione di Smo esercitata da Ptch è assente, per cui Smo è libero di trasmettere il segnale a livello intracellulare (Ruiz 2011). Smo trasmette il segnale mediante i tre fattori di trascrizione Zinc finger Gli (Agyeman 2014). Le proteine Gli sono le ultime molecole del *pathway* e i bersagli finali di Hh. Nei vertebrati, ci sono tre membri della famiglia Gli: Gli1, Gli2, Gli3. Gli 1 agisce come attivatore trascrizionale ed è coinvolto in un feedback positivo. Gli2 e Gli3 hanno funzioni

opposte: Gli2 agisce come attivatore trascrizionale, mentre Gli3 come inibitore della trascrizione (Lees 2006). Smo è in grado di attivare due differenti cascate di segnale intracellulare: un *pathway* non canonico, indipendente dal ligando che modula il citoscheletro regolando le GTPasi Rac1 e Rho e un *pathway* canonico, ligando-dipendente attraverso l'attivazione di Gli2. Il *pathway* canonico regolato da Smo comporta l'attivazione intracellulare di Gli2 attraverso una proteolisi limitata. Gli2 nel citoplasma si lega a un complesso inattivante composto da Fused kinase (Fu), suppressor of fused (SuFu) e Costal2. L'attivazione di Smo libera Gli2 dal complesso soppressore e lo trasferisce nel nucleo, dove si lega ai promotori dei geni indotti dalla via di segnalazione di Hh. Il segnale di Hh mediato da Gli2 richiede la partecipazione del recettore Ptch, della Hedgehog-interacting protein (Hhip) e del fattore di trascrizione Gli1 (Chowdhury 2013). In assenza del legando di Ptch, Smo è inattivo, e dunque inibisce la trascrizione di Gli1 e il rilascio di Gli2, e Gli3 è clivato per generare delle isoforme inattivanti. Quando Smo è attivato da Ptch, Gli2 è rilasciato dal complesso citoplasmatico, la funzione di repressore di Gli3 è inibita e Gli1 è trascrizionalmente inattivo (Ciucci 2013).

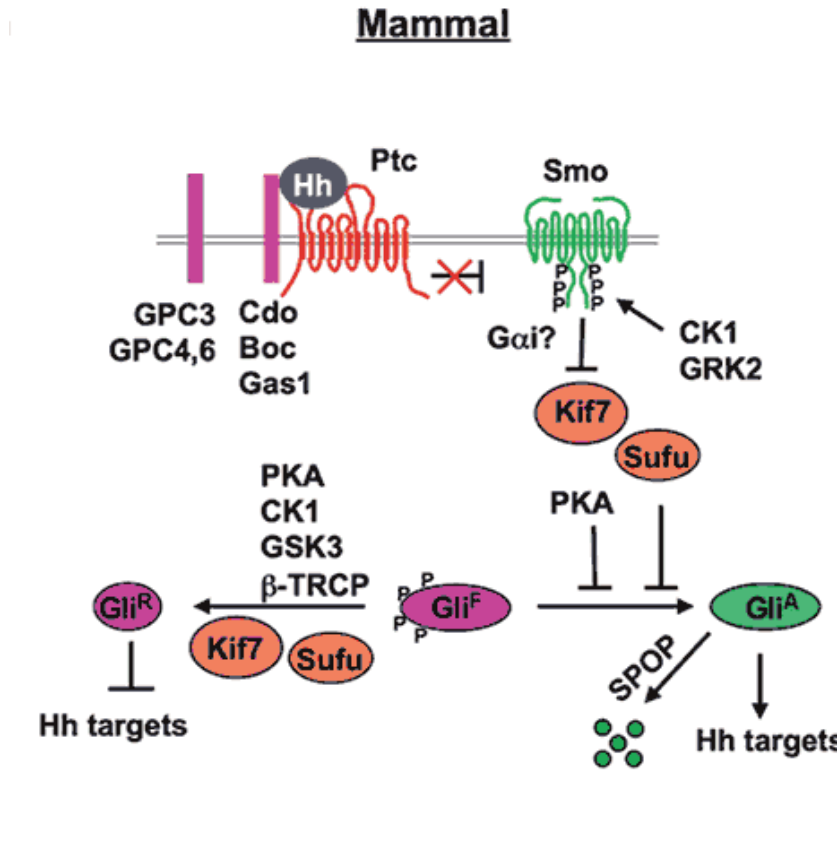
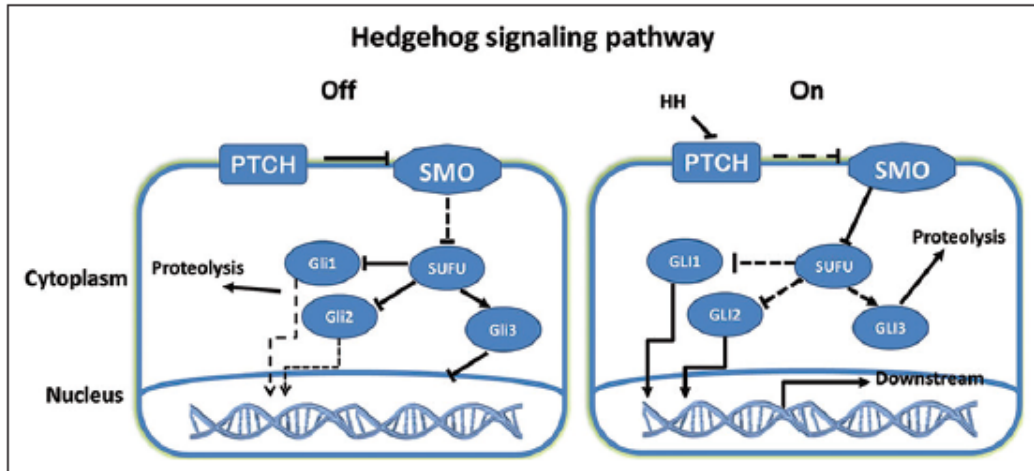


Figura 1 e 2. Rappresentazioni schematiche del *pathway* di Hedgehog nell'uomo

Pathway di Hedgehog e tumorigenesi

Il *pathway* di Hh è stato studiato in relazione alla patogenesi di vari tumori, ma il suo ruolo nel cancro colo-rettale rimane controverso (Douard 2006, Katoh 2006, Bian 2007). Ci sono due meccanismi possibili di attivazione di Hh: un meccanismo dipendente dal ligando e un meccanismo indipendente dal ligando, che comporta una mutazione inattivante di Ptch1 o una mutazione attivante del proto-oncogene Smo. Il *pathway* di Hh rappresenta una via di segnalazione che può essere responsabile della carcinogenesi e per tale motivo un potenziale bersaglio terapeutico.

L'attivazione inappropriata del *pathway* di Hh è stata riscontrata in vari tumori, incluso il basalioma, il medulloblastoma, il cancro del pancreas, il tumore del polmone, il cancro della mammella e dello stomaco (Chung 2014). La regolazione aberrante di tale *pathway* può avvenire in seguito a mutazione degli effettori o per espressione aberrante di Hh in tutte le neoplasie citate. Le cellule di cancro colo-rettale, che esprimono frequentemente i ligandi di Hh, potrebbero inoltre agire con azione paracrina sulla componente stromale del tumore. Vari autori hanno riportato osservazioni differenti. Alcuni studi hanno dimostrato l'assenza di correlazione tra un'abnorme attivazione di Hh e le cellule di cancro colo-rettale, tra cui il lavoro di Chatel e colleghi su 7 linee cellulari di cancro colo-rettale (Guleng 2006, Chatel 2007). Alinger et al. hanno affermato che il signaling di Hh è coinvolto nel differenziamento e nella rigenerazione dell'epitelio del colon ma non nella formazione, crescita o proliferazione tumorale (Alinger 2009). Il

problema di tali studi è il ridotto volume dei campioni esaminati. Complessivamente gli studi condotti sul cancro colo-rettale e il *pathway* di Hh si sono soffermati sui seguenti aspetti dando origine alle seguenti ipotesi: 1) tipi differenti di cellule di tumore colo-rettale hanno diverse espressioni delle componenti del *pathway* di Hh; 2) il *pathway* di Hh può avere un ruolo nella transizione epitelio-mesenchima, nella formazione delle metastasi, nell'angiogenesi delle cellule di carcinoma colo-rettale; 3) il ruolo del *pathway* di Hh varia durante la sequenza adenoma-carcinoma nello sviluppo di cancro colo-rettale; 4) Shh avrebbe un ruolo oncogenetico mentre Ihh inibirebbe la tumorigenesi colo-rettale; 5) tra i componenti del *pathway* di Hh, Smo avrebbe il ruolo più importante nella regolazione della trasformazione delle cellule tumorali colo-rettali (Wang 2014).

Sebbene non tutti gli studi giungano alle medesime conclusioni, la maggior parte degli autori concorda nel riscontrare un ruolo del *pathway* di Hh nella tumorigenesi colo-rettale. Hh regola il differenziamento degli enterociti del colon, e l'mRNA di Hh e le proteine di tale *pathway* sono altamente espresse nelle linee di cellule di cancro colo-rettale (van der Brink 2004, Shi 2010, Taniguchi 2007). L'attivazione del *pathway* Hh-Gli è inoltre riscontrata nelle cellule epiteliali tumorali della maggior parte delle linee colo-rettali. La maggior parte degli studi afferma che un'elevata attività Hh-Smo-Gli viene acquisita e favorisce la sopravvivenza delle cellule tumorali colo-rettali e la metastatizzazione e che la via di segnalazione di Hh è attivata in maniera canonica attraverso Smo e non canonica attraverso RAS/RAF nel cancro colico (You 2010, Cai 2015, Mazumdar

2011). La regolazione trascrizionale in risposta alla segnalazione di Hh è mediata dai geni Gli, che si trovano a valle di Smo, e che sono attivati anche da altri *pathways* oncogenici.

L'attivazione del *pathway* di Hh non è uniforme nei differenti tipi di cellule di cancro colo-rettale, per cui si ipotizza che la funzione del *pathway* di Hh possa variare in funzione dei differenti tipi di cancro colo-rettale presi in esame (Agyeman 2012).

Via di segnalazione di Hh nel tessuto colico normale

L'effetto della via di segnalazione di Hh nello sviluppo intestinale è stato ben stabilito. In un lavoro su modello murino, Ramalho-Santos e colleghi avevano dimostrato che il *pathway* di Hh è essenziale per l'organogenesi dell'apparato gastrointestinale dei mammiferi (Ramalho-Santos, 2000), ipotizzando che mutazioni in uno o più componenti del *pathway* potessero provocare malformazioni intestinali. Studi successivi hanno stabilito il ruolo di Hh come segnale morfogenetico durante l'embriogenesi (Madison, 2005) e come elemento essenziale per mantenere l'omeostasi del tratto gastrointestinale nei topi adulti e negli umani (van den Brink, 2001). L'espressione del ligando Shh nelle cripte coliche umane è stata mostrata da van den Brink (van den Brink, 2002), e studi ulteriori hanno osservato una più o meno forte espressione di Shh sulla superficie delle cellule coliche o nelle cripte (Alinger 2009; Oniscu 2004, Wang 2013). L'overespressione di Ihh è stata osservata lungo la superficie dell'epitelio colico

normale e secondo alcuni autori è responsabile del differenziamento delle cellule staminali (van den Brink 2004; Fu 2014, Kosinski 2010). Shh è stato riscontrato nelle cripte e nelle cellule ganglionari, Ptch1 nelle cellule neuroendocrine e Smo nell'epitelio dei villi.

Via di segnalazione di Hh nei polipi, adenomi, e condizioni non maligne

Numerosi lavori hanno dimostrato come le disfunzioni del *pathway* di Hh durante lo sviluppo portino a malformazioni gastrointestinali, come difetti nello sviluppo gastrico, alterazioni nel differenziamento e nella proliferazione cellulare, differenziamento alterato degli enterociti e dislocazione dei fibroblasti intestinali (Ramalho-Santos 2000, Madison 2005, Kolterud 2009). Van den Brink e colleghi hanno riportato una forte correlazione tra Shh e il differenziamento delle ghiandole fundiche nel tratto gastroenterico umano (van den Brink, 2002) e un aumentato livello di Shh in caso di metaplasia fundica o eterotopia. Uno studio successivo (van den Brink, 2004) ha mostrato la presenza di Ihh in polipi di individui con poliposi familiare adenomatosa, suggerendo che ci fosse una relazione tra il *pathway* di Hh e il differenziamento dell'epitelio colico. Varnat e colleghi (Varnat 2010) attraverso modelli *knockout* hanno in seguito confermato il ruolo del *pathway* di Hh tramite il mediatore Smo. In seguito Oniscu et al. hanno descritto l'induzione dell'espressione di Shh, Ptch1, e Smo alla base delle cripte dei polipi iperplastici (Oniscu, 2004). Inoltre, negli adenomi tubulo-villosi il livello di espressione dei membri del *pathway* di Hh era aumentato se comparato

al tessuto normale, dato concorde con il ruolo di Shh nella proliferazione cellulare. Anche Alinger e Yoshikawa hanno mostrato un aumento dell'espressione del *pathway* di Hh negli adenomi colici, con una differenza significativa rispetto al tessuto normale. Al contrario, una diminuzione di Ihh è stata riscontrata nella sequenza di trasformazione da tessuto normale a polipo iperplastico ad adenoma (Fu, 2010).

Altri autori hanno studiato le differenti espressioni di Hh nei polipi sessili o negli adenomi serrati. Parfitt et al. hanno trovato un aumento dell'espressione di Shh negli adenomi serrati e una overspressione di Ptch1 negli adenomi sessili. Al contrario Morimoto et al. hanno riportato l'espressione di Ptch1 nella metà degli adenomi serrati e in tutti gli adenomi ma non nei polipi sessili e ipertrofici (Morimoto 2014). Wang e colleghi hanno infine riportato una differente espressione dei membri del *pathway* di Hh tra la melanosi del colon e il tessuto colico normale (Wang 2013).

Hh e carcinoma colo-rettale

Gli studi che hanno analizzato l'espressione delle proteine del *pathway* di Hh nel carcinoma colo-rettale hanno dato risultati variabili. L'espressione di Shh varia tra il 19% e il 60% nei vari lavori pubblicati, quella di Gli1 tra il 30% e il 78%, quella di Ptch1 tra il 44% e il 71% e quella di Smo tra il 50% e il 71%. Nella maggior parte degli studi, l'espressione delle proteine del *pathway* di Hh è maggiore nel tessuto tumorale rispetto al tessuto sano (Varnat 2009, Oniscu 2004, Wang 2013,

Bian 2007, Xu 2012, Ding 2012, Wang 2012, Iwasaki 2013), ad eccezione del lavoro di Alinger. La proteina Ihh è persa nei tumori colo-rettali e negli adenomi ed espressa nei casi di polipi ipertrofici e nel tessuto normale (Fu 2014). A livello dell'RNA i risultati sono simili con maggiore espressione di Hh rispetto al tessuto normale. (Douard 2006, Wang 2013, Bian 2007, Monzo 2006, Taniguchi 2007). Wang e colleghi (Wang 2013) hanno mostrato che Shh e Gli1 sono espressi fortemente e uniformemente nel tessuto del tumore colo-rettale, mentre Ptch1 è espresso in modo non omogeneo e Sufu debolmente. Il profilo di espressione di Ptch1 è riscontrato nell'adenocarcinoma convenzionale mentre nel tipo serrato Ptch1 è represso a livello proteico e di mRNA. In uno studio di Stefanius sull'espressione di Ptch1 non sono stati riscontrati polimorfismi o mutazioni del gene (Stefanius 2011). Ptch1 e Smo sono espressi maggiormente nei campioni tumorali piuttosto che in polipi iperplastici e adenomi (Yoshikawa 2009). Risultati simili sono stati osservati per Shh e Gli1 a livello proteico, mentre gli mRNA sono ugualmente espressi tra carcinomi, polipi iperplastici, adenomi (Fu 2010). Nello studio di Fu, per quello che riguarda Ihh, i livelli di mRNA sono più bassi nei campioni tumorali comparati a polipi iperplastici e adenomi, mentre il livello proteico è significativamente più basso o assente negli adenomi e nei carcinomi ma non nei polipi iperplastici. La metilazione del promotore del gene Ihh è stata proposta come possibile meccanismo per spiegare tali livelli di espressione (Fu 2010). E' stato osservato un livello proteico di Shh, Ptch1, Gli1 simile tra cancro del colon e melanosi mentre è stato visto che Sufu è debolmente espresso in entrambi i gruppi.

Hedgehog, transizione epitelio-mesenchima, HOTAIR

La transizione epitelio-mesenchima (EMT) è un fenomeno di transdifferenziazione che può avvenire nelle cellule epiteliali in seguito a determinati segnali e può portare a un cambiamento profondo del profilo di espressione. Le cellule che vanno incontro a EMT perdono progressivamente i marcatori epiteliali (tra cui l'E-caderina), acquisiscono marcatori mesenchimali, capacità migratoria, e riarrangiano il citoscheletro. Tale condizione è una condizione plastica; in siti secondari le stesse cellule possono andare incontro a una transizione inversa mesenchima-epitelio (MET). La EMT ha un ruolo in processi di sviluppo, fisiologici (organogenesi, rigenerazione, fibrosi), e patologici (crescita tumorale, metastatizzazione). Tra i fattori chiave della EMT, Snail ha il ruolo principale. Fattori trascrizionali, repressori e fattori epigenetici regolano il complesso equilibrio EMT-MET. E' noto che la maggior parte del DNA del genoma umano è trascritto in RNA che non produce alcuna proteina, chiamato non-coding RNA (Hajjari 2015). I long non-coding RNA (lncRNA) sono dei trascritti di una lunghezza superiore ai 200 nucleotidi, e hanno un ruolo nella regolazione trascrizionale e post-trascrizionale. Secondo alcuni autori, i lncRNA sono regolatori chiave dell'espressione genica (Flynn 2014, Eades 2014). Essi reclutano proteine in grado di modificare la cromatina (come PRC2) in specifici siti del genoma e influenzano l'espressione genica regolando lo stato della cromatina (Mercer 2013). Per tali motivi, lo studio sui lncRNA si è intensificato, in particolare è stata analizzata l'espressione di alcuni lncRNA in relazione a

diversi tumori. L'induzione di alcuni lncRNA con funzioni proto-oncogeniche è stata associata alla proliferazione tumorale e allo sviluppo di metastasi (Du 2013, Martens-Uzunova 2014, Qiu 2013, Walsh 2014). Il long non-coding RNA HOTAIR viene trascritto dal filamento antisenso del gene HoxC che è situato sul cromosoma 12q13.13. HOTAIR interagisce con Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) ed è necessario per instaurare la metilazione a livello di regioni regolative di differenti geni presenti su cromosomi diversi. PRC2 è un'istone metiltransferasi che promuove il silenziamento genico mediante meccanismi epigenetici durante vari processi incluso lo sviluppo tumorale (Davidovich 2013). Il long non-coding RNA HOTAIR è stato osservato legato a PRC2, e l'espressione *in vivo* di HOTAIR è stata correlata alla presenza di metastasi, legandosi a EZH2 e agendo su target genomici (Battistelli 2017). Battistelli et al. hanno mostrato negli epatociti che Snail dirige l'attività di EZH2 verso geni specifici attraverso il reclutamento del long non-coding RNA HOTAIR. HOTAIR sembra dunque avere un importante ruolo nella EMT, perché parte del complesso funzionale SNAIL/HOTAIR/EZH2. La comprensione del ruolo di HOTAIR potrebbe aprire nuovi spiragli nella comprensione dei processi di EMT e metastatizzazione, dando luogo alla scoperta di nuovi bersagli terapeutici.

