

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Oncologia e Patologia Sperimentale: progetto N.1 “Oncologia”

Ciclo XXI

Settore Scientifico Disciplinare MIUR: BIO/11 Biologia Molecolare

**CARATTERIZZAZIONE DI LINEE CELLULARI DA
PAZIENTI CON SARCOMI DELLE PARTI MOLLI**

Presentata da: **Dott.ssa Antonella Chiechi**

Coordinatore Dottorato:

Chiar.mo Prof. Sandro Grilli

Relatore:

Chiar.mo Prof. Mario Mercuri

Esame finale anno 2008

INDICE

1 - Introduzione	1
1.1 - I sarcomi delle parti molli	1
1.2 - La progressione metastatica	10
1.3 - La progressione extracellulare	18
1.4 - SDP35 e XTP1	28
1.5 - Apoptosi	35
1.6 - Adesione cellulare ed apoptosi: il meccanismo di anoikis	40
2 - Scopo della tesi	50
3 - Materiali e metodi	52
3.1 - Linee cellulari	52
3.2 - Casistica tessuti	53
3.3 - MTT test	56
3.4 - Saggio di adesione cellulare	57
3.5 - Saggio di invasività cellulare	57
3.6 - Estrazione di RNA	58
3.7 - Retrotrascrizione	58
3.8 - Real Time PCR	59
3.9 - Saggio citofluorimetrico dell'Annexina V-FITC e Propidio Ioduro	60
3.10 - Immunocitochimica	60
3.11 - Immunoistochimica	61
3.12 - Microscopia elettronica a trasmissione	62
3.13 - Microscopia elettronica a scansione	62
3.14 - Immunofluorescenza	63
3.15 - Estrazione proteica	63
3.16 - Western Blot	64
3.17 - Elettroforesi bidimensionale	65
3.18 - Analisi statistica	66

1 - INTRODUZIONE

1.1 – I sarcomi delle parti molli

I sarcomi delle parti molli sono un gruppo eterogeneo di tumori rari che insorgono in modo predominante nei tessuti originanti dal mesoderma embrionale. Il termine “parti molli” si riferisce ai tessuti muscolari, adiposi, fibrosi, ai vasi sanguigni e a tutti gli altri tessuti di supporto nel corpo umano.

I sarcomi delle parti molli si presentano più frequentemente come una massa asintomatica in una estremità del corpo, tuttavia possono localizzarsi ovunque, ed in particolare nel tronco, nel retroperitoneo oppure nella testa e nel collo. Questi tumori rappresentano una frazione inferiore all'1% di tutti i tumori negli adulti e il 7-10% dei tumori nei bambini.

Attualmente, sono stati identificati più di 100 tipi istologici di sarcomi dei tessuti molli; i più comuni sono: istiocitoma fibroso maligno (35%), leiomiomasarcoma (10%), liposarcoma (25%) e sarcoma sinoviale (10%). Il tipo più comune nell'infanzia tuttavia è il rabdomiosarcoma.

In generale i sarcomi delle parti molli non sembrano originare da trasformazione maligna o dedifferenziazione di tumori benigni degli stessi tessuti; inoltre, in contrasto con l'ampia varietà di tipi istologici, i sarcomi dei tessuti molli presentano molte caratteristiche cliniche e patologiche in comune. Ad esempio, il comportamento clinico di molti di questi tumori è simile e, come definito dal sistema di stadiazione, è determinato dalla localizzazione anatomica (profondità), dal grado istologico e dall'estensione del tumore. Il pattern dominante di metastasi è ematico. La metastasi linfonodale è in genere rara, con l'eccezione di alcuni tipi istologici.

I sarcomi dei tessuti molli sono tumori le cui eziopatogenesi e diagnosi sono estremamente complesse; molti di essi sono differenziabili l'uno dall'altro soltanto mediante caratteristiche istologiche, immunoistochimiche e ultrastrutturali. Essi presentano inoltre difficoltà di carattere diagnostico in quanto lesioni benigne con alta cellularità e indice mitotico elevato vengono spesso confuse con lesioni maligne; al contempo, lesioni maligne con leggera anaplasia possono essere considerate erroneamente benigne. Il 15-20% di questi tumori è così poco differenziato da rendere estremamente difficoltosa una qualsiasi classificazione. [1, 2]