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è quello di analizzare se l'inibizione farmacologica del *pathway* di Hh e in particolare di SMO con il farmaco vismodegib, possa avere un impatto sulla plasticità epiteliale, sulla EMT, e sulla invasività di differenti linee di carcinoma colo-rettale, e di esplorare i meccanismi coinvolti. Uno specifico inibitore di SMO (Hh-Antag), uno specifico anticorpo monoclonale diretto verso Shh e il silenziamento genico di SMO sono stati utilizzati per valutare l'impatto sulla proliferazione, sulla transizione epitelio-mesenchima, sulla migrazione e invasività, di linee cellulari di carcinoma colo-rettale.

MATERIALI E METODI

COLTURE CELLULARI

In questo lavoro sono state utilizzate cellule primarie di carcinoma colo-rettale umano primarie (HCT 116 e SW 480) e metastatiche (SW 620). Il terreno di coltura utilizzato è stato il DMEM. Sono inoltre state utilizzate cellule MeT5A, linea cellulare mesoteliale non tumorigenica, coltivate in M199 supplementato con FBS 10%.

Le cellule seminate in piastre per colture, sono state mantenute in incubatore ad una umidità e temperatura costanti di 37°C, con il 5% di CO₂.

Le cellule sono state diluite ogni 2-3 giorni, staccandole dalla piastra con una soluzione di tripsina (0.5 mg/ml)/ EDTA (0.22 mg/ml) e seminate nuovamente alla densità 1:2. I lavaggi delle cellule (2 lavaggi) per rimuovere il mezzo di coltura ed eventuali cellule morte prima di procedere alla digestione con tripsina/EDTA sono stati effettuati con il tampone isototonico PBS (contenente sali e fosfati).

Le cellule sono state trattate con Hh-Antag (GDC-0449), un inibitore farmacologico di Hedgehog/Smoothed, donato da Genentech (South San Francisco, CA).

ESTRAZIONE DELL'RNA

L'estrazione dell'RNA totale dalle cellule è stata realizzata utilizzando il kit di estrazione ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega).

Sono stati effettuati 2 lavaggi delle cellule con PBS a cui è seguita la lisi in piastra

aggiungendo 0.25 ml della soluzione di lisi cellulare contenente guanidina tiocianato.

Al lisato sono stati aggiunti 85 µl di isopropanolo 100%, la soluzione è stata omogenizzata al vortex e caricata su una colonna con affinità per l'RNA.

Dopo aver effettuato una centrifugazione a 13000 RPM per 30 secondi la colonna è stata lavata con una soluzione salina.

In seguito l'RNA legato alla membrana della colonna è stato trattato con la DNAsi in un volume di reazione di 30 µl incubando a temperatura ambiente per 15 minuti.

La colonna è stata quindi lavata con due soluzioni saline e l'RNA è stato eluito in acqua sterile priva di RNasi.

RT-PCR

1µg di RNA per ogni campione da analizzare è stato quantificato allo spettrofotometro Nanodrop 2000c e i rapporti 260/230 (per valutare la presenza di solventi organici) e 260/280 (per valutare la presenza di amminoacidi) sono stati rilevati.

La reazione di sintesi del cDNA è stata condotta utilizzando il kit di retrotrascrizione iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad) in 20 µl totali costituiti da: 4ul di buffer di reazione contenente sali, oligonucleotide dT e esameri random, 1ul di enzima di retrotrascrizione e 1 µg di campione di RNA da retrotrascrivere.

La reazione di trascrizione inversa è stata fatta a 25°C per 5 minuti, seguiti da 30 minuti a 42°C e 5 minuti a 85°C. Il cDNA sintetizzato è stato utilizzato per la

reazione di PCR quantitativa (Real time PCR).

Il cDNA ottenuto nella reazione di retrotrascrizione è stato diluito 1:6 e 2 µl di cDNA diluito è stato aggiunto ad una miscela contenente 2.92 µl di H₂O priva di RNasi, 5 µl di Master Mix contenente SYBR Green (Promega) e 0.04 µl di ciascuno dei due oligonucleotidi (Foreward + Reverse) alla concentrazione 200 µM.

Gli oligonucleotidi utilizzati sono stati i seguenti:

Gene	Oligonucleotide sequence
L32 FW	GGAGCGACTGCTACGGAAG
L32 REV	GATACTGTCCAAAAGGCTGGAA
GLI1 FW	GACGCCATGTTCAACTCGATG
GLI1 REV	CAGACAGTCCTTCTGTCCCCAC
PTCH1 FW	GAGCAGATTTCCAAGGGGAAGG
PTCH1 REV	ATGAGGAGGCCACAAACCAA
HIP1 FW	AGAACTGCAAAATGTGAGCCAG
HIP1 REV	CTGATCAAGAATACCTGCCCTG
MUC5AC FW	CCATTGCTATTATGCCCTGTGT
MUC5AC REV	TGGTGGACGGACAGTCACT
CYC D1 FW	CCTCTAAGATGAAGGAGACCA
CYC D1 REV	CACTTGAGCTTGTTACCA
P21 FW	GAGGAGGCGCCATGTCAGAA
P21 REV	AGTCACCCTCCAGTGGTGTC
SNAIL1 FW	CACTATGCCGCGCTCTTTC
SNAIL1 REV	GCTGGAAGGTAACTCTGGATTAGA
CK18 FW	CTGGAGACCGAGAACCGGA
CK18 REV	TCCGAGCCAGCTCGTCAT

L'espressione relativa dei geni è stata ottenuta con il metodo del $2^{-\Delta Ct}$ rispetto al gene normalizzatore L32. La reazione è stata condotta in un termociclatore da real-time CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Biorad).

ANTICORPI

Gli anticorpi contro la E-Caderina utilizzati sono stati prodotti da Becton-Dickinson Laboratories, Mountain View, CA. Gli anticorpi monoclonali contro Snail1 sono stati prodotti da Cell Signalling (Danvers MA). Gli anticorpi monoclonali contro la tubulina e la pancitocheratina sono stati prodotti da Sigma (St Louis, MO). Gli anticorpi monoclonali contro SMO (N-19) sono stati prodotti da Santa Cruz biotechnology (Dallas, USA). Hh-Antag (GDC-0449), l'inibitore di Hedgehog/Smoothed è stato fornito da Genentech (South San Francisco, CA). 5E1, uno specifico anticorpo monoclonale verso Shh, è stato prodotto da Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa City, Iowa, US) (Ericson 1996).

SMO knockdown mediato da siRNA

200×10^3 cellule sono state disposte su piastre 24h prima della trasfezione. Le cellule sono state trasfettate con 40 pmol ON-TARGET e SMARTpool contro SMO umano o con la stessa quantità di ON-TARGET Non-targeting Pool e 2 μ l di Lipofectamine® RNAiMAX Reagent prodotto da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA) in 200 μ l di Optimem prodotto da Gibco (Waltham, MA USA). 48 h dopo la trasfezione, l'efficienza del silenziamento è stata determinata tramite RT-PCR e western blot.

ESTRAZIONE DELLE PROTEINE E WESTERN BLOT

Le cellule sono state lisate con la soluzione Laemmli (concentrazione finale: Tris 60 μ M pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerolo, 5% 2- β mercaptoetanolo) contenente gli

inibitori delle proteasi (aprotinina, leupeptina, PMSF) e delle fosfatasi (ortovanadato di sodio). Il lisato cellulare è stato tenuto a 95°C per 5 minuti. 30 µl di proteine totali sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su un gel di poliacrilammide al 12% in condizioni denaturanti (0.1% SDS). Il trasferimento su filtro di nitrocellulosa (Biorad) consente di preservare le posizioni di migrazione delle proteine sul gel di acrilammide. È stato utilizzato il metodo del trasferimento delle proteine dal gel alla membrana in immersione con lo specifico tampone (Tris 48 µM, glicina 39 µM, metanolo 20%, SDS 0.037%), a voltaggio costante (100 Volts) per 90 minuti. Al termine del trasferimento il filtro è stato posto per 1 ora a temperatura ambiente nella soluzione di blocco costituita da latte alla concentrazione di 5% in TBST (Tris-HCl 25 µM pH 8, 125 µM NaCl, 0.05% Tween 20). A questo punto il filtro è stato incubato con gli specifici anticorpi primari per 16 ore a 4°C nella stessa soluzione usata per il bloccaggio. In seguito a lavaggi in TBST per rimuovere l'anticorpo primario non legato, è stato incubato il filtro con l'anticorpo secondario specie-specifico e i segnali relativi alla presenza delle proteine sono stati visualizzati mediante autoradiografia in seguito ad incubazione del filtro con ECL (Cyanagen).

SCRATCH ASSAY

Le cellule sono state trattate con DMSO o 1 µM Hh-Antag per 24 h nel mezzo di coltura fino a raggiungere il 100% della confluenza. Uno scratch wound è stato effettuato sulla piastra utilizzando una micropipetta. Le cellule sono state mantenute in coltura con 0.5% FBS per inibire la proliferazione cellulare. Sono

state quindi effettuate delle microfotografie al tempo 0 e al tempo 24 h dopo lo scratch. Le aree prive di cellule al tempo 0 e al tempo 24 sono state quantificate attraverso il software ImageJ (NIH, Bethesda, USA). Sono stati effettuati tre esperimenti indipendenti per ogni linea cellulare.

IMMUNOFLUORESCENZA

I test di invasione tridimensionali sono stati effettuati come descritto da Strippoli et al. (Strippoli 2015). Le cellule HCT 116 (1.5×10^5) sono state trattate con 1 μ M Hh-Antag o con il diluente in cui è stato risospeso il farmaco (usato come controllo) per 12 h e poi poste in piastre Ibidi da 15 pozzetti per angiogenesi e lasciate aderire per 3 h. Sopra le cellule è stato disposto 40% Matrigel (40 μ l) in mezzo privo di siero. Dopo 1 h, 50 μ l di mezzo di coltura contenente siero al 20% (e Hh-Antag o diluente) sono stati aggiunti e le cellule sono state incubate per 72 h. Le cellule sono state fissate con paraformaldeide (PFA) al 4%, permeabilizzate con 0.25% Triton in PBS e marcate per 12 h con rhodamine-phalloidin (per marcare la actina F) e Hoechst (per marcare i nuclei) in PBS. Le immagini sono state acquisite con un microscopio confocale Olympus FVIEW 1200. Le immagini a maggiore proiezione consistono in 30 immagini individuali con una distanza z di 120 μ m. Il software di analisi per immagini Imaris (Bitplane Scientific Software) è stato utilizzato per creare una visione 3D delle cellule e per quantificare le cellule invasive. Sono stati effettuati tre esperimenti indipendenti.

LONG NON-CODING RNA

La valutazione dei livelli di espressione del long non-coding RNA HOTAIR è stato misurato nelle linee cellulari HCT 116, SW 480, SW 620 di controllo ed in quelle trattate con 1 μ M Hh-Antag con lo stesso protocollo utilizzato per la valutazione degli mRNA.

ANALISI STATISTICA

La significatività statistica è stata determinata con un t-test utilizzando GraphPad Prism versione 5.0 (La Jolla, CA, USA). Le differenze sono state considerate statisticamente significative in caso di $P < 0.05$.

Parte dei dati presentati in questa tesi è stata presentata nell'articolo in corso di pubblicazione "Selective SMO Inhibition Modulates Cellular Energetic Metabolism and Invasiveness in Colorectal Cancer", di cui sono autori i dottori Paolo Magistri MD*, Cecilia Battistelli PhD*, Raffaele Strippoli MD PhD*, Mariacristina Valerio PhD, Luca Casadei PhD, Andrea Sagnotta MD, Niccolò Petrucciani MD, Teijo Pellinen PhD, Lucia Rossi, Francesco D'Angelo MD PhD, Marco Tripodi PhD, Giovanni Ramacciato MD FACS, Giuseppe Nigri MD PhD FACS FRCS FASCRS.

RISULTATI

Correlazione tra espressione di GLI e sopravvivenza in pazienti con carcinoma colo-rettale.

L'analisi della correlazione tra l'espressione dell'mRNA dei geni GLI e la sopravvivenza in un database di 382 pazienti con cancro colo-rettale ha permesso di identificare un'associazione tra l'alterazione dell'espressione dei geni GLI, la sopravvivenza e la recidiva di malattia. Le stime di sopravvivenza sono state calcolate tramite cBioPortal, basandosi su dataset di <http://cancergenome.nih.gov/>, sull'espressione degli mRNA. Abbiamo dimostrato una diminuzione statisticamente significativa della sopravvivenza nei pazienti con alterazione dell'espressione di GLI1, come mostrato nella Figura 3. I pazienti con aumento dell'espressione di GLI1 (11% del campione) avevano una sopravvivenza mediana di 47 mesi (linea rossa), *versus* 93 nei pazienti senza alterazione (linea blu). I pazienti con un'alterazione nell'espressione di Gli2 e con alterazioni di Gli1 e Gli2 avevano una tendenza a una diminuzione della sopravvivenza, e a una riduzione della sopravvivenza libera da malattia dopo la somministrazione del trattamento, come mostrato nella Figura 4 A e 4 B.

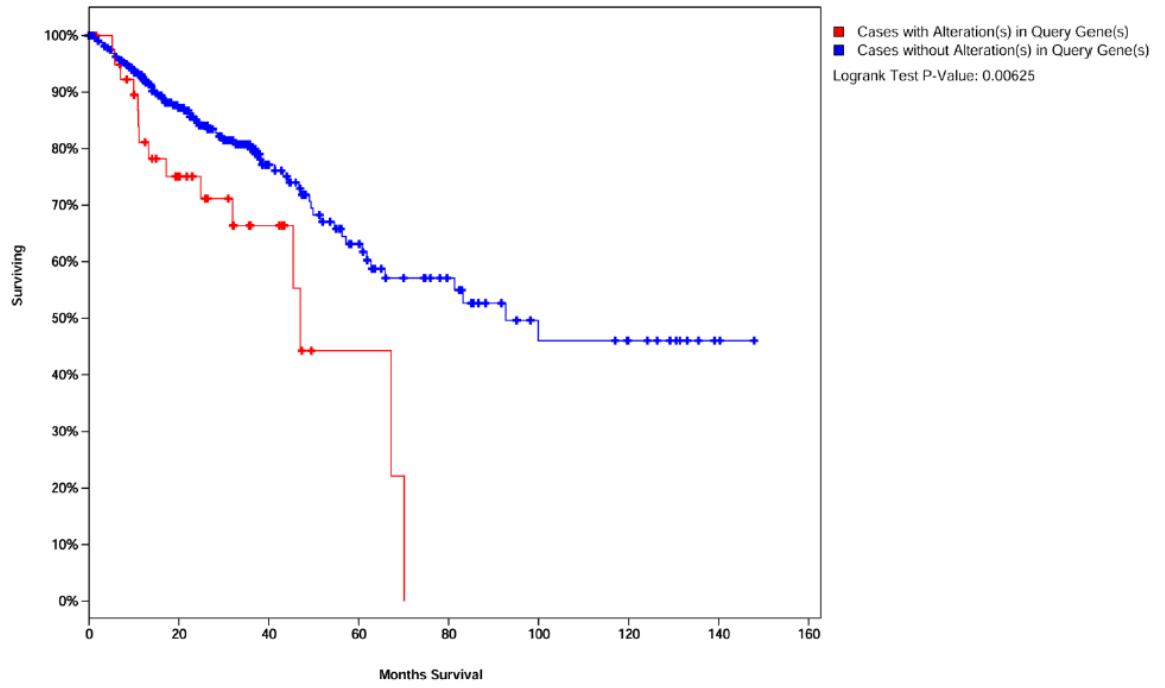
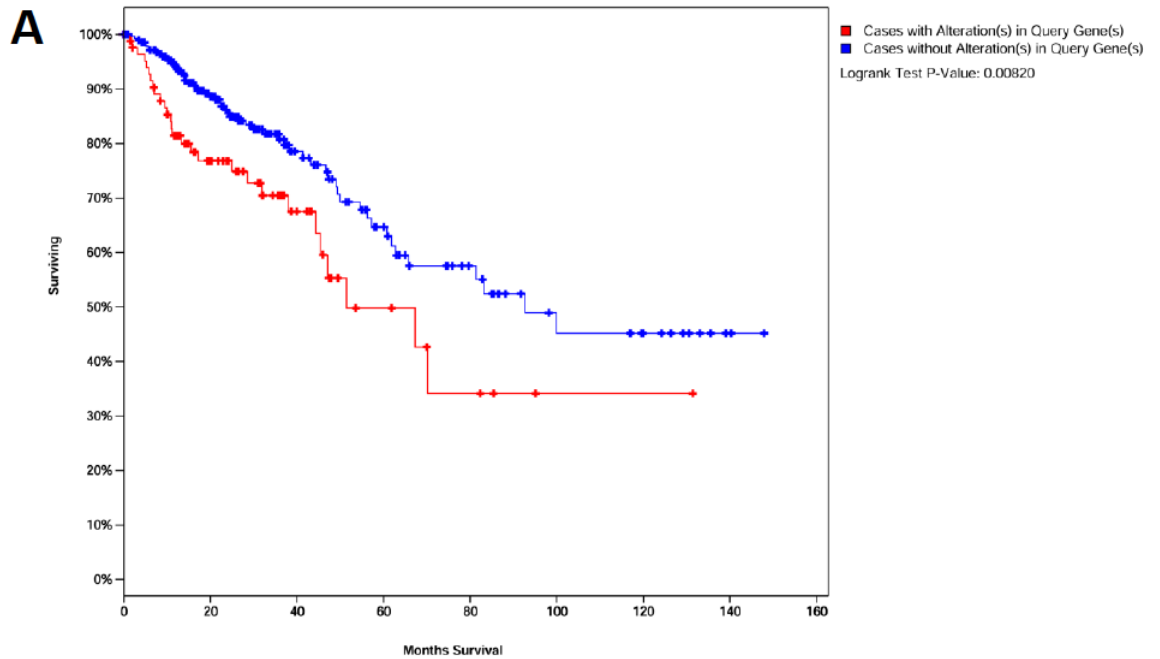


Figura 3. Sopravvivenza globale in funzione dell'espressione di Gli1 in pazienti con cancro colo-rettale



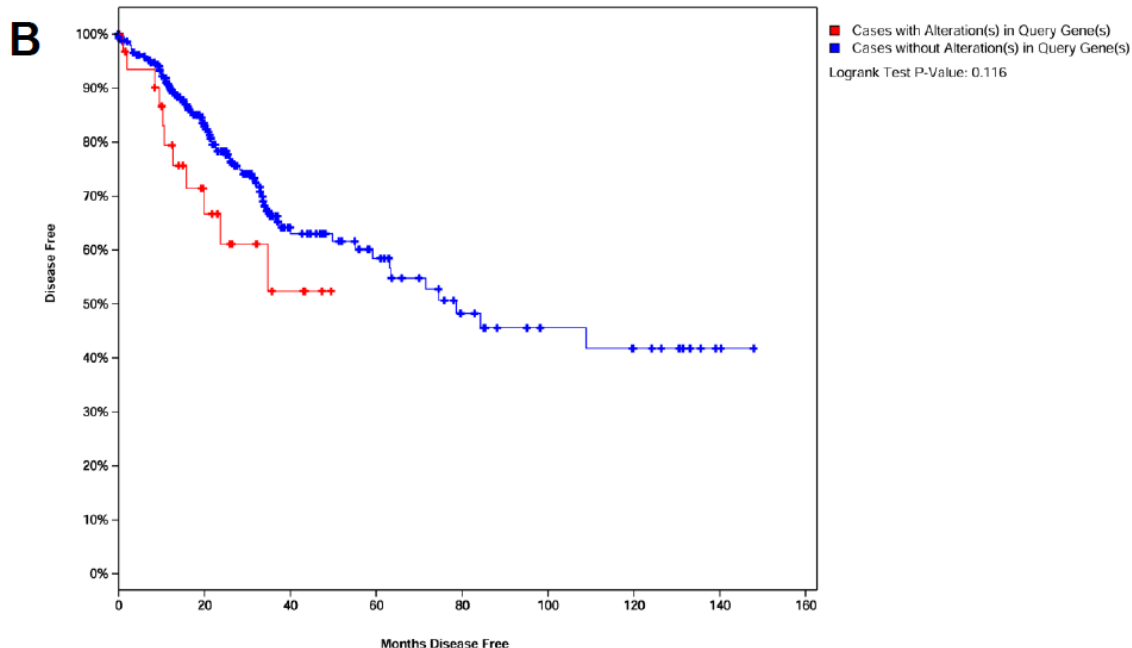


Figura 4 A e B. Sopravvivenza globale (A) e *disease-free* (B) in funzione dell'espressione di Gli1 e Gli2 in pazienti con cancro colo-rettale

Tali riscontri sono in favore dell'ipotesi di un'associazione tra l'espressione di Gli1 e Gli2 e la sopravvivenza globale e libera da malattia nei pazienti con cancro colo-rettale, e giustificano ulteriori ricerche sulla modulazione del *pathway* di Hedgehog in questo contesto patologico.

Diminuzione della proliferazione cellulare di linee di carcinoma colo-rettale in presenza di Hh-Antag

In prima istanza, è stato analizzato l'effetto del trattamento con l'antagonista del *pathway* di Hedgehog (Hh-Antag) su specifiche linee di carcinoma colo-rettale in relazione all'espressione di geni specifici del *pathway* di Hedgehog. Le linee

cellulari HCT 116, SW 480 (linee cellulari primarie) e SW620 (linea metastatica), sono state trattate con l'inibitore di Hedgehog per 24 ore a una concentrazione di 1 μ M. Il trattamento con Hh-Antag ha provocato una marcata riduzione dell'espressione dei geni GLI1, Ptch1, Hip, Muc5ac, geni target del *pathway* di Hedgehog, dimostrando che il trattamento con Hh-Antag inibisce in maniera marcata tale via di segnalazione. Tali risultati sono mostrati nelle Figura 5 A-D.

Risultati simili sono stati ottenuti silenziando SMO, e utilizzando 5E1, un anticorpo monoclonale che si lega specificamente a Shh, come mostrato in Figura 5 E-F. L'efficacia di 5E1 suggerisce come possa esistere un loop autocrino che mantiene in queste cellule il *pathway* di Hedgehog attivato costitutivamente.

Al contrario nella linea MeT5a, linea mesoteliale non tumorigenica, gli stessi geni non erano responsivi al trattamento con Hh-Antag, indicando che in queste cellule non vi è una attivazione costitutiva del *pathway* SMO-GLI. Di conseguenza queste cellule sono state utilizzate come controllo negativo nell'esperimento (Figura 6).

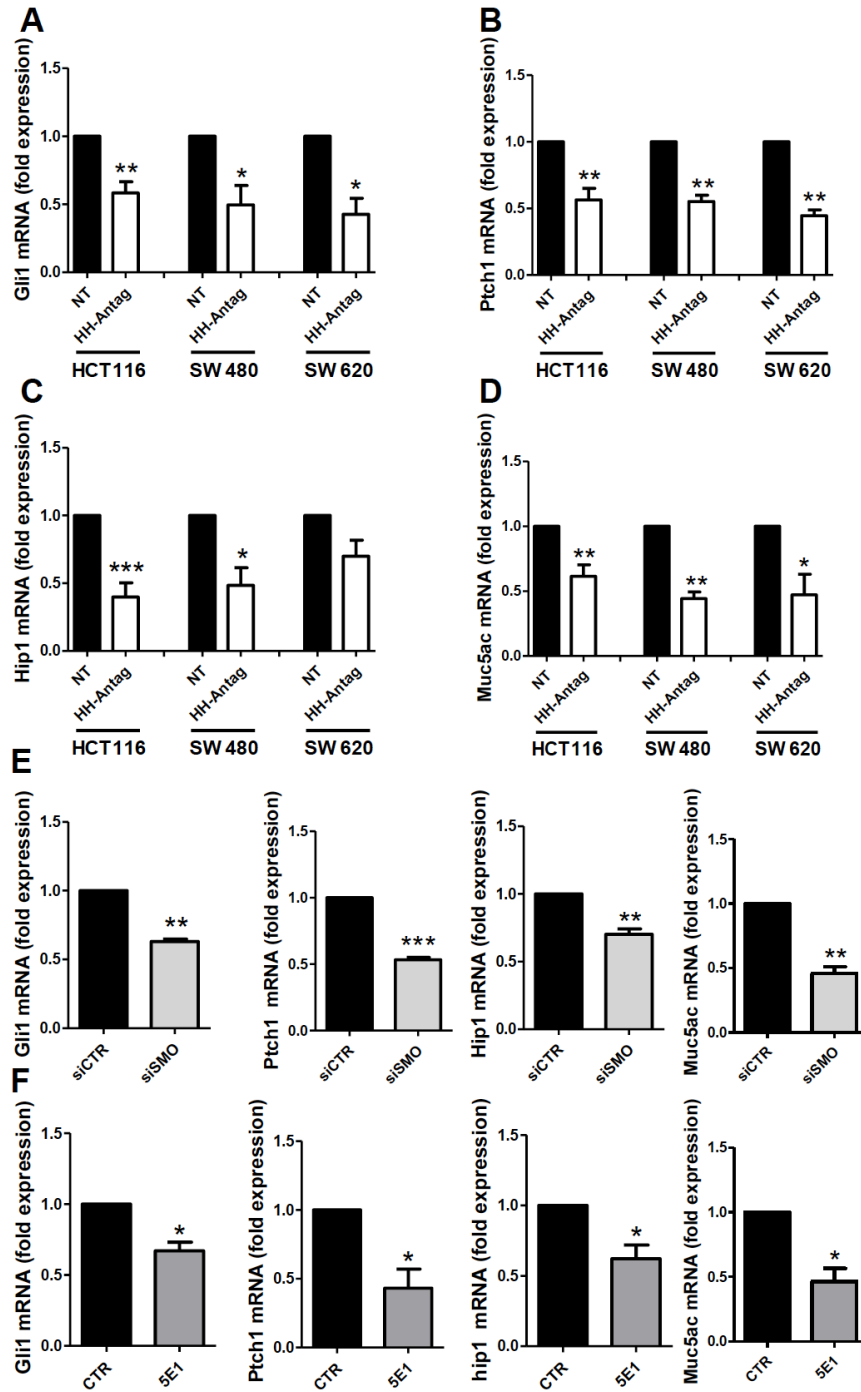


Figura 5. Riduzione dell'espressione dei geni GLI1, Ptch1, Hip, Muc5ac in seguito al trattamento con Hh-Antag, in seguito al silenziamento di SMO e all'uso dell'anticorpo monoclonale 5E1.

A

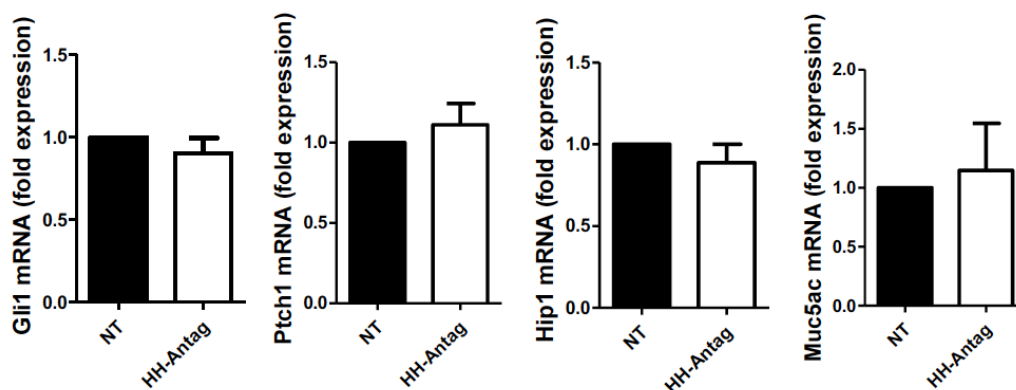


Figura 6. Trattamento con Hh-Antag della linea MeT5a, linea mesoteliale non tumorigenica

Per valutare l'effetto dell'inibizione del *pathway* di Hh sulla proliferazione cellulare, le linee cellulari di cancro colo-rettale primitive (HCT 116, SW480) e metastatiche (SW620) e la linea MeT5a sono state trattate con l' Hh-Antag per 24-48 h alla concentrazione di 1uM. Hh-Antag ha inibito la proliferazione cellulare nelle tre linee di carcinoma colo-rettale, mentre ha avuto un effetto trascurabile nelle cellule MeT5A, come mostrato in Figura 7.

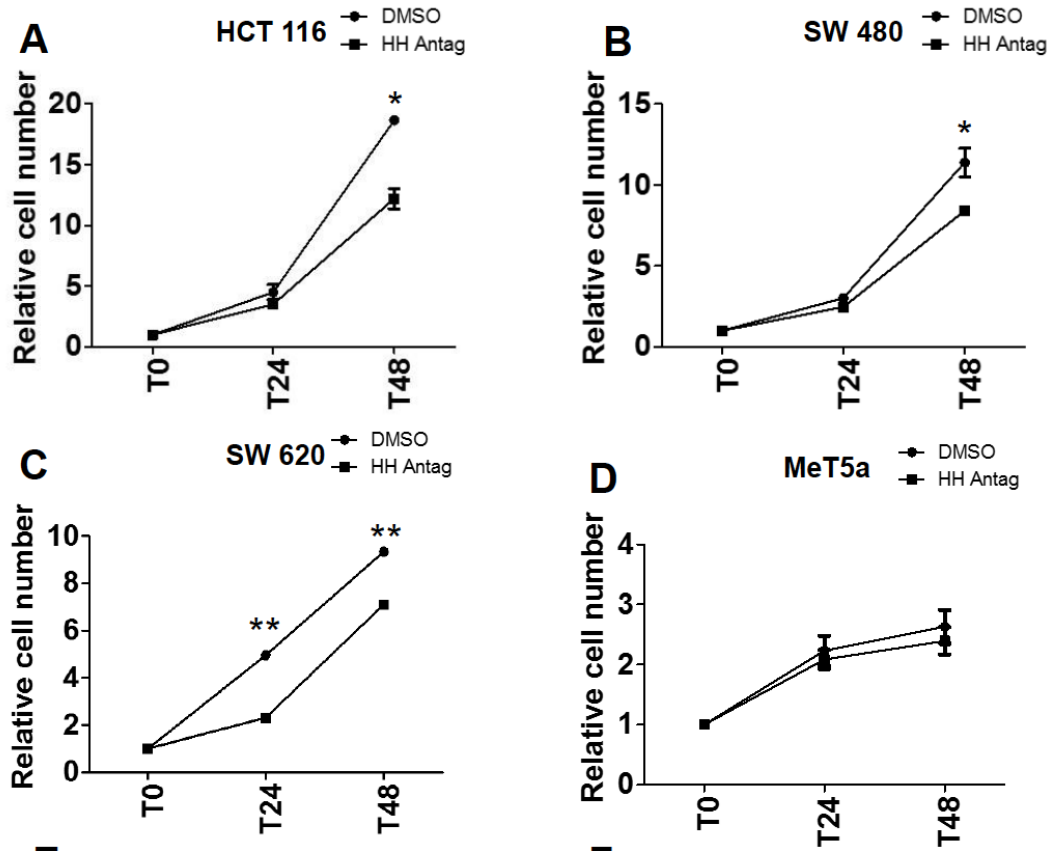


Figura 7. Effetto di Hh Antag 1uM sulla proliferazione delle cellule HCT 116, SW 480, SW 620, MeT5a

A livello molecolare, abbiamo osservato una riduzione dell'espressione dei geni promotori del ciclo cellulare (ciclina D1) e un aumento dell'espressione di un inibitore del ciclo cellulare (p21) nelle 3 linee di cancro colo-rettale utilizzate come mostrato in Figura 8. Lo stesso effetto si è ottenuto con il silenziamento genico di SMO e con l'uso dell' anticorpo 5E1.

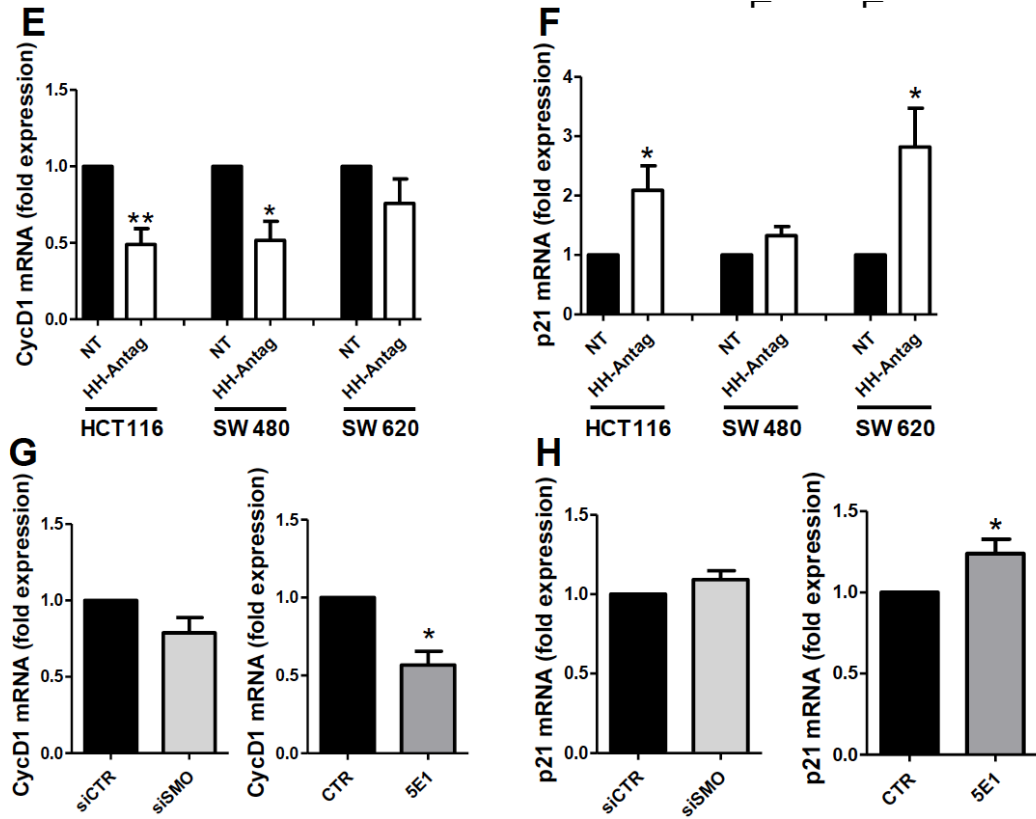


Figura 8. Effetto dell' Hh-Antag, del silenziamento di SMO e di 5E1 sull'espressione di ciclina D1 e p21 nelle linee cellulari HCT 116, SW 480, SW 620.

Nella linea cellulare MeT5a la somministrazione di Hh Antag non ha provocato cambiamenti significativi dell'espressione di ciclina D1 e p21, come mostrato in Figura 9.

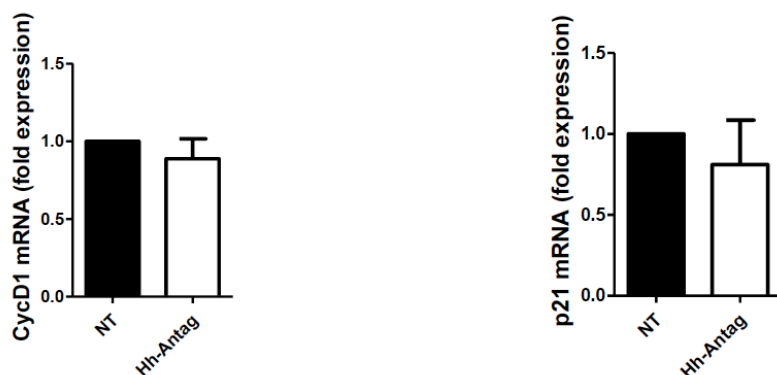


Figura 9. Effetto della somministrazione di Hh-Antag sull'espressione di ciclina D1 e p21 nella linea cellulare MeT5a

I risultati di questi esperimenti dimostrano che l'attivazione del *pathway* di Hh nelle cellule di carcinoma colo-rettale induce dei segnali di proliferazione.

Hh-Antag inibisce la motilità cellulare e induce la transizione mesenchima-epitelio (MET)

Per analizzare l'effetto di Hh-Antag sulla potenzialità di invasione tumorale, abbiamo valutato tramite *scratch test* l'effetto di Hh-Antag nel controllare la motilità cellulare che è un fattore determinante nell'invasività. Dei monostrati di cellule HCT 116 sono stati trattati con Hh-Antag per 24 ore, in seguito alle quali è stato effettuato lo *scratch*. Il trattamento con Hh-Antag ha avuto un effetto significativo nel ridurre la motilità cellulare, come mostrato nella Figura 10.

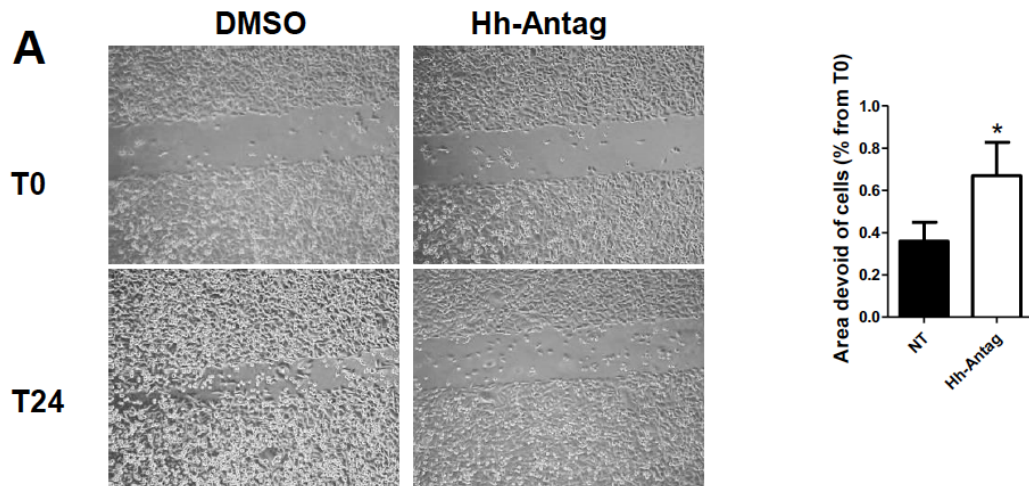


Figura 10. Risultati dello *scratch test* in assenza e presenza di Hh-Antag nelle cellule HCT 116

Risultati simili sono stati osservati nelle cellule SW 480 e SW 620 (Figura 11 A e B), mentre nella linea cellulare di controllo MeT5A non sono state osservate variazioni significative in seguito al trattamento con Hh Antag.