La mortalità associata ai sarcomi delle parti molli è circa del 50%; questo si può spiegare in parte con la particolare propensione di tali tumori a sviluppare metastasi. Fino ad oggi sono stati identificati pochi determinanti affidabili dell'outcome clinico di questi tumori. E' quindi evidente la necessità di trovare dei marcatori molecolari che possano avere sia valore diagnostico che prognostico; queste molecole dovrebbero essere in grado di facilitare la diagnosi differenziale dei vari sarcomi e di predire con un certo grado di sicurezza il loro comportamento clinico ed in particolare la propensione dei tumori primari a sviluppare metastasi. Questi marcatori molecolari sarebbero di grande utilità clinica in quanto, permettendo di identificare i pazienti a maggiore rischio di malattia metastatica, aiuterebbero a selezionare strategie terapeutiche mirate. [3]

1.1.1 - Leiomiosarcoma

Il leiomiosarcoma (LMS) è un tumore maligno costituito da cellule fusate ("spindle cells") originanti dal muscolo liscio. Sono noti pochi fattori eziologici o di predisposizione per questo tumore. In generale, i leiomiosarcomi sono più comuni nella donna che nell'uomo.

Anche se tutti i leiomiosarcomi dei tessuti molli sono istologicamente simili, è utile suddividerli in tre gruppi con differenti caratteristiche biologiche e cliniche in base alla localizzazione corporea, la quale ha la priorità rispetto alle caratteristiche istologiche nel determinare la prognosi. [Figg. 1, 2]

Si distinguono quindi tre tipologie principali di leiomiosarcomi:

- Leiomiosarcomi del tessuto cutaneo e sottocutaneo;
- Leiomiosarcomi di origine vascolare;
- Leiomiosarcomi dell'area intraaddominale e del retroperitoneo.

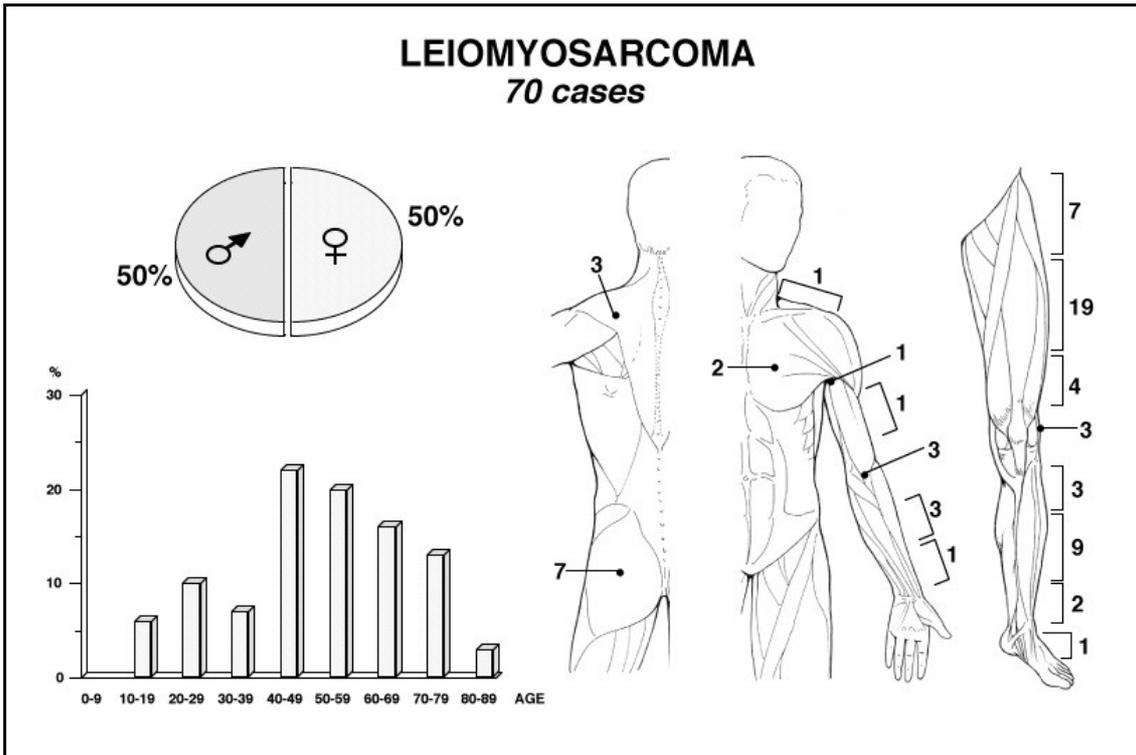


Figura 1
Casistica degli Istituti Ortopedici Rizzoli di Leiomyosarcoma delle parti molli aggiornata all'anno 1995. I casi sono classificati in base ad età, sesso e sede del tumore.