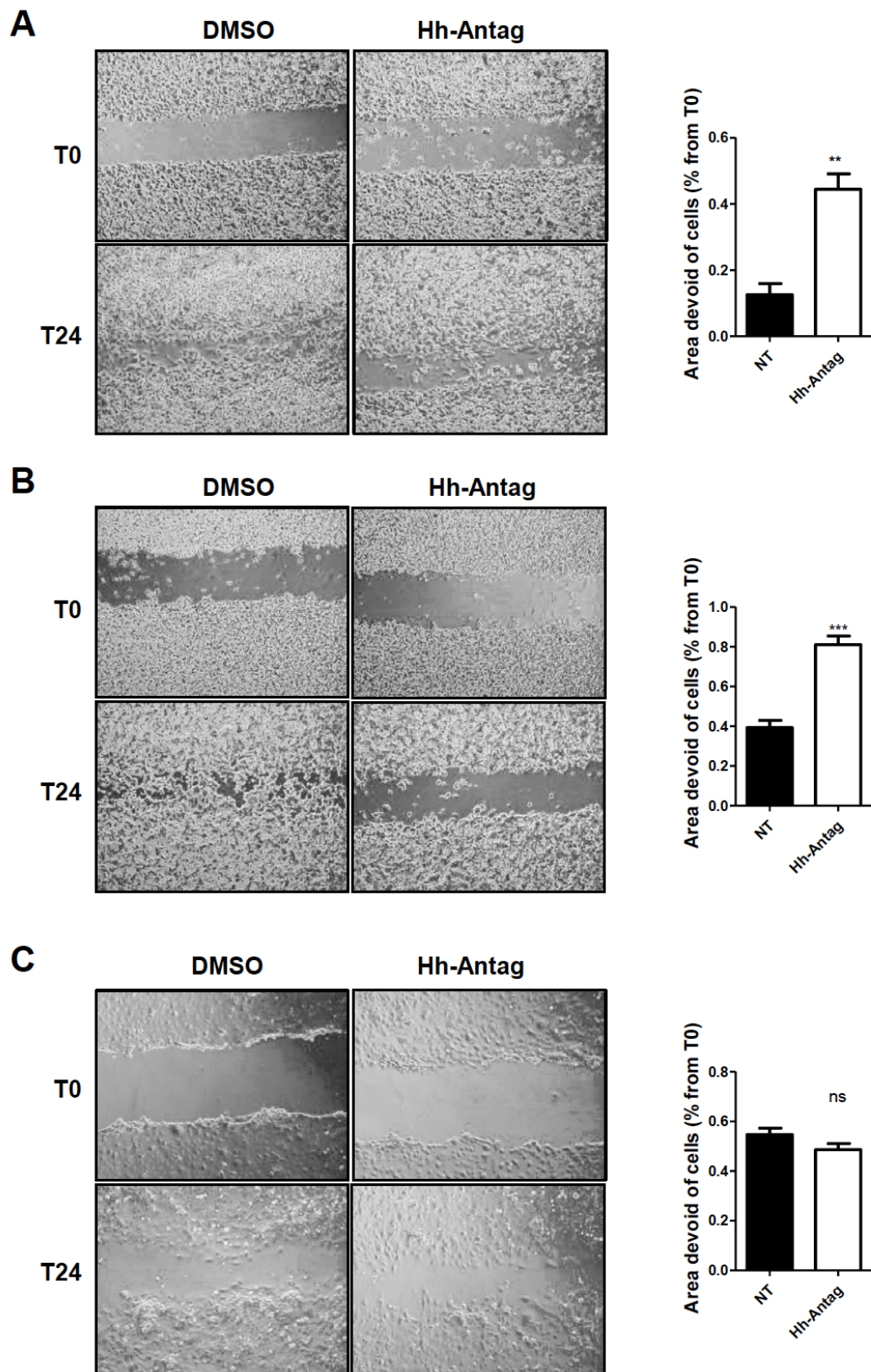


Figura 11. *Scratch test* nelle linee SW 480 (A), SW 620 (B) e MeT5A (C)

Il test di invasione tridimensionale con matrici di Matrigel ha sottolineato una riduzione della capacità di invasione delle cellule HCT 116 trattate con Hh-Antag, come mostrato in Figura 12.

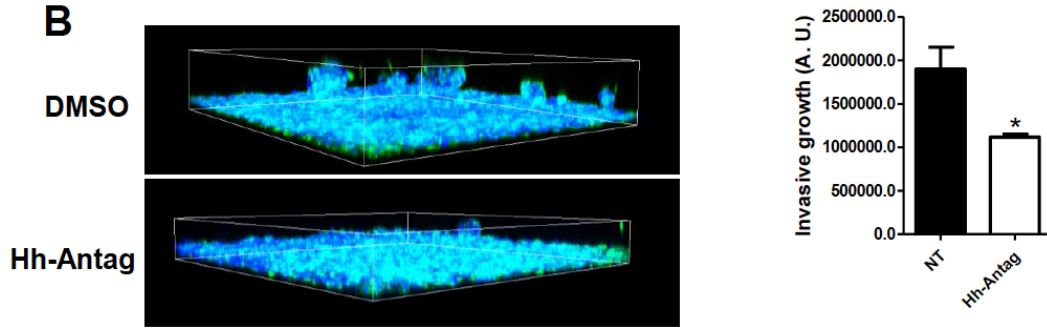
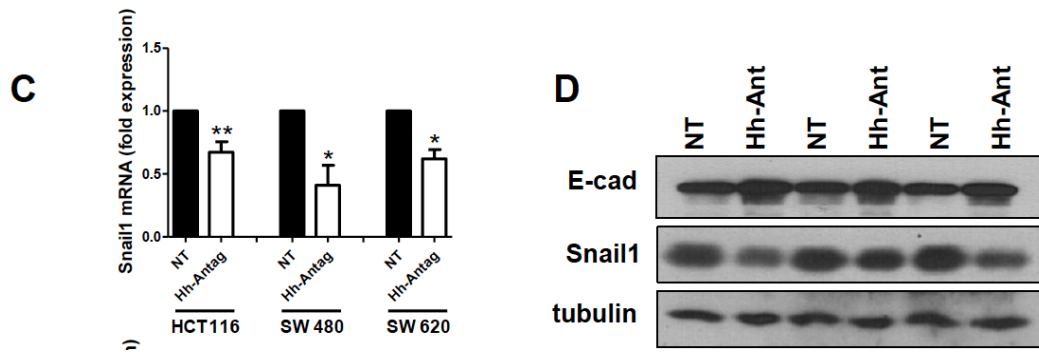


Figura 12. Test di invasione tridimensionale con matrici di Matrigel in cellule HCT 116 in assenza e presenza del trattamento Hh-Antag

A livello molecolare, il trattamento di Hh-Antag ha ridotto in maniera marcata l'espressione di Snail1, principale gene che guida la transizione epitelio-mesenchima e l'invasività tumorale in tutte le linee di carcinoma colo-rettale analizzate. Allo stesso tempo, l'espressione del marcatore epiteliale E-caderina è aumentata in seguito al trattamento con Hh-Antag (Figura 13).



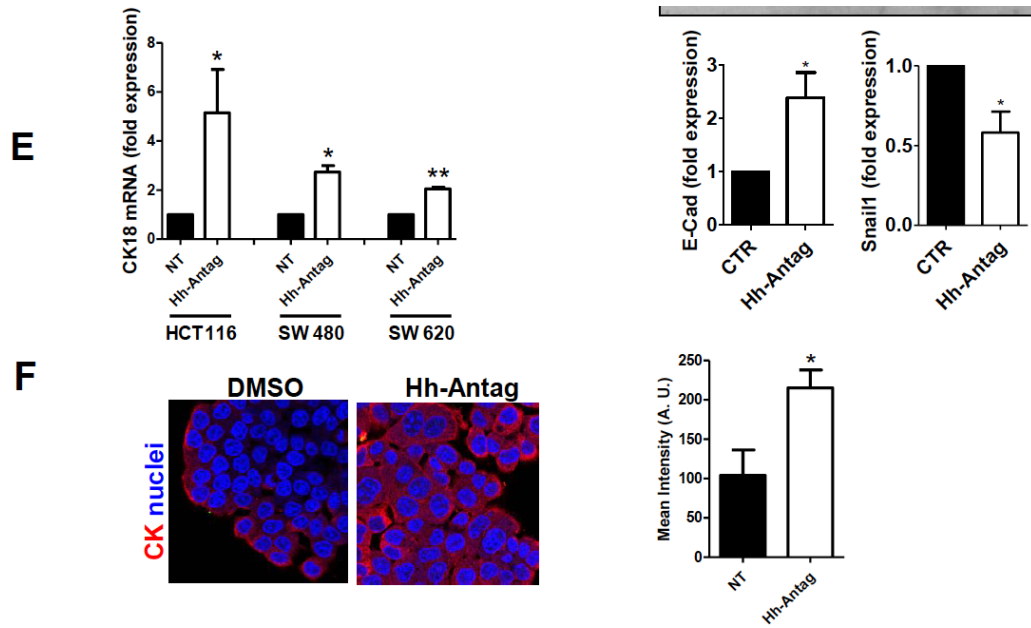


Figura 13. Espressione di Snail1, E-caderina, CK 18, nelle cellule HCT 116, SW 480, SW 620 in assenza e presenza del trattamento con Hh-Antag. La tubulina è stata utilizzata come controllo di caricamento dei campioni.

L'espressione della citocheratina 18 al contrario è aumentata sia a livello di mRNA che proteico in seguito al trattamento delle cellule con Hh-Antag, e tali risultati sono stati confermati dal silenziamento genico di SMO e dall'uso dell'anticorpo monoclonale contro Shh 5E1 mAb come mostrato in Figura 14.

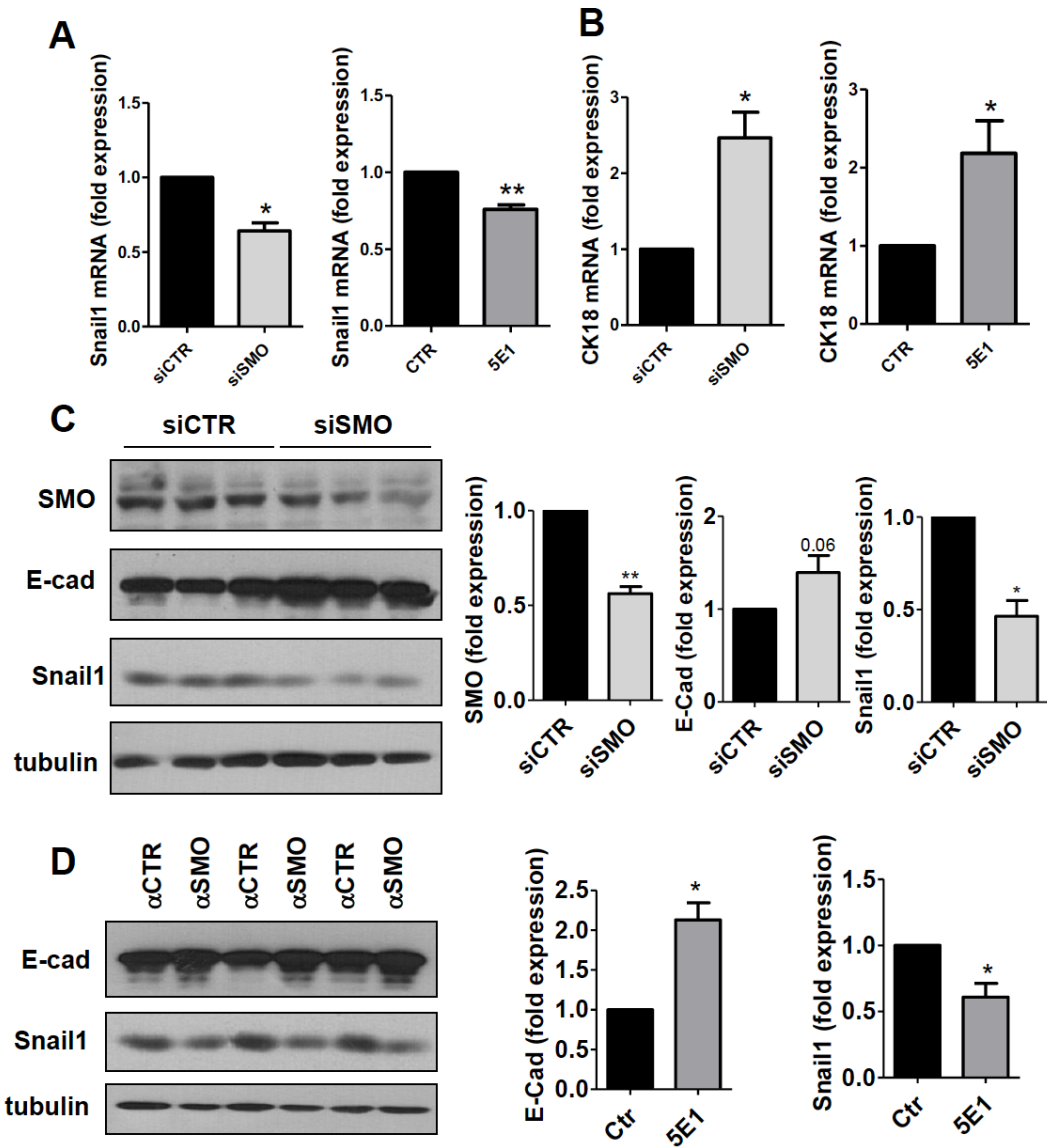


Figura 14. Espressione di Snail1, E-cad, CK 18, in seguito al silenziamento genico di SMO e al trattamento con l'anticorpo monoclonale 5E1.

Anche l'espressione del long non-coding RNA HOTAIR è stata analizzata in presenza e assenza di trattamento con Hh-Antag e confermata in seguito al silenziamento genico e all'uso dell'anticorpo monoclonale 5E1. L'inibizione del pathway di Hh è stata associata a una diminuzione significativa dei livelli di

HOTAIR, come mostrato in Figura 15.

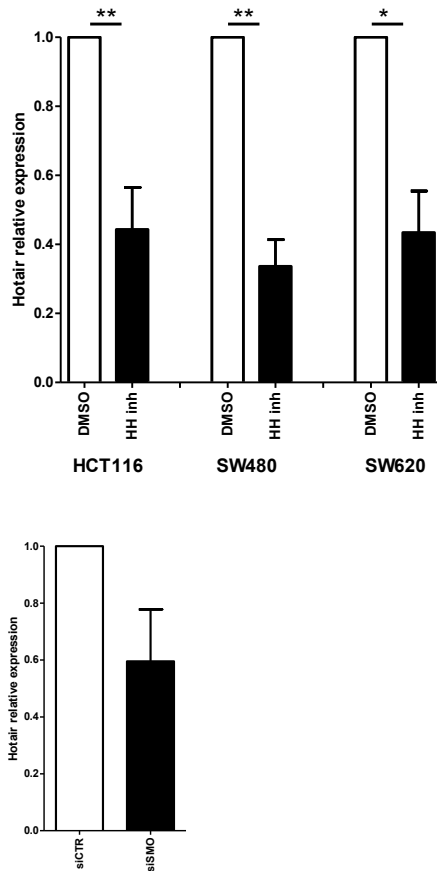


Figura 15. Espressione di HotaIr nelle cellule HCT 116, SW 480, SW 620 in assenza e presenza di trattamento con Hh-Antag.

Questi risultati sono stati comparati con i dati di un database di pazienti con carcinoma colo-rettale, in cui l'aumento dell'espressione dei geni del *pathway* di Hedgehog (GLI1, SMO, ptch1) correlava negativamente con l'espressione di E-caderina (marcatore epiteliale) e positivamente con N-caderina, fibronectina e Snail1 (markers mesenchimali) (Tabella 3,4,5).

Tabella 3. Espressione proteica media in pazienti con overespressione di Gli1. Dati estratti dal database cBioPortal, Colorectal Adenocarcinoma (TCGA, Provisional), n(patients) = 382. La misurazione delle proteine è stata basata su antibody arrays (RPPA = Reverse Phase Protein Array) e la tabella mostra solo I dati significativi con p-value (<0.005).

Gene	Cytoband	Mean protein expression		Standard deviation of protein expression		p-value	q-value	Plot
		In altered group	In unaltered group	In altered group	In unaltered group			
FASN		-0,50	0,10	0,59	0,60	▼	0,00	⊕
FOXM1		-0,36	0,02	0,38	0,56	▼	0,00	⊕
CCNB1		-0,77	0,02	0,90	0,78	▼	0,00	⊕
CCNE1		-0,26	0,06	0,36	0,46	▼	0,00	⊕
RPS6		-0,45	0,04	0,59	0,52	▼	0,00	⊕
MSH6		-0,49	-0,02	0,58	0,60	▼	0,00	⊕
ACACB_PS75		-0,34	0,02	0,48	0,46	▼	0,00	⊕
ACACA_PS75		-0,34	0,02	0,48	0,46	▼	0,00	⊕
SLC1A5		-0,63	-0,04	0,62	0,62	▼	0,00	⊕
CASP7		-0,49	0,13	0,62	1,16	▼	0,00	⊕
ACACA		-0,43	0,00	0,61	0,62	▼	0,00	⊕
DIRAS3		0,23	0,06	0,23	0,33	▲	0,00	⊕
FN1		0,75	0,15	0,67	0,78	▲	0,00	⊕
PEA15		0,28	0,07	0,30	0,31	▲	0,00	⊕
COL6A1		0,73	0,08	1,00	0,59	▲	0,00	⊕
ARID1A		-0,12	0,00	0,19	0,27	▼	0,00	⊕
CDH2		0,15	0,03	0,18	0,25	▲	0,00	⊕
EIF4E		-0,15	0,04	0,29	0,29	▼	0,00	⊕
CHEK2		-0,29	0,09	0,62	0,44	▼	0,00	⊕
RPS6KA1		-0,16	0,09	0,40	0,43	▼	0,00	⊕
CCNE2		-0,07	0,05	0,19	0,24	▼	0,00	⊕
SMAD1		-0,13	0,02	0,23	0,23	▼	0,00	⊕
FOXO3_PS318		0,18	-0,03	0,36	0,24	▲	0,00	⊕
MSH2		-0,07	0,12	0,32	0,32	▼	0,00	⊕
EEF2		-0,23	0,01	0,40	0,41	▼	0,00	⊕
ASNS		-0,13	0,15	0,46	0,57	▼	0,00	⊕
HSPA1A		0,62	0,23	1,04	0,66	▲	0,00	⊕
ITGA2		-0,23	0,07	0,52	0,46	▼	0,00	⊕
PCNA		-0,21	0,01	0,40	0,37	▼	0,00	⊕
CTNNB1		-1,06	-0,32	1,34	1,01	▼	0,00	⊕
TGM2		0,22	0,06	0,28	0,31	▲	0,00	⊕
RB1		-0,06	0,12	0,32	0,32	▼	0,00	⊕
BCL2		0,22	0,02	0,35	0,45	▲	0,00	⊕
ACVRL1		0,30	0,04	0,49	0,37	▲	0,00	⊕
ERBB3		-0,27	0,05	0,59	0,61	▼	0,00	⊕
BAP1		-0,32	-0,08	0,46	0,48	▼	0,00	⊕
RPS6KB1		-0,30	-0,08	0,43	0,37	▼	0,00	⊕
ANKA1		0,34	0,03	0,60	0,59	▲	0,01	⊕
CDH1		-0,30	-0,30	1,24	1,00	▼	0,01	⊕
CDKN1A		0,20	0,03	0,33	0,36	▲	0,01	⊕
BRD4		-0,42	-0,11	0,63	0,50	▼	0,01	⊕
STX11		0,11	0,04	0,14	0,15	▲	0,01	⊕
SGSTM1		-0,31	-0,02	0,59	0,52	▼	0,01	⊕
EIF4EBP1		-0,13	0,04	0,35	0,34	▼	0,01	⊕
BAK1		0,12	0,04	0,17	0,21	▲	0,01	⊕
NRAS		0,17	0,08	0,19	0,23	▲	0,01	⊕
PGR		0,23	0,11	0,24	0,31	▲	0,01	⊕
CDK1_PY15		-0,23	0,00	0,48	0,31	▼	0,01	⊕
MRE11A		0,15	0,04	0,23	0,17	▲	0,01	⊕
AR		0,18	0,06	0,27	0,26	▲	0,01	⊕
WWTR1		0,13	0,01	0,27	0,27	▲	0,01	⊕
GSPD		0,15	0,04	0,24	0,31	▲	0,01	⊕
TP53BP1		-0,40	-0,05	0,78	0,72	▼	0,01	⊕
BECN1		0,13	0,02	0,24	0,22	▲	0,02	⊕
RBM15		-0,54	-0,11	0,98	0,62	▼	0,02	⊕
TFR3		-0,36	0,02	0,64	0,65	▼	0,02	⊕
EIF4G1		-0,66	-0,27	0,88	0,93	▼	0,02	⊕
ESR1		0,19	0,07	0,28	0,36	▲	0,02	⊕
CLDN7		-0,63	-0,07	1,32	1,04	▼	0,02	⊕
XRCC5		-0,27	-0,02	0,59	0,50	▼	0,02	⊕
TSC2		-0,32	-0,06	0,62	0,49	▼	0,02	⊕
GAPDH		-0,39	-0,06	0,81	0,74	▼	0,03	⊕
MS4A1		0,12	0,04	0,68	0,39	▲	0,03	⊕
KIT		0,28	-0,07	0,68	0,90	▲	0,03	⊕
FOXO3		0,13	0,05	0,19	0,24	▲	0,03	⊕
GSK3B		-0,06	0,05	0,28	0,24	▼	0,03	⊕
GSK3A		-0,06	0,05	0,28	0,24	▼	0,03	⊕
CCND1		0,07	-0,01	0,21	0,23	▲	0,04	⊕
CDKN1B		0,21	0,09	0,32	0,34	▲	0,04	⊕
MARK3_PT163		0,27	0,02	0,68	0,39	▲	0,04	⊕
RAB11B		0,14	0,03	0,29	0,24	▲	0,04	⊕
RAB11A		0,14	0,03	0,29	0,24	▲	0,04	⊕
CASP8		-0,04	0,14	0,45	0,79	▼	0,04	⊕
YAP1		0,29	0,14	0,42	0,37	▲	0,04	⊕

Tabella 4. Espressione proteica media in pazienti con overespressione di SMO. Dati estratti dal database cBioPortal, Colorectal Adenocarcinoma (TCGA, Provisional), n(patients) = 382. La misurazione delle proteine è stata basata su antibody arrays (RPPA = Reverse Phase Protein Array) e la tabella mostra solo I dati significativi con p-value (<0.005).

Gene	Cytoband	Mean protein expression		Standard deviation of protein expression		p-Value	q-Value	Plot
		in altered group	in unaltered group	in altered group	in unaltered group			
RP56KA1		-0,13	0,1	0,32	0,44	▼ 1,55E-04 ▼	0,028	Ⓢ
FN1		0,57	0,16	0,67	0,82	▲ 5,20E-04 ▲	0,0379	Ⓢ
GAPDH		-0,42	-0,05	0,62	0,76	▼ 6,32E-04 ▼	0,0379	Ⓢ
CLDN7		-0,61	-0,06	1,08	1,07	▼ 2,82E-03 ▼	0,127	Ⓢ
CASP7		-0,36	0,13	0,98	1,15	▼ 3,76E-03 ▼	0,135	Ⓢ
PTEN		-0,12	-0,03	0,21	0,22	▼ 6,98E-03 ▼	0,209	Ⓢ
PEA15		0,21	0,08	0,29	0,32	▲ 8,33E-03 ▲	0,214	Ⓢ
YAP1		0,32	0,13	0,43	0,36	▲ 0,0113 ▲	0,251	Ⓢ
SYK		-0,21	0,03	0,59	0,54	▼ 0,0138 ▼	0,251	Ⓢ
SLC1A5		-0,36	-0,07	0,76	0,65	▼ 0,0142 ▼	0,251	Ⓢ
TFRC		-0,32	0,03	0,87	0,84	▼ 0,0172 ▼	0,251	Ⓢ
VHL		-0,59	-0,18	1,04	1,21	▼ 0,0193 ▼	0,251	Ⓢ
LCK		-0,06	0,09	0,37	0,47	▼ 0,0201 ▼	0,251	Ⓢ
ERBB3		-0,17	0,04	0,51	0,62	▼ 0,0216 ▼	0,251	Ⓢ
FOXO3_PS318		0,09	-0,02	0,29	0,26	▲ 0,0222 ▲	0,251	Ⓢ
CTNNB1		-0,78	-0,34	1,15	1,05	▼ 0,0223 ▼	0,251	Ⓢ
CDKN1B		0,2	0,08	0,32	0,34	▲ 0,0281 ▲	0,252	Ⓢ
PECAM1		0,15	0,04	0,29	0,27	▲ 0,0282 ▲	0,252	Ⓢ
MRE11A		0,11	0,04	0,2	0,17	▲ 0,0287 ▲	0,252	Ⓢ
EEF2		-0,14	0	0,38	0,42	▼ 0,0304 ▼	0,252	Ⓢ
RB1		0	0,11	0,3	0,33	▼ 0,0304 ▼	0,252	Ⓢ
TSC2		-0,25	-0,07	0,52	0,51	▼ 0,0308 ▼	0,252	Ⓢ
INPP4B		-0,17	0,01	0,5	0,63	▼ 0,0365 ▼	0,258	Ⓢ
RBM15		-0,4	-0,12	0,82	0,65	▼ 0,0375 ▼	0,258	Ⓢ
AR		0,16	0,06	0,31	0,25	▲ 0,0381 ▲	0,258	Ⓢ
EGFR		-0,13	-0,05	0,21	0,25	▼ 0,0393 ▼	0,258	Ⓢ
WWTR1		0,09	0,01	0,21	0,28	▲ 0,04 ▲	0,258	Ⓢ
CDH1		-0,69	-0,32	1,11	1,03	▼ 0,0401 ▼	0,258	Ⓢ
CDH2		0,1	0,03	0,2	0,25	▲ 0,0421 ▲	0,261	Ⓢ
SMAD4		0,06	0	0,19	0,22	▲ 0,0448 ▲	0,262	Ⓢ
SQSTM1		-0,2	-0,03	0,52	0,54	▼ 0,0451 ▼	0,262	Ⓢ

Tabella 5. Espressione proteica media in pazienti con overespressione di Ptch1. Dati estratti dal database cBioPortal, Colorectal Adenocarcinoma (TCGA, Provisional), n(patients) = 382. La misurazione delle proteine è stata basata su antibody arrays (RPPA = Reverse Phase Protein Array) e la tabella mostra solo I dati significativi con p-value (<0.005).

Gene	Cytoband	Mean protein expression		Standard deviation of protein expression		p-Value	q-Value	Plot
		in altered group	in unaltered group	in altered group	in unaltered group			
CCNE2		-0,07	0,05	0,14	0,24	▼ 4,26E-05	▼ 7,67E-03	⊕
SNAI1		-0,02	0,26	0,27	0,95	▼ 2,63E-04	▼ 0,0236	⊕
PCNA		-0,19	0,01	0,34	0,37	▼ 2,80E-03	▼ 0,188	⊕
CCNE1		-0,15	0,05	0,36	0,47	▼ 4,46E-03	▼ 0,179	⊕
CHEK2		-0,17	0,07	0,46	0,48	▼ 5,86E-03	▼ 0,179	⊕
FASN		-0,24	0,06	0,58	0,63	▼ 5,98E-03	▼ 0,179	⊕
RB1		-0,03	0,11	0,27	0,33	▼ 8,58E-03	▼ 0,197	⊕
MET		0,04	0,22	0,26	0,87	▼ 8,74E-03	▼ 0,197	⊕
CASP7		-0,36	0,12	0,97	1,15	▼ 0,0101	▼ 0,202	⊕
SETD2		0,01	0,16	0,28	0,65	▼ 0,0117	▼ 0,208	⊕
CASP8		-0,01	0,14	0,21	0,8	▼ 0,0126	▼ 0,208	⊕
VHL		-0,64	-0,18	1	1,2	▼ 0,0148	▼ 0,221	⊕
RICTOR		0,98	0,26	1,7	1,52	▲ 0,0216	▲ 0,26	⊕
COL6A1		0,47	0,11	0,87	0,64	▲ 0,0229	▲ 0,26	⊕
ACACB_PS79		-0,18	-0,01	0,4	0,48	▼ 0,0231	▼ 0,26	⊕
ACACA_PS79		-0,18	-0,01	0,4	0,48	▼ 0,0231	▼ 0,26	⊕
EGFR		-0,14	-0,05	0,2	0,25	▼ 0,0277	▼ 0,288	⊕
CAV1		0,37	-0,13	1,24	1,09	▲ 0,0288	▲ 0,288	⊕
EIF4EBP1_PS65		0,19	-0,02	0,58	0,44	▲ 0,0452	▲ 0,428	⊕
CDK1_PY15		-0,15	-0,01	0,39	0,34	▼ 0,0476	▼ 0,428	⊕
ERCC1		-0,02	0,05	0,19	0,33	▼ 0,0595	▼ 0,456	⊕
TFRC		-0,28	0,01	0,86	0,85	▼ 0,06	▼ 0,456	⊕
CCNB1		-0,34	-0,04	0,87	0,82	▼ 0,0627	▼ 0,456	⊕
EEF2		-0,15	0	0,44	0,41	▼ 0,0652	▼ 0,456	⊕
YAP1		0,28	0,14	0,42	0,37	▲ 0,0664	▲ 0,456	⊕
FN1		0,46	0,19	0,81	0,81	▲ 0,0729	▲ 0,456	⊕

Nel complesso i risultati riportati dimostrano che nelle linee cellulari primarie e metastatiche analizzate, il blocco del *pathway* di Hedgehog porta a una riduzione della crescita cellulare e dell' invasività, insieme a un aumento delle caratteristiche epiteliali.

DISCUSSIONE

Cancro del colon-retto: fattori molecolari

Il cancro del colon-retto è il terzo tumore più frequente a livello mondiale e mantiene un tasso di mortalità correlata del 33%, con il 90% dei decessi causati dalla malattia in fase metastatica (Wu 2017). La moderna oncologia mira alla comprensione dettagliata dei processi carcinogenetici, al fine di sviluppare terapie molecolari mirate e possibilmente personalizzate, in funzione del profilo genetico del tumore, con lo scopo di aumentare l'efficacia del trattamento e dunque la possibilità di cura e di sopravvivenza a lungo termine. Per quanto riguarda il cancro del colon-retto, sono stati identificati *pathways* e marcatori molecolari che hanno un valore prognostico e, in alcuni casi, rappresentano bersagli terapeutici. Tra di essi, lo stato mutazionale di KRAS rappresenta un fattore prognostico e di risposta alla terapia. KRAS è un proto-oncogene legato alla membrana cellulare che si attiva in seguito all'attivazione dell'EGFR. L'attivazione di KRAS promuove la crescita e la sopravvivenza cellulare e l'invasività. Alcune mutazioni di KRAS portano all'attivazione del *pathway* delle MAP chinasi, e pazienti con mutazioni di KRAS tendono a non rispondere alla terapia anti-EGFR. Le mutazioni di KRAS si riscontrano nel 30-50% dei pazienti e sono associate a un rischio maggiore di recidiva e decesso legato alla malattia.

BRAF fa parte del *pathway* delle MAP chinasi, e l'attivazione di BRAF è successiva a quella di KRAS, lasciando ipotizzare che mutazioni di BRAF

possano avere una presentazione fenotipica simile a quelle di KRAS e implicazioni terapeutiche simili. Invece, non sono state dimostrate in maniera certa resistenze alla terapia con anti-EGFR nei pazienti con mutazioni di BRAF. Le mutazioni di BRAF sono associate a una prognosi peggiore, e a un aumentato rischio di disseminazione peritoneale.

Un ulteriore marcatore molecolare è l'instabilità dei microsatelliti. I microsatelliti sono unità ripetute all'interno del DNA, la cui integrità è mantenuta dai geni del sistema di riparazione degli errori. Quando vi sono alterazioni nel sistema di riparazione degli errori (MMR: mismatch repair), l'instabilità dei microsatelliti predispone all'instabilità genomica e di conseguenza alla tumorigenesi. L'instabilità dei microsatelliti può originare da mutazioni nei geni del MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, TACSTD1) o da ipermetilazione del promotore del gene MLH1. L'instabilità dei microsatelliti si riscontra come evento sporadico nel 10-20% dei pazienti con cancro del colon-retto, mentre mutazioni ereditarie sono più rare (sindrome di Lynch, 0.8-3%).

Il *pathway* dell'instabilità cromosomica (CIN) (80-85% dei tumori colo-rettali) è caratterizzato dal disequilibrio nel numero dei cromosomi, portando a tumori aneuploidici e a perdita di eterozigotà. I meccanismi che portano alla CIN includono alterazioni nella segregazione cromosomica, disfunzioni nei telomeri e nel sistema di risposta al danno del DNA, che coinvolgono geni critici coinvolti nel mantenimento corretto delle funzioni cellulari, come APC, KRAS, PI3K e p53. Mutazioni di APC portano alla traslocazione della beta-catenina nel nucleo attivando la trascrizione di geni implicati nella tumorigenesi e nell'invasione,

mentre mutazioni di KRAS e PI3K portano all'attivazione costante della via delle MAP chinasi, aumentando la proliferazione cellulare. Mutazioni di p53 infine provocano un'incontrollata attivazione del ciclo cellulare.

Un terzo *pathway* fondamentale nella cancerogenesi colo-rettale è quello della instabilità epigenetica: numerosi meccanismi epigenetici regolano l'espressione del DNA in assenza di alterazioni della sequenza nucleotidica. Una regolazione epigenetica aberrante in seguito a iper-metilazione inappropriata di promotori di geni accade frequentemente e ha lo stesso effetto dell'inattivazione di geni immunosoppressori. La metilazione aberrante consiste nel legame covalente di un gruppo metile in posizione 5' della citosina e avviene su sequenze ripetute di nucleotidi CG (citosina e guanina) note come isole CpG. In assenza di metilazione, il gene è normalmente espresso, mentre in seguito alla metilazione il gene è silenziato. Il silenziamento di geni oncosoppressori può originare dalla metilazione di entrambi gli alleli o dalla perdita di un allele per mutazione o delezione combinata alla metilazione dell'altro allele. La metilazione aberrante di MLH1 avviene nell'80% dei tumori colo-rettali con MSI sporadica. Nella tabella seguente sono riportate le più frequenti mutazioni osservate nei cancri colo-rettali.

Tabella 6. Mutazioni geniche correlate con il carcinoma colorettaie

Gene	Chromosomal location	Type of mutation	Prevalence (%)	Function of gene product
KRAS	12p12	Point mutation (codons 12, 13 of exon 2)	40	Cell proliferation and survival
PIK3CA	3q26	Point mutations (E545K on exon 9, H1047R on exon 20)	15–30	Cell proliferation and survival
CDK8	13q12	Gene amplification	10–15	β -Catenin activation
EGFR	7p12	Gene amplification	5–15	Cell proliferation and survival
BRAF	7q34	Point mutations activating kinase activity (most commonly V600E)	5–10	Cell proliferation and survival
CMYC	8q24	Gene amplification	5–10	Cell proliferation and survival
CCNE1	19q12	Gene amplification	5	Cell proliferation and survival
NRAS	1p13	Point mutation	<5	Cell proliferation and survival
CTNNB1	3p22	Stabilizing point mutations and in-frame deletions near N terminus	<5	Regulation of Wnt pathway target genes that promote tumor growth and invasion
ERBB2 (HER2)	17q21	Gene amplification	<5	Cell proliferation and survival
MYB	6q22-q23	Gene amplification	<5	Stimulates growth of intestinal stem cells

Pathway di Hedgehog, correlazione con fattori clinico-patologici e sopravvivenza

Per quanto riguarda il *pathway* di Hedgehog nel tumore colo-rettale, sono stati pubblicati numerosi studi con risultati contrastanti. Come mostrato da Papadopoulos e colleghi in un'estensiva revisione della letteratura pubblicata nel 2016, i dati sono contrastanti riguardo l'espressione dei componenti del *pathway* di Hedgehog, la correlazione con l'andamento clinico della malattia e la sopravvivenza. La mole della letteratura è consistente, sebbene il principale limite di tali lavori sia rappresentato dal numero di pazienti inclusi che è limitato. La maggior parte dei lavori mostra un aumento dell'espressione dei componenti del *pathway* di Hh nel tessuto tumorale, sebbene vi siano dati contrastanti e autori che riportano il contrario (Alinger 2009). Di recente, Wang e colleghi (Wang 2017) hanno riportato un aumento dell'espressione di FoxM1, gene che regola l'espressione di proteine regolatrici del ciclo cellulare, la cui trascrizione dipende dall'attivazione di Gli1, ipotizzando un nuovo asse Hh-Gli1-FoxM1 responsabile

di proliferazione cellulare nel cancro colo-rettale e potenzialmente futuro target terapeutico. Un altro lavoro interessante (Zhi 2016) si è focalizzato su fenomeni epigenetici. Gli autori hanno valutato il ruolo della proteina SPOP (E3 ubiquitin ligase adaptor, che agisce come oncosoppressore), identificando un'ipermetilazione in cellule tumorali colo-rettali. Tale ipermetilazione si associava a un aumento dell'espressione del *pathway* di Hh e una diminuzione di Bcl-2, che provocavano una diminuzione dell'apoptosi.

Per quanto riguarda la correlazione tra caratteristiche clinico-patologiche ed espressione del *pathway* di Hh, la maggior parte degli autori non ha trovato una correlazione con il grado di differenziamento delle cellule tumorali. Al contrario, lo stadio della malattia correlava con un maggior livello di espressione dei componenti del *pathway* di Hh nella maggior parte degli studi. Wang, Xu, e Ding (Wang 2013, Xu 2012, Ding 2012) hanno riscontrato uno stadio T più elevato nei pazienti con aumento dell'espressione di Gli1 e Shh e nel lavoro di Ding anche il tasso di metastatizzazione linfonodale era più elevato. L'espressione di Shh era correlata con la profondità di invasione tumorale e con lo stadio N (Xu 2012, Ding 2012). Inoltre Xu e Hu (Xu 2012, Hu 2011) hanno riscontrato una correlazione dei livelli di espressione proteica di Shh con uno stadio più avanzato (Stadio III/IV). Per quanto riguarda la correlazione con le metastasi epatiche, Yoshikawa ha riscontrato che un elevato livello di espressione proteica di Shh era predittivo di metastasi epatiche (Yoshikawa 2009). L'espressione di Ptch1 è stata correlata a uno stadio avanzato e alle metastasi linfonodali (Xu 2012) e quella di Smo alla presenza di metastasi epatiche (Valenti 2014).

La correlazione tra sopravvivenza ed espressione del *pathway* di Hh è stata analizzata da pochi autori. Xu e colleghi hanno affermato che l'espressione di Shh, Ptch1 e Gli1 rappresentava un fattore prognostico negativo in pazienti sottoposti a colectomia per cancro colo-rettale (Xu 2012). Nel lavoro di Ding (Ding 2012), un'elevata espressione di Smo e Gli1 era predittiva di una peggiore sopravvivenza libera da malattia.