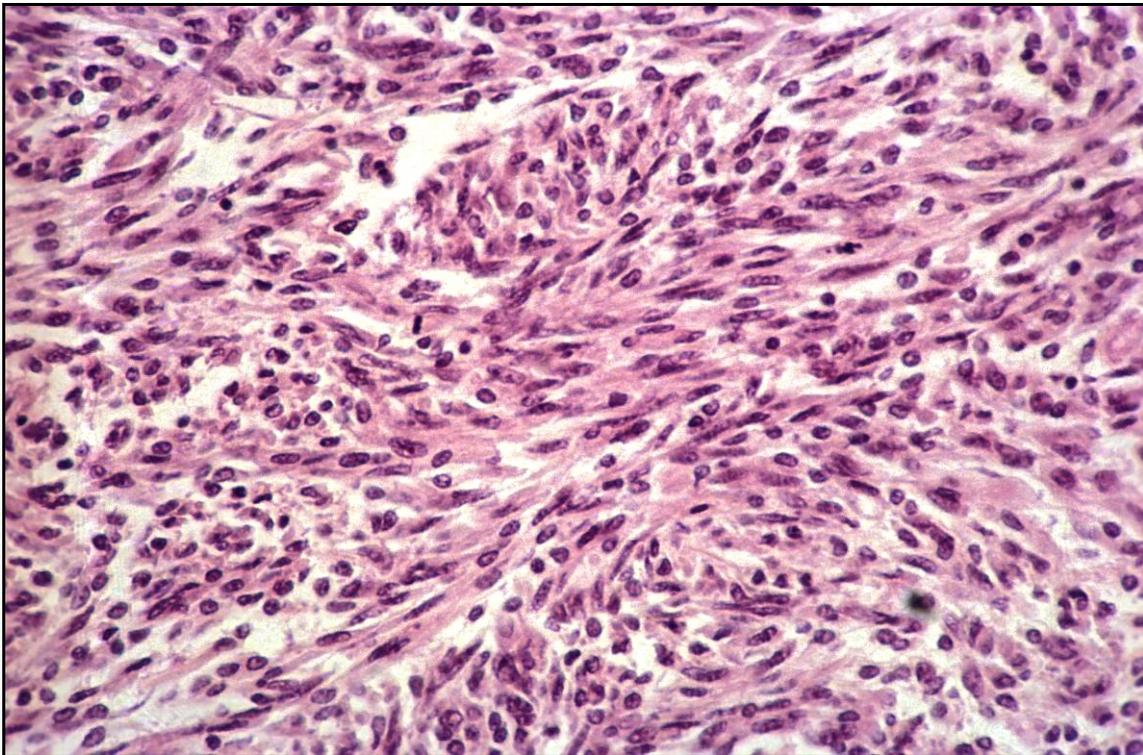


Figura 2
Leiomyosarcoma. Sono evidenti cellule fusate con nucleo allungato e abbondante citoplasma. (Ematossilina/Eosina, 10x)

1.1.1.1 - Leiomioidarcomi del tessuto cutaneo e sottocutaneo

I leiomioidarcomi di origine cutanea e sottocutanea originano per la maggior parte dalle cellule del muscolo liscio erettore dei peli. Essi rappresentano il 2-3% dei sarcomi superficiali. Non presentano predilezione per un particolare sesso. L'insorgenza è più frequente dai 50 ai 70 anni, anche se possono occorrere a qualsiasi età. Si localizzano negli arti ed in particolare in corrispondenza delle aree pilifere; sono generalmente di piccole dimensioni (inferiori ai 2cm), anche se i tumori sottocutanei crescono a velocità maggiore e possono raggiungere dimensioni maggiori. I sintomi sono dolore e modificazioni dell'epidermide.

Questi leiomioidarcomi si presentano con un aspetto fascicolato di colore biancastro-grigio o rosa; i tumori originanti nel derma appaiono spesso mal definiti a causa dell'intricato intreccio tra fascicoli tumorali, collagene circostante e muscolo erettore del pelo. I tumori sottocutanei al contrario tendono a comprimere il tessuto circostante generando una pseudocapsula.

Il quadro istologico tipico dei leiomioidarcomi è dominato dalla proliferazione di "spindle cells", caratterizzate da un nucleo allungato con abbondante citoplasma, e dalla positività per actina e mioglobina. Il nucleo è solitamente centrale, con contorni smussati oppure con una caratteristica forma a sigaro. In alcune cellule si possono notare vacuoli perinucleari. Nei tumori più indifferenziati il nucleo è più grande, ipercromatico e spesso perde la sua posizione centrale. Sono comuni cellule giganti multinucleate. L'apparenza del citoplasma varia a seconda del grado di differenziazione: le cellule meglio differenziate hanno numerose miofibrille ben orientate, identificabili con la colorazione tricromica di Masson come linee longitudinali alla cellula, di colore rosso e parallele tra loro; nelle cellule meno differenziate le striature longitudinali sono meno numerose e con un orientamento meno rigoroso. Nel citoplasma è presente glicogeno.