D'altro canto Hong et al. non hanno riscontrato l'utilità prognostica di Shh e Gli1 nella loro coorte di pazienti trattati per carcinoma colo-rettale (Hong 2013). Yoshikawa et al. hanno valutato il ruolo prognostico di Shh, Ptch1 e Smo senza riscontrare alcuna associazione significativa con la sopravvivenza (Yoshikawa 2009). Li et al non sono riusciti a dimostrare il valore prognostico di Smo (Li 2014). La variabilità dei risultati riportati rispecchia i limiti della letteratura finora esistente: l'eterogeneità degli studi, il numero esiguo di pazienti arruolati che diminuisce la potenza statistica dei lavori, le variazioni nella metodologia impiegata e soprattutto le soglie impiegate per definire la positività immunohistochimica sono stati differenti, il numero dei patologi che hanno osservato i campioni è stato >1 soltanto nella minoranza degli articoli, gli anticorpi usati e la metodologia sono stati differenti, per cui comparare tali risultati risulta impossibile. L'analisi della letteratura porta però a concludere che l'attivazione del *pathway* di Hh sembra essere un evento frequente nel cancro colo-rettale, con un ruolo predittivo per caratteristiche di maggiore aggressività tumorale e peggiore sopravvivenza. Da tali presupposti, origina la necessità di studiare gli effetti sulle cellule tumorali colo-rettali dell'inibizione del *pathway* di

Hh.

Tabella 7. Espressione dei componenti del *pathway* di Hh nei tumori colo-rettali in letteratura

Autore	N.	Membro pathway Hh	Espressione T	Espressione non T	Correlazione clinico-patologica	Sopravvivenza globale
Oniscu	8	Shh, Ptch1, Smo	Stronger staining Hh		Higher Hh expressions in crypts	NR
Akiyoshi	40	Gli1	Score 0=42.5% Score 1=32.5% Score 2=25%	Strong staining restricted to the epithelium	Reduced Gli1 staining in poorly differentiated cancers	NR
Douard	44	Shh, Gli1	Shh: higher expression in 86% of cases		NS	NR
Monzo	57	Shh	High expression: 82% vs 3%		Lower values of Shh in stages III-IV	NR
Bian	25	Shh, Ptch1, Hip, Gli1, Gli3	Shh =48%; Ptch1=44%; Gli1=52%; Hip=16%; Gli3= no	Shh=no	NR	NR
Taniguchi	59	Hip	mRNA expression reduced = 44%; overexpression=33%	Hh lower than cancers	Reduced Hip associated with nodal metastasis in CRCs with strong Shh expression	NR
Yoshikawa	69	Shh, Ptch1, Smo	Shh=29%; Ptch1=69%; Smo=71%	Shh, Ptch1 e Smo=0%;	Shh: significantly related to liver metastases	NS
Alinger	273	Shh	Shh=19.2%	Shh=98.7%	NR	NR
Fu	25	Shh	Shh strong=72%; weak=24%	NR	Higher Shh expression in stage III-IV	NR
Fu	36	Shh, Gli, Ihh	Shh e Gli >, Ihh almost lost		NS	NR
You	19	Shh, Ptch1	NR	NR	NR	Lower Ptch1 in the high risk group (recurrence within 2 years)
Hu	61	Shh Ptch1 Gli1	54.1% 62.3% 54.1%	NR	Shh more frequent in stage III-IV, Shh, Gli1 e Ptch1 more expressed in MSI group	NR
Xu	228	Shh Ptch1 Gli1	59.6% 71.5% 75.4%	No No 29.8%	Shh/Ptch1 expression	Shh+=50.7% Shh-=88.9% Ptch1+=55.2%

					correlated with stage and nodal status, Gli1 expression correlated with T	Ptch1-=80% Gli1+=50% Gli1-=89.3%
Ding	96	Smo	Median score=6	Median score=2	Smo expression related to nodal status and T	DFS > i flow Smo (49 vs 28 months)
Ding	96	Gli1	Median score=8	Median score=4	Gli1 expression related to nodal status, T	Liver mets free survival 48.2 months if low Gli, 28 if high Gli
Wang	43	Shh Smo Gli1	27.9% 83.7% 34.9%	18.6% 58.1% 16.3%	NS	NR
Iwasaki	50	Gli1 Gli2 Gli3 Shh	52% 56% 24% 60%	Gli3=none SHh= little in stroma	Gli3 associated with poor differentiation	NR
Hong	189	Shh Gli1	37.6% 78.4%	Mild	NS	NR
Wang	127	Shh, Ptch1, Gli1, Sufu	Higher expression of Hh members in CRC than notmal tissue		Shh and Ptch1 higher in non mucinous cancers, Sufu higher in mucinous cancers, related to diameter and T	NR
Valenti	20	Shh Smo	1+= 14% 2+=48% 3+=33%	NR	Patients with smo 3+ had liver limited disease more frequently	NR
Szkandera	742	Gli1 polymorphism	G/G=50% G/C=42% C/C=8%	NR	NR	Time to recurrence lower in CC (121 vs 52 months)
Li	735	Smo	50%	NR	Smo related with grade	In CIMP-high tumros Smo associated with better CRC specific survival
Fu	40	lhh	CRC=0.17	0.85	NR	NR

Ruolo degli inibitori del *pathway* di Hedgehog e chemioterapia

Dal punto di vista degli studi sull'inibizione del *pathway* di Hh, numerosi lavori

sono stati pubblicati su linee cellulari colo-rettali, che hanno portato alla formulazione di varie ipotesi. Un solo studio clinico randomizzato ha valutato il ruolo del vismodegib, inibitore del *pathway* di Hh che agisce su Smo, in associazione alla chemioterapia tradizionale (Berlin 2013).

Lo studio randomizzato pubblicato da Berlin nel 2013 (Berlin 2013) rappresenta una referenza fondamentale, nonché un argomento di forte peso contro la prosecuzione delle ricerche sull'uso di inibitori del *pathway* di Hh nel carcinoma coloretale. Gli autori di questo lavoro randomizzato in doppio ceco hanno incluso 199 pazienti con cancro colo-rettale metastatico, trattati in diversi centri statunitensi, con chemioterapie basate su protocollo FOLFOX (124 pazienti) o FOLFIRI (75 pazienti). Tali pazienti erano randomizzati in due gruppi, e ricevevano 150 mg di vismodegib per via orale (dose raccomandata da precedenti studi di fase II in pazienti con carcinoma a cellule basali o medulloblastoma) o un placebo, in aggiunta alla chemioterapia tradizionale. In totale, 101 pazienti sono stati assegnati al gruppo del placebo e 98 a quello del vismodegib. Non sono state ottenute differenze significative per quanto riguarda la sopravvivenza libera da progressione, che rappresentava l'end-point primario, né per la sopravvivenza globale. Non ci sono state differenze di sopravvivenza in relazione ai livelli di espressione del ligando di Hh, o a mutazioni di KRAS o all'espressione di SMO, GLI1, PTCH1. La tossicità del trattamento è stata maggiore nel gruppo "vismodegib". Due ipotesi sono possibili per spiegare i risultati di questo studio: 1) l'inibizione del *pathway* di Hh non è sufficiente per modificare il decorso clinico del tumore colo-rettale; 2) vismodegib potrebbe interagire negativamente

con gli altri farmaci utilizzati per la chemioterapia. Nello studio, sono stati effettuati dosaggi farmacologici che hanno mostrato che la concentrazione plasmatica degli altri farmaci non è modificata dalla somministrazione di vismodegib, e che la concentrazione di vismodegib è simile a quella riportata dai lavori che hanno usato il vismodegib in monoterapia.

Altri studi hanno però ridato spinta alla ricerca sul cancro colo-rettale e il *pathway* di Hh, aprendo nuove linee di ricerca, tra cui quella sull'eventuale ruolo dei componenti del *pathway* di Hh nel generare la chemioresistenza. Zhang e colleghi (Zhang 2017) hanno recentemente mostrato che elevati livelli di espressione di GLI1 erano associati a un aumento del rischio di recidiva tumorale e a una bassa sopravvivenza in pazienti con cancro colo-rettale sottoposti a chemioterapia con 5-fluorouracile. Inoltre, l'elevata espressione di GLI1 era associata ad una minore efficacia della chemioterapia con 5-FU, e il silenziamento di GLI1 e GLI2 sensibilizzava le cellule tumorali al 5-FU. In questo lavoro l'uso di un antagonista di SMO non era in grado di sensibilizzare le cellule al 5-FU, suggerendo che l'induzione di GLI1 nei pazienti con maggiore resistenza alla chemioterapia non era legata alla via di segnalazione canonica di Hh. Secondo gli autori tale osservazione spiegherebbe perché il vismodegib non ha avuto effetto nello studio clinico di Berlin (Berlin 2013). Tali risultati permettono di ipotizzare l'uso in terapia di molecole mirate verso GLI1, come GANT61 e il triossido di arsenico per sensibilizzare le cellule al 5-FU.

Liu e coautori (Liu 2015) hanno caratterizzato i profili di EMT in 2 linee cellulari, le HCT-8/WT e le HCT-8/5-FU, resistenti al 5-FU. Le cellule chemioresistenti

avevano una maggiore espressione di marcatori mesenchimali (vimentina) e una riduzione dei marcatori epiteliali (E-caderina), e una maggiore capacità migratoria. Gli autori hanno somministrato GDC0449 (vismodegib), osservando che il farmaco era in grado di sensibilizzare le cellule chemioresistenti al 5-FU. Inoltre, il vismodegib modifica la EMT regolando negativamente l'espressione di N-caderina. Da questi dati si evince che la chemioresistenza è associata alla EMT e che l'inibizione di Hh può contrastare entrambi i fenomeni, aprendo degli sviluppi futuri per il trattamento del cancro del colon chemioresistente.

Du e colleghi (Du 2016) hanno studiato l'effetto del resveratrolo, composto polifenolico presente in 70 specie di piante sulla linea cellulare HCT 116. In questo studio, il signaling di Hh regolava la proliferazione cellulare e inibiva l'apoptosi. La somministrazione di resveratrolo inibiva la vitalità delle cellule HCT116, inducendo l'apoptosi. Tale farmaco, riduceva inoltre la capacità migratoria e induceva l'apoptosi inibendo l'espressione dei geni del *pathway* di Ptch, Smo, Gli1 e Shh.

Pathway di Hedgehog, EMT, long non-coding RNA

La transizione epitelio-mesenchima è un processo che porta alla modificazione delle cellule epiteliali, che diventano allungate e fusiformi, perdono la polarità, e le adesioni cellulari mediate dalla E-caderina. La EMT è stata studiata a partire dagli anni '80, inizialmente in relazione alla embriogenesi e alla riparazione tissutale. In seguito, è stato osservato che la EMT può avere un ruolo nella

carcinogenesi e nella formazione di metastasi. Per quanto riguarda il cancro coloretale, la EMT è stata associata a un aumento della invasività, a una diminuzione dell'apoptosi, allo sviluppo di metastasi. Tra i marcatori utilizzati per identificare la EMT ci sono la E-caderina, ma anche la gamma-catenina, la alfa-catenina, la desmopachina e la placoglobina, (per quanto riguarda i marcatori epiteliali), e la vimentina, N-caderina, fibronectina, desmina, Snail, Notch, PDGF, integrina (per quanto riguarda i marcatori mesenchimali) (Gurzu 2016).

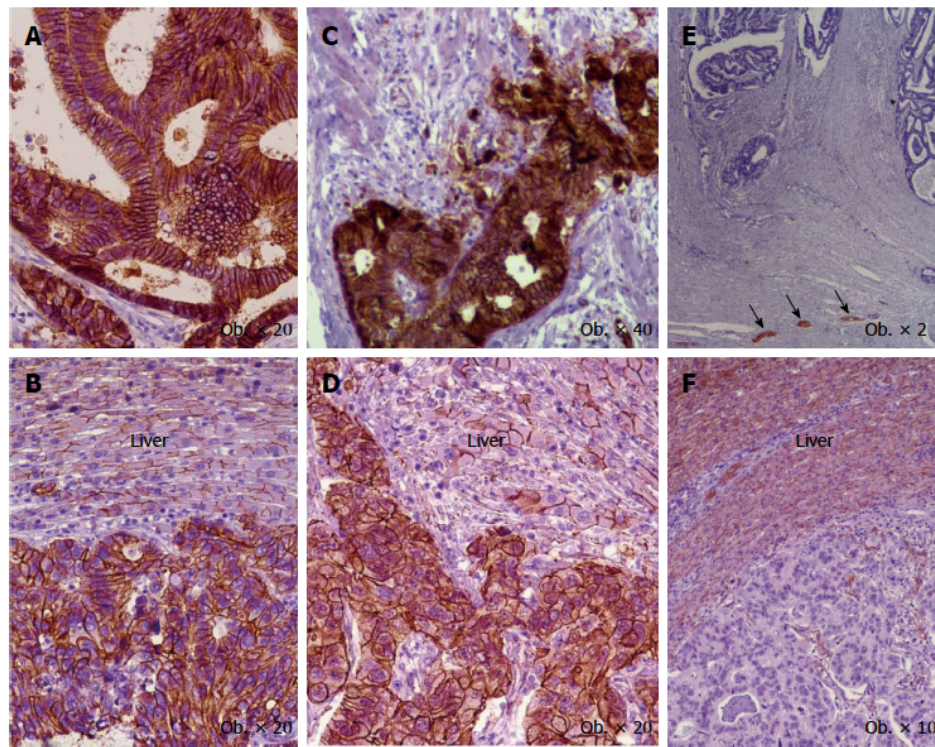


Figura 16. Immuno-espressione della EMT nel tumore primario (A,C,E) e nelle metastasi epatiche (B,D,F). Positività della membrana per E-caderina (A,B), e beta catenina (C,D) e negatività per N-caderina (E,F). Gli epatociti normali esprimono E-caderina (B), beta-catenina (D), N-caderina (F)

Numerose vie cellulari hanno un ruolo di regolatori nel processo di EMT. Tra gli

studi recenti che hanno messo in evidenza il ruolo del *pathway* di Hh in relazione alla transizione epitelio-mesenchima vi è quello di Qualtrough e colleghi (Qualtrough 2015). Questo gruppo aveva in precedenza mostrato l'espressione di componenti del *pathway* di Hh negli adenomi e carcinomi colo-rettali, suggerendo un ruolo autocrino della via di segnalazione di Hh, e un ruolo oncogenico. Partendo dall'importanza della via di segnalazione di Wnt nelle cellule tumorali colo-rettali, gli autori hanno studiato l'effetto della ciclopamina (inibitore del *pathway* di Hh) su Wnt. I risultati mostrano che l'espressione di beta-catenina era significativamente ridotta dopo trattamento con ciclopamina nelle cellule SW480, in maniera dose-dipendente. Inoltre, il trattamento con ciclopamina induceva l'espressione della E-caderina, importante marcatore epiteliale, e regolava negativamente l'espressione dei fattori trascrizionali associati alla EMT quali Slug, Snail, Twist. Tali risultati depongono a favore di un *cross-talking* tra *pathways* di Hh e Wnt e per un ruolo di Hh nel regolare la EMT.

Tra le complesse relazioni del *pathway* di Hh, vi è anche quella con la via della PI3 chinasi, studiata da Cai e colleghi (Cai 2015), che hanno studiato l'effetto della somministrazione di triossido di arsenico (inibitore di Hh) e dell'inibitore di PI3K LY294002 su cellule di carcinoma colico. I due farmaci hanno mostrato di avere un effetto sinergico, riducendo l'espressione di Gli1 del 60-80% e la vitalità delle cellule HT29 dal 40% al 60%, indicando un effetto combinato di Hh e PI3K da tenere in considerazione nel possibile trattamento futuro del cancro colo-rettale.

Il long non-coding RNA HOTAIR

Il numero di geni che codificano per delle proteine nel genoma umano è limitato: la maggior parte del DNA genomico (80-90%) è trascritta in RNA che non produce alcuna proteina, chiamato non-coding RNA (ncRNA). I lncRNA sono RNA lunghi più di 200 nucleotidi, che rappresentano fattori di regolazione trascrizionali e post-trascrizionali. Recentemente si è scoperto il loro importante ruolo di regolatori dell'espressione genica (Hajjari 2015). I lncRNA regolano inoltre l'attività epigenetica, reclutando proteine che modificano la cromatina come PRC2 e modificando in questo modo l'espressione genica. Per tali ragioni, i lncRNA hanno un ruolo importante nello sviluppo di diversi tumori e sono correlati alla prognosi clinica. L'espressione di lncRNA con funzioni proto-oncogeniche è legata alla tumorigenesi e ai processi di proliferazione tumorale e metastatizzazione (Hajjari 2013). HOTAIR è un lncRNA che è stato descritto ampiamente da Rinn et al. (Rinn 2007), composto da 2158 nucleotidi e 6 esoni. HOTAIR risulta dalla trascrizione del filamento complementare a quello del gene HoxC, situato tra HoxC11 e HoxC12 sul cromosoma 12q13.13. HOTAIR interagisce con il Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), ed è necessario per il reclutamento di PRC2 e la metilazione (a livello della lisina 27 dell'istone H3) di differenti geni in diversi cromosomi. PRC2 è una istone metil transferasi che promuove il silenziamento epigenetico durante vari processi, incluso lo sviluppo tumorale. PRC2 è un complesso che contiene 3 subunità maggiori, che includono EZH2, SUZ12, EED. L'RNA dirige PRC2 verso i suoi geni bersaglio e mediante

l'attività della subunità enzimatica EZH2 ne inibisce l'espressione. Quando PRC2 raggiunge il gene target, JARID2 si lega a EZH2 e EZH2 si attiva.

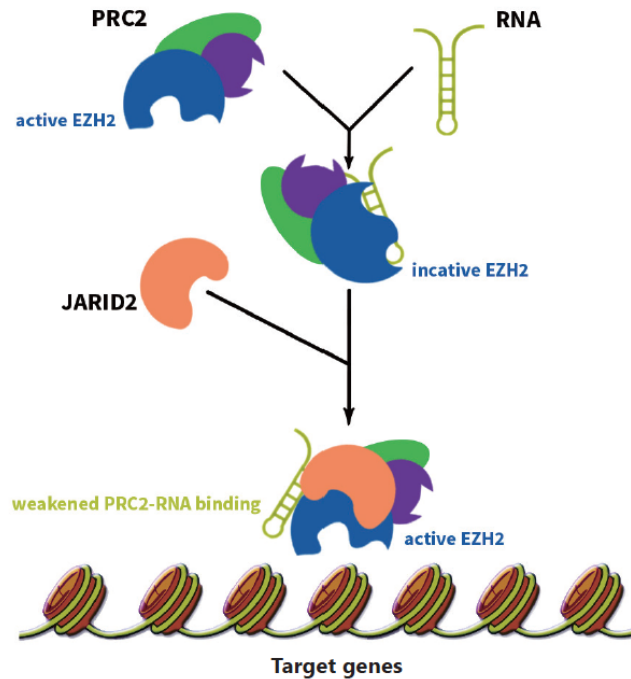


Figura 17. Schema del funzionamento del complesso PRC2. L'RNA guida PRC2 verso il gene target e inibisce l'attività enzimatica di EZH2. Quando PRC2 raggiunge il gene target, JARID2 si lega a EZH2, indebolisce il legame tra RNA e EZH2 e di conseguenza attiva la funzione di EZH2

HOTAIR interagisce con PRC2 ma anche con LSD1 per regolare l'espressione genica, coordinando la modificazione della cromatina e influenzando l'espressione di molteplici geni e varie funzioni cellulari (Luo 2016). HOTAIR rappresenta un fattore oncogenico e prognostico in molteplici tumori, incluso il cancro colo-rettale. Inoltre HOTAIR ha un ruolo importante nel processo di tumorigenesi e nella EMT, nonché nell'acquisizione di caratteristiche staminali.