Per quanto riguarda le caratteristiche ultrastrutturali, i leiomioidarcomi differenziati hanno nuclei con incavi profondi, e sottili miofilamenti numerosi e ben orientati. Si identificano cospicue vescicole pinocitiche e connessioni intercellulari; la lamina basale investe l'intera membrana cellulare. La presenza di queste caratteristiche è diagnostica di cellule muscolari lisce. Tumori meno differenziati mostrano perdita di miofilamenti, e reticolo endoplasmico rugoso e ribosomi liberi assumono maggiore prominenza. La lamina basale inoltre può essere incompleta.

L'identificazione di antigeni muscolari mediante immunoistochimica, come ad esempio desmina, può aiutare nella diagnosi di leiomioidarcoma.

Nei leiomioidarcomi del tessuto cutaneo e sottocutaneo, in genere di piccole dimensioni, necrosi ed emorragie sono rare. Cellule giganti possono essere presenti, ma non sono mai numerose; le figure mitotiche sono frequenti, ma questi tumori sono moderatamente differenziati.

I leiomioidarcomi della cute e del sottocute hanno in genere una prognosi favorevole. Le metastasi sono infrequenti e correlano con la profondit  del tumore primario: i tumori superficiali metastatizzano raramente (10%) mentre i sottocutanei sviluppano metastasi in circa un terzo dei casi. Le recidive locali sono frequenti (50%).

Il trattamento di elezione   la resezione ampia della neoplasia. [2]

1.1.1.2 - Leiomioidarcomi di origine vascolare

I leiomioidarcomi possono originare anche dalle pareti dei vasi sanguigni, e specialmente nelle vene. I leiomioidarcomi di origine vascolare sono tuttavia rari; l'et  media di insorgenza   50 anni. Nel caso della vena cava inferiore si ha predilezione per il sesso femminile, per gli altri casi non c'  preferenza per un particolare sesso.

Tali tumori si localizzano preferenzialmente negli arti inferiori. I sintomi sono: dolore a causa della compressione che il tumore esercita sul nervo adiacente al vaso interessato, ed edema a causa della compressione della vena.

La diagnosi viene effettuata con esame radiologico, angiografia e magnetic resonance imaging (MRI).

I leiomioidarcomi vascolari si presentano solitamente come masse polipoidi o nodulari che si espandono sulla superficie del vaso sanguigno verso l'esterno o verso l'interno. Le caratteristiche istologiche sono simili a quelle descritte per i leiomioidarcomi del tessuto cutaneo e sottocutaneo. Emorragie e necrosi sono assenti. Le figure mitotiche sono evidenti ma non frequenti.

La morbilit  e la mortalit  associate a questo tipo di tumore sono primariamente diretta conseguenza della loro estensione sui vasi sanguigni e della conseguente compromissione della circolazione. La prognosi   spesso infausta, soprattutto nel caso in cui siano interessate vene importanti; circa la met  dei pazienti sviluppa metastasi.

La resezione   spesso impossibile nel caso vengano interessate grandi vene quali vena epatica e vena cava inferiore;   necessaria nel caso di piccole vene. [2]

1.1.1.3 - Leiomioidarcomi di origine retroperitoneale

I leiomioidarcomi di origine retroperitoneale sono pi  comuni nel sesso femminile, e la loro et  media di insorgenza   60 anni. Coinvolgono comunemente i reni, il pancreas, e le vertebre. I sintomi clinici sono la presenza di una massa situata nella zona addominale, dolore, perdita di peso, nausea e vomito. La diagnosi   effettuata con la stessa modalit  dei leiomioidarcomi di origine vascolari.

La massa tumorale è ampia (mediamente 16cm) e di colore bianco-grigiastro; spesso si tratta di masse carnose con foci di necrosi ed emorragia con frequente formazione di cisti. L'aspetto istologico è simile a quanto descritto per i leiomiomi di origine cutanea o sottocutanea.

Nel leiomioma caratteristiche tumorali quali dimensione, cellularità, atipia nucleare e presenza di necrosi correlano con la malignità; tuttavia il criterio d'elezione per determinare se uno di questi tumori sia benigno o maligno è l'attività mitotica, in quanto si è dimostrato essere un criterio più accurato e riproducibile degli altri. In particolare, è sufficiente la presenza di 5 mitosi per campo ad alto ingrandimento per considerare maligno un leiomioma retroperitoneale.