Nel cancro del colon-retto, Luo et al. (Luo 2016) hanno dimostrato come HOTAIR era espresso in maniera significativamente maggiore nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale, e che era maggiormente espresso nei casi con metastasi linfonodali, scarsamente differenziati e negli stadi più avanzati. Tale studio suggeriva la rilevanza di HOTAIR come fattore prognostico e un suo potenziale ruolo nel processo di tumorigenesi, sviluppo e metastatizzazione del cancro colo-rettale.

Tabella 8. Espressione di HOTAIR in differenti tumori

Type	Overexpression of <i>HOTAIR</i>
Breast cancer	Poor prognosis, metastasis, invasion, and short overall survival
Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC)	Poor prognosis, high TNM stage, invasion, metastasis, and short overall survival
Gastric cancer	Tumor staging, venous infiltration, and lymph node metastasis
Hepatocellular carcinoma	Invasion of HCC cells, possibility of recurrence
Colorectal cancer	Poor prognosis, low survival, and metastasis promotion
Gallbladder cancer (GBC)	Promoting carcinogenesis
Bladder cancer (BC)	Poor prognosis and high recurrence rate
Renal carcinoma	Proliferation, invasion, and promotion of tumor growth
Cervical cancer	FIGO stage, aggression, and lymph node metastasis
Epithelial ovarian cancer	Poor prognosis, FIGO stage, lymph node metastasis, overall survival, and metastatic stage of EOC
Endometrial carcinoma	Poor prognosis, lymph node metastasis, EC grade, and overall survival
Lung cancer	Invasion and metastasis
Non-small cell lung cancer	Promotion of lymph node metastasis
Small-cell lung cancer	Poor prognosis, proliferation and invasion
Nasopharyngeal carcinoma	Poor prognosis, overall survival, proliferation, invasion, and promotion of tumor stage
Melanoma	Invasion and metastasis
Glioma	Poor prognosis, cell cycle progression, and glioma grade
Pancreatic cancer	Proliferation and aggression of tumors

Tali osservazioni sono state confermate dallo studio di Yang e colleghi (Yang 2016), che hanno silenziato HOTAIR per esplorarne il ruolo in 53 campioni di cancro colo-rettale. Nel tessuto tumorale è stata riscontrata un'espressione significativamente maggiore di HOTAIR e la deplezione di HOTAIR portava a

una riduzione *in vitro* della proliferazione, migrazione e invasività cellulare, mentre l'apoptosi e la radiosensibilità aumentavano. Dou et al. (Dou 2016) hanno riportato risultati analoghi. Il silenziamento di HOTAIR diminuiva la proliferazione, migrazione, capacità di formare colonie delle cellule, nonché l'espressione di vimentina, mentre l'espressione di E-caderina era aumentata nelle cellule CD133 positive (cellule staminali colo-rettali), suggerendo il potenziale utilizzo di HOTAIR come target terapeutico.

Efficacia del vismodegib su linee cellulari di CRC

In base alla revisione della letteratura effettuata, possiamo affermare che il *pathway* di Hedgehog è una via di segnalazione cellulare over-espressa in una percentuale considerevole di tumori colo-rettali. L'iperattivazione del *pathway* è correlata secondo la maggior parte degli studi a un aumento della proliferazione cellulare, della tumorigenesi, e dell'invasività, alla EMT, alla capacità di generare metastasi e a una prognosi peggiore. Alcuni studi riportano però risultati contrastanti. Per tali ragioni è necessario accumulare maggiori evidenze sull'espressione del *pathway* nelle cellule tumorali colo-rettali. Inoltre, soltanto pochi studi hanno analizzato l'effetto di vismodegib ad oggi: nella maggior parte dei lavori è stata utilizzata la ciclopamina, un inibitore classicamente usato in passato come antagonista del *pathway* di Hh. Inoltre, nel nostro studio abbiamo voluto approfondire il ruolo ancora non sufficientemente studiato dell'inibizione del *pathway* di Hh sulla EMT, valutando i livelli di espressione di marcatori

specifici. Per la prima volta, inoltre, è stato studiato l'effetto del trattamento di cellule tumorali colo-rettali con vismodegib sull'espressione di un long non-coding RNA: HOTAIR.

I risultati del lavoro sono stati in linea con i presupposti teorici e hanno confermato le ipotesi di partenza. Innanzitutto l'analisi del dataset cBioPortal ci ha permesso di identificare un'associazione tra l'aumento dell'espressione di Gli1 e una peggiore sopravvivenza, stimolando le ricerche *in vitro* sul *pathway* di Hh. Gli esperimenti effettuati su linee di cancro colo-rettale primitivo e metastatico trattate con Hh-Antag hanno confermato che l'espressione dei geni GLI1, Ptch1, Hip, Muc5ac diminuisce significativamente in seguito a trattamento con il farmaco. Abbiamo confermato i dati ottenuti sulla capacità di Hh-Antag di regolare negativamente la via di segnalazione di Hh silenziando SMO e utilizzando un anticorpo monoclonale contro Shh. Tale procedura corrobora l'ipotesi che alcune linee tumorali colo-rettali abbiano una secrezione di Shh che agisce in maniera autocrina mantenendo la via di Hh attiva. Hh-Antag si è inoltre dimostrato efficace nel ridurre la proliferazione cellulare nelle 3 linee di cancro colo-rettale studiate e nel modificare l'espressione di regolatori del ciclo cellulare. L'esposizione a Hh-Antag ha provocato la diminuzione della ciclina D1 e l'aumento di p21 (risultati analoghi sono stati ottenuti anche con il silenziamento genico e con l'anticorpo anti-Shh), dimostrando il ruolo del *pathway* di Hh nella proliferazione cellulare. Inoltre, la motilità e invasività cellulare è risultata ridotta in seguito al trattamento con il farmaco. Abbiamo voluto studiare il ruolo di questa via di segnalazione sulla EMT, dimostrando come il trattamento delle

cellule con Hh-Antag riduceva l'espressione dei marcatori mesenchimali (Snail1) e aumentava quella dei marcatori epiteliali (E-caderina e citocheratina). Infine abbiamo voluto osservare l'effetto di Hh-Antag sull'espressione di HOTAIR, che risultava significativamente ridotta in seguito al trattamento. L'analisi di questi dati e il confronto con i risultati di precedenti studi rafforzano l'ipotesi di un possibile ruolo dei componenti del *pathway* di Hh come bersaglio terapeutico in una percentuale superiore al 50% dei tumori colo-rettali. Il trattamento con Hh-Antag *in vitro* è efficace nel ridurre la proliferazione, la migrazione cellulare, la EMT e i livelli del lncRNA proto-oncogenico HOTAIR, fattori associati all'aggressività clinica tumorale e alla capacità di metastatizzare. La sfida futura è quella di verificare i risultati *in vitro* tramite modelli animali, e successivamente tramite test clinici. Un solo studio clinico randomizzato ha analizzato il ruolo di vismodegib in pazienti con cancro colo-rettale metastatico, dando risultati deludenti. Tale studio era però limitato dal numero di variabili potenzialmente confondenti, prima tra tutti l'uso concomitante di altri chemioterapici che avrebbero potuto interferire con l'inibitore di SMO.

Limiti dello studio

Tra i limiti dello studio, annoveriamo il fatto che si tratti di uno studio *in vitro*. I risultati positivi ottenuti potrebbero non essere replicabili in modelli *in vivo*, dove altri fattori, che includono la biodisponibilità e la biodistribuzione del farmaco, e le caratteristiche del tessuto (vascolarizzazione, stroma), potrebbero modificare

l'effetto che vismodegib ha sulle cellule di cancro colo-rettale. Inoltre, le linee cellulari utilizzate sono 3. Abbiamo usato linee primitive e metastatiche, ma chiaramente il numero di linee usate non può rispecchiare in maniera ottimale lo spettro di varietà ed eterogeneità di una malattia complessa come il cancro colo-rettale. Tra gli obiettivi futuri, si propone quindi lo sviluppo di modelli animali e l'ampliamento dei campioni tumorali testati, possibilmente con l'uso di tessuti derivati da pazienti trattati nelle strutture della Sapienza, di cui si possano seguire il decorso clinico e le terapie adiuvanti, in modo da poter avere una correlazione clinico-patologica tra le caratteristiche dei campioni prelevati e le variabili istologiche e la sopravvivenza.

Possibili sviluppi futuri

Tra i campi di ricerca futuri, uno dei più interessanti è quello che riguarda il ruolo del *pathway* di Hh nella regolazione delle cellule staminali colo-rettali.

L'ipotesi che i tumori contengano una popolazione cellulare che possiede capacità di auto-rinnovarsi e di differenziare è accettata ormai per numerosi tumori, incluso il carcinoma colo-rettale (Pan 2017, Cochrane 2015, Lee 2016, Ricci-Vitiani 2007). Le cellule staminali tumorali possiedono un alto potenziale di differenziamento, capacità di auto-rinnovarsi e di metastatizzare, e chemioresistenza. Le cellule staminali tumorali sono probabilmente implicate nella carcinogenesi, nella recidiva tumorale, nello sviluppo di metastasi. Lo studio delle cellule staminali tumorali ha notevole rilevanza clinica: tali cellule

potrebbero rappresentare un bersaglio importante per nuovi chemioterapici. La loro identificazione e il loro isolamento si basa sull'analisi di una combinazione di marcatori cellulari di superficie utilizzando tecniche di immunofluorescenza, analisi mediante citofluorimetria (FACS) e separazione immunomagnetica. La presenza di marcatori di cellule staminali colo-rettali è stata associata alla prognosi e alla risposta alla chemioterapia, suggerendo che vi sia un forte legame tra la popolazione di cellule staminali colo-rettali e l'evoluzione clinica del cancro colo-rettale (Wang 2013, Wang 2016). Il ruolo del *pathway* di Hh è stato analizzato soltanto di recente e da pochi autori per quanto concerne le cellule staminali tumorali. Batsaikhan et al. (Batsaikhan 2014) hanno analizzato l'inibizione del *pathway* di Hh tramite un farmaco, la ciclopamina, sulla linea HCT-116, isolando una sottopopolazione di cellule che esprimeva marcatori "staminali". Hanno trattato le cellule con ciclopamina e analizzato l'espressione genica tramite PCR. In questo studio, la ciclopamina regolava negativamente in maniera dose-dipendente l'espressione di marcatori staminali, l'espressione di geni a valle di Hh e dei marcatori della transizione epitelio-mesenchima nella sottopopolazione staminale estratta dalla linea HCT-116. Un lavoro recente (Wang 2016) correlava l'espressione dell'enzima antiossidante perossiredoxina 2 (Prdx2) alla presenza di cellule staminali colo-rettali, tramite l'attivazione del *pathway* di Hh e Gli1, suggerendo uno stretto legame tra *pathway* di Hh e cellule staminali tumorali. L'inibizione di Hh sembrerebbe quindi poter ridurre la popolazione di cellule staminali, e la transizione epitelio-mesenchima, con possibile effetto sui fenomeni di resistenza alla chemioterapia (che sono mediati

dalle cellule staminali) e metastatizzazione (favorita dalla transizione epiteliomesenchima). Le difficoltà potenziali sono rappresentate dall'isolamento delle cellule staminali: le metodiche non sono ancora standardizzate, e tali cellule possono andare incontro rapidamente a fenomeni di differenziamento, perdendo le loro caratteristiche di “staminalità” e potenzialmente alterando i risultati.

Un'ulteriore linea di ricerca da sviluppare riguarda il ruolo del pathway di Hh sulla chemioresistenza. Alcuni studi preliminari hanno suggerito che l'attivazione del pathway di Hh potrebbe essere correlata alla chemioresistenza alle terapie tradizionali per il cancro coloretale (Zhang 2017), formulando l'ipotesi che l'associazione di inibitori del *pathway* di Hh possa aumentare l'efficacia delle chemioterapie tradizionali migliorando la prognosi dei pazienti.

BIBLIOGRAFIA

- Abetov D, Mustapova Z, Saliev T, Bulanin D. Biomarkers and signaling pathways of colorectal cancer stem cells. *Tumour Biol.* 2015 Mar;36(3):1339-53. Doi: 10.1007/s13277-015-3198-4. Epub 2015 Feb 14. Review.
- Agyeman A, Jha BK, Mazumdar T, Houghton JA. Mode and specificity of binding of the small molecule GANT61 to GLI determines inhibition of GLI-DNA binding. *Oncotarget.* 2014;5(12):4492–4503.
- Agyeman A, Mazumdar T, Houghton JA. Regulation of DNA damage following termination of Hedgehog (HH) survival signaling at the level of the GLI genes in human colon cancer. *Oncotarget.* 2012;3(8):854–868.
- Alinger B, Kiesslich T, Datz C, et al. Hedgehog signaling is involved in differentiation of normal colonic tissue rather than in tumor proliferation. *Virchows Arch.* 2009;454(4):369–379.
- Augestad KM, Merok MA, Ignatovic D. Tailored Treatment of Colorectal Cancer: Surgical, Molecular, and Genetic Considerations. *Clin Med Insights Oncol* 2017 Feb 16;11:1179554917690766.
- Batsaikhan BE, Yoshikawa K, Kurita N, Iwata T, Takasu C, Kashihara H, Shimada M. Cyclopamine decreased the expression of Sonic Hedgehog and its downstream genes in colon cancer stem cells. *Anticancer Res.* 2014 Nov;34(11):6339-44.
- Battistelli C, Cicchini C, Santangelo L, Tramontano A, Grassi L, Gonzalez FJ, de Nonno V, Grassi G, Amicone L, Tripodi M. The Snail repressor recruits EZH2 to

- specific genomic sites through the enrollment of the lncRNA HOTAIR in epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene*. 2017;36:942-955.
- Berlin J, Bendell JC, Hart LL, Firdaus I, Gore I, Hermann RC, Mulcahy MF, Zalupski MM, Mackey HM, Yauch RL, Graham RA, Bray GL, Low JA. A randomized phase II trial of vismodegib versus placebo with FOLFOX or FOLFIRI and bevacizumab in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2013 Jan 1;19(1):258-67. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1800. Epub 2012 Oct 18.
 - Bertrand FE, Angus CW, Partis WJ, Sigounas G. Developmental pathways in colon cancer: crosstalk between WNT, BMP, Hedgehog and Notch. *Cell Cycle*. 2012 Dec 1;11(23):4344-51. doi: 10.4161/cc.22134. Epub 2012 Oct 3. Review.
 - Bian YH, Huang SH, Yang L, Ma XL, Xie JW, Zhang HW. Sonic hedgehog-Gli1 pathway in colorectal adenocarcinomas. *World J Gastroenterol*. 2007;13(11):1659-1665.
 - Cai X, Yu K, Zhang L, Li Y, Li Q, Yang Z, Shen T, Duan L, Xiong W, Wang W. Synergistic inhibition of colon carcinoma cell growth by Hedgehog-Gli1 inhibitor arsenic trioxide and phosphoinositide 3-kinase inhibitor LY294002. *Onco Targets Ther*. 2015 Apr 17;8:877-83. doi: 10.2147/OTT.S71034. eCollection 2015.
 - Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E et al: The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery* 2012, 2(5):401-404.
 - Chatel G, Ganef C, Boussif N, et al. Hedgehog signaling pathway is inactive in

- colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer*. 2007;121(12):2622–2627.
- Chowdhury S, Pradhan RN, Sarkar RR. Structural and logical analysis of a comprehensive hedgehog signaling pathway to identify alternative drug targets for glioma, colon and pancreatic cancer. *PLoS One*. 2013;8(7):e69132.
 - Chung JH, Bunz F. A loss-of-function mutation in PTCH1 suggests a role for autocrine hedgehog signaling in colorectal tumorigenesis. *Oncotarget*. 2013 Dec;4(12):2208-11.
 - Chung JH, Larsen AR, Chen E, Bunz F. A PTCH1 homolog transcriptionally activated by p53 suppresses Hedgehog signaling. *J Biol Chem*. 2014;289(47):33020–33031.
 - Ciucci A, De Stefano I, Vellone VG, et al. Expression of the glioma-associated oncogene homolog 1 (gli1) in advanced serous ovarian cancer is associated with unfavorable overall survival. *PLoS One*. 2013;8(3):e60145.
 - Cochrane CR, Szczepny A, Watkins DN, Cain JE. Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*. 2015 Aug 11;7(3):1554-85. doi: 10.3390/cancers7030851. Review.
 - Davidovich C, Zheng L, Goodrich KJ, Cech TR. Promiscuous RNA binding by Polycomb repressive complex 2. *Nat Struct Mol Biol* 2013;20:1250-1257.
 - Ding YL, Wang QS, Zhao WM, Xiang L. Expression of smoothed protein in colon cancer and its prognostic value for postoperative liver metastasis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13:4001-5.
 - Ding YL, Zhou Y, Xiang L, Ji ZP, Luo ZH. Expression of glioma-associated oncogene homolog 1 is associated with invasion and postoperative liver

- metastasis in colon cancer. *Int J Med Sci* 2012; 9:334-8.
- Dou J, Ni Y, He X, Wu D, Li M, Wu S, Zhang R, Guo M, Zhao F. Decreasing lncRNA HOTAIR expression inhibits human colorectal cancer stem cells. *Am J Transl Res*. 2016 Jan 15;8(1):98-108. eCollection 2016.
 - Douard R, Moutereau S, Pernet P, Chimingqi M, Allory Y, Manivet P, Conti M, Vaubourdolle M, Cugnenc PH, Loric S. Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer. *Surgery*. 2006 May;139(5):665-70.
 - Du Z, Fei T, Verhaak RG, Su Z, Zhang Y, Brown M, et al. Integrative genomic analyses reveal clinically relevant long noncoding RNAs in human cancer. *Nat Struct Mol Biol* 2013;20:908-913.
 - Du Z, Zhou F, Jia Z, Zheng B, Han S, Cheng J, Zhu G, Huang P. The hedgehog/Gli-1 signaling pathways is involved in the inhibitory effect of resveratrol on human colorectal cancer HCT116 cells. *Iran J Basic Med Sci*. 2016 Nov;19(11):1171-1176.
 - Eades G, Zhang YS, Li QL, Xia JX, Yao Y, Zhou Q. Long non-coding RNAs in stem cells and cancer. *World J Clin Oncol* 2014;5:134-141.
 - Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessell TM: Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 1996, 87(4):661-673.
 - Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F.: GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [online]. International Agency for Research on Cancer, Lyon (France) 2013. Available

from WWW: <http://globocan.iarc.fr>.