I leiomiomi di origine retroperitoneale sono un gruppo di tumori particolarmente aggressivi, e spesso così estesi che la resezione totale è impossibile. Conseguentemente possono causare morte non solo mediante metastasi a distanza ma anche per estensione locale. La sopravvivenza a cinque anni varia da 0% a 29%. Le possibilità di trattamento mediante escissione dipendono quindi dall'estensione del tumore. La recidiva locale è frequente. [2]

1.1.2 - Istiocitoma fibroso maligno

L'istiocitoma fibroso maligno (IFM) è il sarcoma delle parti molli più comune nella vita adulta tra i 50 e i 70 anni. L'istogenesi incerta e i numerosi sottotipi rendono l'IFM una entità alquanto controversa. Sono state postulate teorie secondo le quali l'origine cellulare del tumore sarebbe istiocitica oppure mesenchimale. In generale, l'IFM contiene cellule a differenziazione fibroblastica e istiocitaria in proporzioni variabili; ne sono stati descritti cinque sottotipi istologici, in particolare: (a) storiforme pleomorfo, il più comune; (b) mixoide; (c) a cellule giganti; (d) infiammatorio; (e) angiomatoide.

L'IFM colpisce preferenzialmente i maschi, con un rapporto maschio:femmina di circa 3:2. Il picco di incidenza cade tra la quinta e la sesta decade di vita, ma l'intervallo di età va dai 10 ai 90 anni. Il sottotipo angiomatoide è la variante più frequente nei pazienti sotto i 20 anni.

I sottotipi (a), (b) e (c) si localizzano principalmente nei muscoli scheletrici delle estremità, soprattutto nei soggetti magri. La variante (d) si localizza spesso nel retroperitoneo. Tutti i sottotipi hanno localizzazione profonda, eccetto per la variante angiomatoide che coinvolge il derma e la sottocute nelle estremità. [Fig. 3]

Tali varianti istologiche non sono da considerarsi tanto entità anatomo-cliniche distinte, quanto parte del range in cui l'IFM si può manifestare; hanno quindi valore diagnostico, ma costituiscono anche importanti fattori prognostici.

possono osservare anche cellule schiumose in quantità variabile ed infiltrazioni infiammatorie acute e/o croniche.

La variante (b) è caratterizzata da un'abbondante componente mixoide che costituisce più della metà dell'intera massa tumorale [Fig. 5]: aree di aspetto mixoide possono trovarsi a fianco di aree con caratteristiche storiformi pleomorfe. A volte le due strutture istologiche sono chiaramente separate, mentre altre volte sono irregolarmente mischiate tra loro. L'accumulo di mucopolisaccaridi intracellulari ed extracellulari può modificare ampiamente l'aspetto della neoplasia. Il pattern fascicolato o storiforme in questi casi diminuisce o scompare totalmente, i vasi diventano più visibili, e le cellule contengono vacuoli. Nelle aree mixoidi l'aspetto storiforme fascicolato non è più riconoscibile. I vasi possono rivelare un aspetto plessiforme; le cellule vacuolate possono ricordare i lipoblasti, ma in realtà contengono mucopolisaccaridi.