- Flynn RA, Chang HY. Long noncoding RNAs in cell-fate programming and reprogramming. *Cell stem cell* 2014;14:752-761.
- Fu X, Deng H, Zhao L, Li J, Zhou Y, Zhang Y. Distinct expression patterns of hedgehog ligands between cultured and primary colorectal cancers are associated with aberrant methylation of their promoters. *Mol Cell Biochem.* 2010 Apr;337(1-2):185-92. doi: 10.1007/s11010-009-0298-8. Epub 2009 Oct 24.
- Fu X, Shi L, Zhang W, et al. Expression of Indian hedgehog is negatively correlated with APC gene mutation in colorectal tumors. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7: 2150-5.
- Fu X, Yang X, Li J, Tian X, Cai J, Zhang Y. Opposite expression patterns of Sonic hedgehog and Indian hedgehog are associated with aberrant methylation status of their promoters in colorectal cancers. *Pathology* 2010; 42:553-9.
- Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E et al: Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling* 2013, 6(269):p11.
- Guleng B, Tateishi K, Ohta M, et al. Smoothed gene mutations found in digestive cancer have no aberrant Hedgehog signaling activity. *J Gastroenterol.* 2006;41(12):1238–1239.
- Gulino A, Ferretti E, De Smaele E. Hedgehog signalling in colon cancer and stem cells. *EMBO Mol Med.* 2009 Sep;1(6-7):300-2. doi: 10.1002/emmm.200900042.
- Hajjari M, Behmanesh M, Sadeghizadeh M, Zeinoddini M. Up-regulation of

- HOTAIR long non-coding RNA in human gastric adenocarcinoma tissues. *Med Oncol.* 2013;30(3):670. doi: 10.1007/s12032-013-0670-0. Epub 2013 Jul 26.
- Hajjari M, Salavaty A. HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. *Cancer Biol Med.* 2015 Mar;12(1):1-9. doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0006.
 - Haveri H, Westerholm-Ormio M, Lindfors K, et al. Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in normal and neoplastic human gastrointestinal mucosa. *BMC Gastroenterol.* 2008;8:9.
 - Hong KD, Lee Y, Kim BH, Lee SI, Moon HY. Expression of GLI1 correlates with expression of lymphangiogenesis proteins, vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3, in colorectal cancer. *Am Surg.* 2013 Feb;79(2):198-204.
 - Hu X, Lai D, Chen W, Zi S, Li J, Du P, Wang Z, Huang S, Long C. Differential expression profiles of the Hedgehog signaling pathway between microsatellite-stable and microsatellite-unstable colorectal cancers. *Mol Med Rep.* 2011 Sep-Oct;4(5):873-7. doi: 10.3892/mmr.2011.529. Epub 2011 Jul 1.
 - Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 2001;15(23):3059–3087.
 - Iwasaki H, Nakano K, Shinkai K, Kunisawa Y, Hirahashi M, Oda Y, Onishi H, Katano M. Hedgehog Gli3 activator signal augments tumorigenicity of colorectal cancer via upregulation of adherence-related genes. *Cancer Sci.* 2013 Mar;104(3):328-36. doi: 10.1111/cas.12073. Epub 2013 Jan 10.
 - Kang HN, Oh SC, Kim JS, Yoo YA. Abrogation of Gli3 expression suppresses

- the growth of colon cancer cells via activation of p53. *Exp Cell Res.* 2012 Mar 10;318(5):539-49. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.12.010. Epub 2011 Dec 27.
- Katoh Y, Katoh M. Comparative genomics on Sonic hedgehog orthologs. *Oncol Rep.* 2005;14(4):1087–1090. [PubMed]
 - Katoh Y, Katoh M. WNT antagonist, SFRP1, is Hedgehog signaling target. *Int J Mol Med.* 2006;17(1):171–175.
 - Kolterud A, Grosse AS, Zacharias WJ, et al. Paracrine Hedgehog signaling in stomach and intestine: new roles for hedgehog in gastrointestinal patterning. *Gastroenterology* 2009; 137:618-28.
 - Konstantinou D, Bertaux-Skeirik N, Zavros Y. Hedgehog signaling in the stomach. *Curr Opin Pharmacol.* 2016;31:76–82.
 - Kosinski C, Stange DE, Xu C, et al. Indian hedgehog regulates intestinal stem cell fate through epithelial-mesenchymal interactions during development. *Gastroenterology* 2010; 139:893-903.
 - Lee, T.Y., et al., Increased chemoresistance via snail-raf kinase inhibitor protein signaling in colorectal cancer in response to a nicotine derivative. *Oncotarget*, 2016.
 - Lees CW, Satsangi J. Hedgehog, Paneth cells, and colon cancer: a cautionary note for the use of systemic agonists/antagonists. *Gastroenterology.* 2006;131(5):1657–1658.
 - Li H, Ma SQ, Huang J, Chen XP, Zhou HH. Roles of long noncoding RNAs in colorectal cancer metastasis. *Oncotarget.* 2017 Jun 13;8(24):39859-39876. doi: 10.18632/oncotarget.16339. Review.

- Li P, Zhang X, Wang L, Du L, Yang Y, Liu T, Li C, Wang C. lncRNA HOTAIR Contributes to 5FU Resistance through Suppressing miR-218 and Activating NF- κ B/TS Signaling in Colorectal Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017 Sep 15;8:356-369. doi: 10.1016/j.omtn.2017.07.007. Epub 2017 Jul 8.
- Li T, Liao X, Lochhead P, Morikawa T, Yamauchi M, Nishihara R, Inamura K, Kim SA, Mima K, Sukawa Y, Kuchiba A, Imamura Y, Baba Y, Shima K, Meyerhardt JA, Chan AT, Fuchs CS, Ogino S, Qian ZR. SMO expression in colorectal cancer: associations with clinical, pathological, and molecular features. *Ann Surg Oncol*. 2014 Dec;21(13):4164-73. Doi: 10.1245/s10434-014-3888-y. Epub 2014 Jul 15.
- Lin J, Chen Y, Cai Q, et al. *Scutellaria barbata* D Don inhibits colorectal cancer growth via suppression of multiple signaling pathways. *Integr Cancer Ther*. 2014;13(3):240–248. [PubMed]
- Liu Y, DU F, Zhao Q, Jin J, Ma X, Li H. Acquisition of 5-fluorouracil resistance induces epithelial-mesenchymal transitions through the Hedgehog signaling pathway in HCT-8 colon cancer cells. *Oncol Lett*. 2015 Jun;9(6):2675-2679. Epub 2015 Apr 23.
- Loree JM, Kopetz S. Recent developments in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2017 Aug;9(8):551-564. doi: 10.1177/1758834017714997. Epub 2017 Jun 29.
- Luo ZF, Zhao D, Li XQ, Cui YX, Ma N, Lu CX, Liu MY, Zhou Y. Clinical significance of HOTAIR expression in colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2016 Jun 14;22(22):5254-9. doi: 10.3748/wjg.v22.i22.5254.

- Madison BB, Braunstein K, Kuizon E, Portman K, Qiao XT, Gumucio DL. Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development* 2005; 132:279-89.
- Marley AR, Nan H2. Epidemiology of colorectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2016 Sep 30;7(3):105-114. eCollection 2016.
- Martens-Uzunova ES, Böttcher R, Croce CM, Jenster G, Visakorpi T, Calin GA. Long noncoding RNA in prostate, bladder, and kidney cancer. *Eur Urol* 2014;65:1140-1151.
- Mazumdar T, DeVecchio J, Agyeman A, Shi T, Houghton JA. Blocking Hedgehog survival signaling at the level of the GLI genes induces DNA damage and extensive cell death in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 2011 Sep 1;71(17):5904-14. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4173. Epub 2011 Jul 11.
- Mazumdar T, DeVecchio J, Agyeman A, Shi T, Houghton JA. The GLI genes as the molecular switch in disrupting Hedgehog signaling in colon cancer. *Oncotarget.* 2011;2(8):638–645.
- Mazumdar T, DeVecchio J, Shi T, Jones J, Agyeman A, Houghton JA. Hedgehog signaling drives cellular survival in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 2011 Feb 1;71(3):1092-102. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2315. Epub 2010 Dec 6.
- Mehlen P, Tauszig-Delamasure S. Dependence receptors and colorectal cancer. *Gut.* 2014;63(11):1821–1829.
- Mercer TR, Mattick JS. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nat Struct Mol Biol* 2013;20:300-307.

- Monzo M, Moreno I, Artells R, Ibeas R, Navarro A, Moreno J, Hernandez R, Granell M, Pie J. Sonic hedgehog mRNA expression by real-time quantitative PCR in normal and tumor tissues from colorectal cancer patients. *Cancer Lett.* 2006 Feb 20;233(1):117-23.
- Morimoto T, Mitomi H, Saito T, et al. Distinct profile of HIF1alpha, PTCH, EphB2, or DNA repair protein expression and BRAF mutation in colorectal serrated adenoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; 29:1192-9.
- Obuch JC1, Ahnen DJ2. Colorectal Cancer: Genetics is Changing Everything. *Gastroenterol Clin North Am.* 2016 Sep;45(3):459-76. doi: 10.1016/j.gtc.2016.04.005.
- Oniscu A, James RM, Morris RG, Bader S, Malcomson RD, Harrison DJ. Expression of Sonic hedgehog pathway genes is altered in colonic neoplasia. *J Pathol* 2004; 203:909-17.
- Pan T, Xu J, Zhu Y. Self-renewal molecular mechanisms of colorectal cancer stem cells. *Int J Mol Med.* 2017 Jan;39(1):9-20. doi: 10.3892/ijmm.2016.2815. Epub 2016 Nov 30.
- Papadopoulos V, Tsapakidis K, Riobo Del Galdo NA, et al. The prognostic significance of the Hedgehog signaling pathway in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2016;15(2):116–127.
- Parfitt JR, Driman DK. Survivin and hedgehog protein expression in serrated colorectal polyps: an immunohistochemical study. *Hum Pathol.* 2007;38(5):710–717. [PubMed]
- Qiu MT, Hu JW, Yin R, Xu L. Long noncoding RNA: an emerging paradigm of

- cancer research. *Tumour Biol* 2013;34:613-620.
- Qualtrough D, Buda A, Gaffield W, Williams AC, Paraskeva C. Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment. *Int J Cancer*. 2004 Jul 20;110(6):831-7.
 - Qualtrough D, Rees P, Speight B, Williams AC, Paraskeva C. The Hedgehog Inhibitor Cyclopamine Reduces β -Catenin-Tcf Transcriptional Activity, Induces E-Cadherin Expression, and Reduces Invasion in Colorectal Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2015 Sep 17;7(3):1885-99. doi: 10.3390/cancers7030867.
 - Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* 2000; 127:2763-72.
 - Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445 (7123):111-115.
 - Rinn JL, Kertesz M, Wang JK. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 2007;129:1257-9.
 - Ruiz i Altaba A. Hedgehog signaling and the Gli code in stem cells, cancer, and metastases. *Sci Signal*. 2011 Nov 22;4(200):pt9. doi: 10.1126/scisignal.2002540.
 - Seow HF, Yip WK, Fife T. Advances in targeted and immunobased therapies for colorectal cancer in the genomic era. *Onco Targets Ther*. 2016;9:1899–1920.
 - Shi T, Mazumdar T, Devecchio J, Duan ZH, Agyeman A, Aziz M, Houghton JA. cDNA microarray gene expression profiling of hedgehog signaling pathway

- inhibition in human colon cancer cells. *PLoS One*. 2010 Oct 1;5(10). pii: e13054. doi: 10.1371/journal.pone.0013054.
- Sipos F, Galamb O. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World J Gastroenterol*. 2012 Feb 21;18(7):601-8. doi: 10.3748/wjg.v18.i7.601. Review.
 - Song J, Zhang J, Wang J, Wang J, Guo X, Dong W. β 1 integrin mediates colorectal cancer cell proliferation and migration through regulation of the Hedgehog pathway. *Tumour Biol*. 2015 Mar;36(3):2013-21. Doi: 10.1007/s13277-014-2808-x. Epub 2014 Nov 12.
 - Stefanius K, Kantola T, Tuomisto A, et al. Downregulation of the hedgehog receptor PTCH1 in colorectal serrated adenocarcinomas is not caused by PTCH1 mutations. *Virchows Arch* 2011; 458:213-9.
 - Strippoli R, Loureiro J, Moreno V, Benedicto I, Perez Lozano ML, Barreiro O, Pellinen T, Minguet S, Foronda M, Osteso MT et al: Caveolin-1 deficiency induces a MEK-ERK1/2-Snail-1-dependent epithelial-mesenchymal transition and fibrosis during peritoneal dialysis. *EMBO Mol Med* 2015, 7(1):102-123.
 - Szkandera J, Pichler M, Absenger G, Stotz M, Weissmueller M, Samonigg H, Asslaber M, Lax S, Leitner G, Winder T, Renner W, Gerger A. A functional germline variant in *GLI1* implicates hedgehog signaling in clinical outcome of stage II and III colon carcinoma patients. *Clin Cancer Res*. 2014 Mar 15;20(6):1687-97. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1517. Epub 2014 Jan 27.
 - Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*. 2001;411(6835):349–354.

- Taniguchi H, Yamamoto H, Akutsu N, et al. Transcriptional silencing of hedgehog-interacting protein by CpG hypermethylation and chromatic structure in human gastrointestinal cancer. *J Pathol.* 2007;213(2):131–139.
- van den Brink GR, Bleuming SA, Hardwick JC, et al. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat Genet.* 2004;36(3):277–282.
- van den Brink GR, Hardwick JC, Nielsen C, et al. Sonic hedgehog expression correlates with fundic gland differentiation in the adult gastrointestinal tract. *Gut* 2002; 51:628-33.
- van den Brink GR, Hardwick JC, Tytgat GN, et al. Sonic hedgehog regulates gastric gland morphogenesis in man and mouse. *Gastroenterology* 2001; 121:317-28.
- van den Brink GR, Hardwick JC. Hedgehog Wnteraction in colorectal cancer. *Gut.* 2006;55(7):912–914.
- Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P, Ruiz i Altaba A. Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med.* 2009 Sep;1(6-7):338-51. doi: 10.1002/emmm.200900039.
- Varnat F, Siegl-Cachedenier I, Malerba M, Gervaz P, Ruiz i Altaba A. Loss of WNT-TCF addiction and enhancement of HH-GLI1 signalling define the metastatic transition of human colon carcinomas. *EMBO Mol Med.* 2010 Nov;2(11):440-57. doi: 10.1002/emmm.201000098.

- Varnat F, Zacchetti G, Ruiz i Altaba A. Hedgehog pathway activity is required for the lethality and intestinal phenotypes of mice with hyperactive Wnt signaling. *Mech Dev* 2010; 127:73-81.
- Walsh AL, Tuzova AV, Bolton EM, Lynch TH, Perry AS. Long noncoding RNAs and prostate carcinogenesis: the missing ‘linc’? *Trends in molecular medicine* 2014;20:428-436.
- Wang BB. Clinical significance of stem cell marker CD133 expression in colorectal cancer. *Histol Histopathol* 2016 Mar;31(3):299-306.
- Wang D, Hu G, Du Y, Zhang C, Lu Q, Lv N, Luo S. Aberrant activation of hedgehog signaling promotes cell proliferation via the transcriptional activation of forkhead Box M1 in colorectal cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017 Feb 2;36(1):23. doi: 10.1186/s13046-017-0491-7.
- Wang H, Ke F, Zheng J. Hedgehog-glioma-associated oncogene homolog-1 signaling in colon cancer cells and its role in the celecoxib-mediated anti-cancer effect. *Oncol Lett.* 2014;8(5):2203–2208.
- Wang H, Li YY, Wu YY, Nie YQ. Expression and clinical significance of hedgehog signaling pathway related components in colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(5):2319-24.
- Wang R, Wei J, Zhang S, Wu X, Guo J, Liu M, Du K, Xu J, Peng L, Lv Z, You W, Xiong Y, Fu Z. Peroxiredoxin 2 is essential for maintaining cancer stem cell-like phenotype through activation of Hedgehog signaling pathway in colon cancer. *Oncotarget.* 2016 Dec 27;7(52):86816-86828. doi: 10.18632/oncotarget.13559.

- Wang TP, Hsu SH, Feng HC, Huang RF. Folate deprivation enhances invasiveness of human colon cancer cells mediated by activation of sonic hedgehog signaling through promoter hypomethylation and cross action with transcription nuclear factor-kappa B pathway. *Carcinogenesis*. 2012 Jun;33(6):1158-68. doi: 10.1093/carcin/bgs138. Epub 2012 Mar 29.
- Wang ZC, Gao J, Zi SM, Yang M, Du P, Cui L. Aberrant expression of sonic hedgehog pathway in colon cancer and melanosis coli. *J Dig Dis*. 2013 Aug;14(8):417-24. doi: 10.1111/1751-2980.12060.
- Watt FM. Unexpected Hedgehog-Wnt interactions in epithelial differentiation. *Trends Mol Med*. 2004;10(12):577–580.
- Wei L, Lin J, Xu W, Cai Q, Shen A, Hong Z, Peng J. *Scutellaria barbata* D. Don inhibits tumor angiogenesis via suppression of Hedgehog pathway in a mouse model of colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(8):9419-30. doi: 10.3390/ijms13089419. Epub 2012 Jul 25.
- Wong H, Alicke B, West KA, Pacheco P, La H, Januario T, Yauch RL, de Sauvage FJ, Gould SE. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of vismodegib in preclinical models of mutational and ligand-dependent Hedgehog pathway activation. *Clin Cancer Res*. 2011 Jul 15;17(14):4682-92. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0975. Epub 2011 May 24.
- Wu C, Zhu X, Liu W, Ruan T, Tao K. Hedgehog signaling pathway in colorectal cancer: function, mechanism, and therapy. *Onco Targets Ther*. 2017 Jun 30;10:3249-3259. doi: 10.2147/OTT.S139639. eCollection 2017. Review.
- Wu JY, Xu XF, Xu L, Niu PQ, Wang F, Hu GY, Wang XP, Guo CY.

- Cyclopamine blocked the growth of colorectal cancer SW116 cells by modulating some target genes of Gli1 in vitro. *Hepatogastroenterology*. 2011 Sep-Oct;58(110-111):1511-8. doi:
- Xu M, Li X, Liu T, Leng A, Zhang G. Prognostic value of hedgehog signaling pathway in patients with colon cancer. *Med Oncol*. 2012 Jun;29(2):1010-6. doi: 10.1007/s12032-011-9899-7. Epub 2011 Mar 19.
 - Yang XD, Xu HT, Xu XH, Ru G, Liu W, Zhu JJ, Wu YY, Zhao K, Wu Y, Xing CG, Zhang SY, Cao JP, Li M. Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR inhibits proliferation and invasiveness and improves radiosensitivity in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2016 Jan;35(1):479-87. doi: 10.3892/or.2015.4397. Epub 2015 Nov 4.
 - Yoshikawa K, Shimada M, Miyamoto H, Higashijima J, Miyatani T, Nishioka M, Kurita N, Iwata T, Uehara H. Sonic hedgehog relates to colorectal carcinogenesis. *J Gastroenterol*. 2009;44(11):1113-7. doi: 10.1007/s00535-009-0110-2. Epub 2009 Aug 7.
 - Yoshimoto AN, Bernardazzi C, Carneiro AJ, Elia CC, Martinusso CA, Ventura GM, Castelo-Branco MT, de Souza HS. Hedgehog pathway signaling regulates human colon carcinoma HT-29 epithelial cell line apoptosis and cytokine secretion. *PLoS One*. 2012;7(9):e45332. doi: 10.1371/journal.pone.0045332. Epub 2012 Sep 19.
 - You S, Zhou J, Chen S, Zhou P, Lv J, Han X, Sun Y. PTCH1, a receptor of Hedgehog signaling pathway, is correlated with metastatic potential of colorectal cancer. *Ups J Med Sci*. 2010 Aug;115(3):169-75. doi:

10.3109/03009731003668316.

- Zhang L, Song R, Gu D, Zhang X, Yu B, Liu B, Xie J. The role of GLI1 for 5-Fu resistance in colorectal cancer. *Cell Biosci.* 2017 Apr 13;7:17. doi: 10.1186/s13578-017-0145-7. eCollection 2017.
- Zhi X, Tao J, Zhang L, Tao R, Ma L, Qin J. Silencing speckle-type POZ protein by promoter hypermethylation decreases cell apoptosis through upregulating Hedgehog signaling pathway in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2016 Dec 29;7(12):e2569. doi: 10.1038/cddis.2016.435.