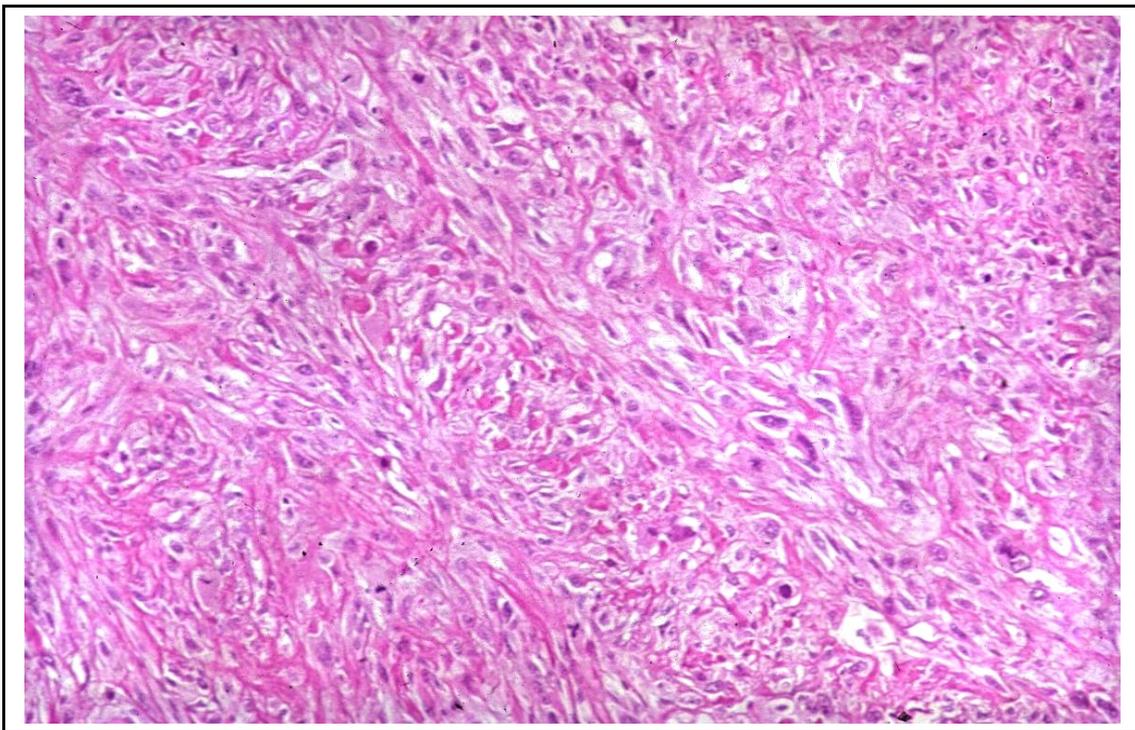


Figura 4
IFM, variante storiforme pleomorfa. Sono visibili le varie forme cellulari: fusate, ovoidali e giganti.
(Ematossilina/Eosina, 10x)

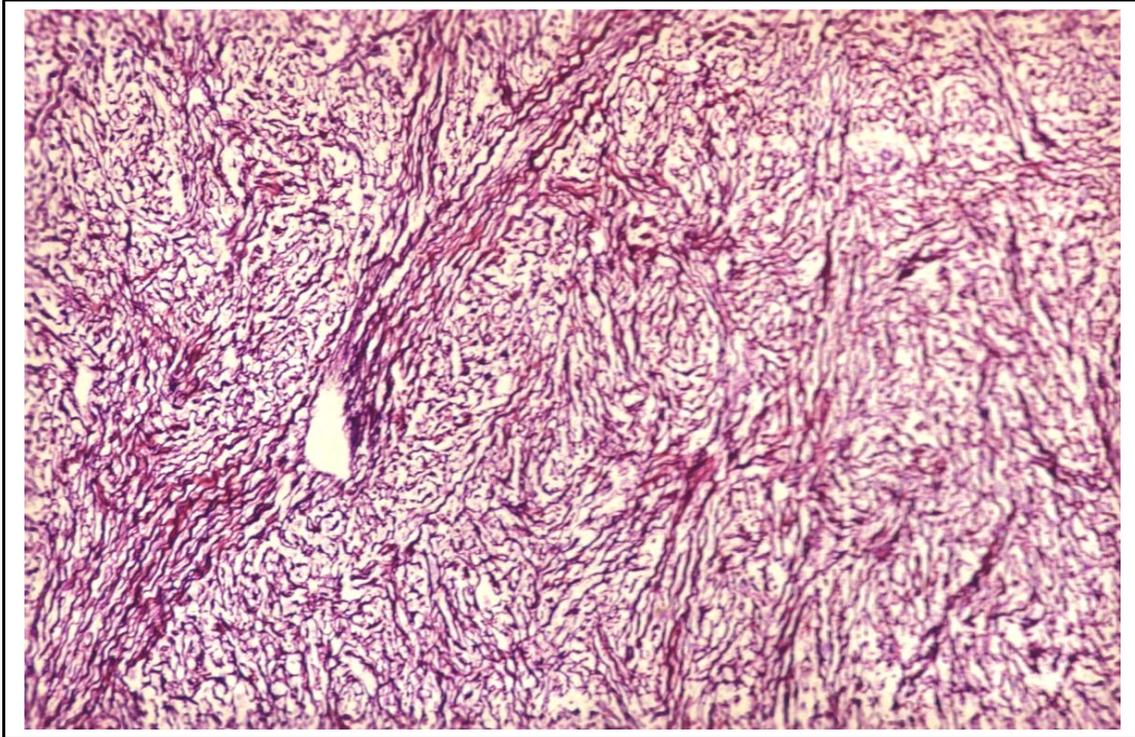


Figura 5
IFM, variante mixoide. Sono visibili aree di matrice mixoide a fianco di aree a maggiore cellularità.
(Ematossilina/Eosina, 10x)

La variante (c) è caratterizzata da una marcata componente a cellule giganti del tipo osteoclastico. Le cellule giganti sono multinucleate e presentano atipia nucleare. Le cellule proliferanti si aggregano a formare noduli multipli confluenti. L'aspetto infiammatorio è dominante ed è più evidente intorno alle numerose aree necrotiche. A volte alla periferia dei noduli neoplastici vi è metaplasia osteocondroide del tessuto connettivo.

Gli elementi cellulari del sottotipo (d) sono gli stessi di quelli della forma pleomorfa, ma in questo caso le componenti xantomatose e infiammatorie sono predominanti. Le cellule istiocitarie piene di lipidi (cellule xantomatose) mostrano vari gradi di pleomorfismo e di atipia e sono variamente inframmezzate da componenti infiammatorie non associate a necrosi, come linfociti, monociti e granulociti. La componente vascolare è abbondante.

Per quanto riguarda la variante (e) si possono definire tre caratteristiche predominanti: la presenza di aree solide costituite da cellule istiocitarie disposte a forma di cordoni o di alveoli; aree cistiche-emorragiche che assomigliano a cisti aneurismatiche dell'osso; infiltrazioni infiammatorie diffuse. La componente infiammatoria generalmente costituisce uno strato periferico alla neoplasia, mentre quella vascolare necrotica-emorragica sostituisce un' ampia parte del tumore ed è spesso localizzata centralmente. Le lacune vascolari non sono caratterizzate da una delimitazione endoteliale e le

cellule fondamentali sono gli istiociti mono e multinucleati. Generalmente c'è una pseudocapsula periferica. [2]

Il fattore prognostico di maggiore importanza è lo stadio clinico, definito dal grado istologico, dalle dimensioni del tumore e dalla presenza di metastasi a distanza. Fattori prognostici fondamentali sono anche il sottotipo istologico e il metodo di trattamento chirurgico. Infine si valutano la localizzazione anatomica e la profondità del tumore primario. [4]

Negli arti, le localizzazioni distali hanno prognosi migliori di quelle prossimali; la localizzazione retroperitoneale corrisponde a prognosi peggiore. Le metastasi sono localizzate al polmone (90%), alle ossa (8%) e al fegato (1%). I sottotipi (b) e (e) hanno la più bassa capacità di metastatizzazione (20%), mentre negli altri l'incidenza metastatica varia da 30% (d) al 50% (c).

Pazienti con un tumore a basso grado, a grado intermedio e ad alto grado hanno rispettivamente una sopravvivenza a 10 anni del 90%, 60% e del 20%.

La percentuale di sopravvivenza complessiva di pazienti IFM a 5 anni varia dal 36 al 58%. Tuttavia lo stesso valore per i pazienti con IFM localizzato al retroperitoneo è del 15-20%.

Data la particolare aggressività del tumore, il trattamento d'elezione è solitamente la resezione con margini ampi o anche radicali; esso è efficace nel controllare la neoplasia primaria, ma non è in grado di evitare le metastasi. La radioterapia è efficace nel 50% dei casi ed è usata per delimitare la massa tumorale e per ridurre la lesione in modo da facilitare l'operazione chirurgica. I pazienti trattati con chemioterapia adiuvante mostrano maggiore sopravvivenza. [2]

1.2 - La progressione metastatica

L'evento metastatico, ovvero la crescita progressiva di focolai tumorali secondari a distanza rispetto alla lesione primaria, è la causa più importante di morte correlata al cancro. La progressione metastatica consiste di una lunga serie di eventi sequenziali e intercorrelati. [Fig. 6] Ognuno di tali eventi può essere limitante, in quanto per una cellula l'incapacità di compiere uno o più di essi significa arrestare l'intero processo.

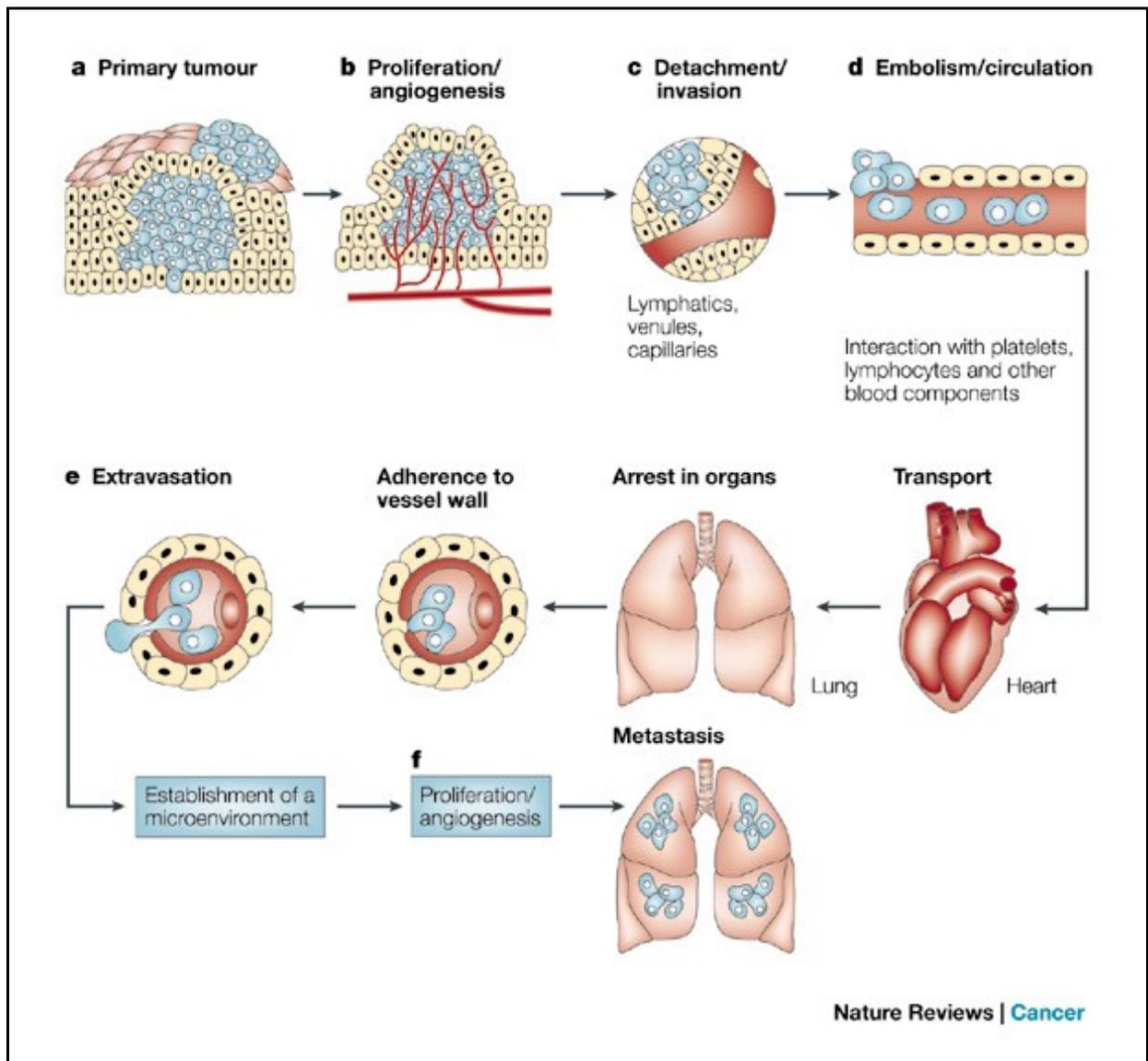


Figura 6
(tratta da Fidler IJ, *Nature Reviews Cancer* 2003, 3: 453–458)
Eventi principali coinvolti nella progressione metastatica.

Secondo il modello chiamato “seed and soil”, proposto nel 1889 da Paget, ma considerato ancora sostanzialmente valido, l’esito finale del processo di metastasi dipende sia dalle proprietà intrinseche delle cellule tumorali sia dal responso del tessuto bersaglio, tra i quali avviene un continuo dialogo a livello molecolare.

Il tumore in progressiva crescita necessita di quantità sempre maggiori di sostanze nutritive, inizialmente fornite solo per diffusione. Perché una massa tumorale superi i 2mm di diametro serve quindi la neoformazione di vasi (angiogenesi). La sintesi e la secrezione di fattori angiogenici stabilisce un network di capillari dal tessuto circostante. L’invasione dello stroma locale da parte di alcune delle cellule tumorali avviene mediante diversi meccanismi paralleli. Successivamente avviene il distacco e l’embolizzazione di singole cellule o aggregati e la loro entrata nella

circolazione sanguigna o linfatica. Molte cellule, però, vengono distrutte rapidamente. Dopo che le cellule tumorali sono sopravvissute al passaggio attraverso la circolazione, esse si arrestano nei letti capillari di organi distali aderendo all'endotelio del vaso o alla membrana basale subendoteliale, la quale a volte è esposta. Successivamente può avvenire l'extravasazione, probabilmente con meccanismi simili a quelli invasivi. Ogni focolaio metastatico è clonale, vale a dire che origina da una singola cellula tumorale. La proliferazione all'interno del parenchima dell'organo bersaglio completa il processo. Per proseguire la crescita, la metastasi deve sviluppare a sua volta una rete vascolare ed evadere i meccanismi di difesa dell'ospite. Solo le cellule tumorali in grado di completare tutti gli eventi descritti possono dare origine a metastasi. [5]

Il modello del "seed and soil", rivisto e corretto dalle scoperte più recenti, comprende altri due principi. Il primo è che i tumori primari sono altamente eterogenei: innanzi tutto sono costituiti sia da cellule tumorali sia da cellule dell'ospite, quali cellule epiteliali o endoteliali, fibroblasti e leucociti infiltranti. Inoltre le neoplasie sono biologicamente eterogenee, in quanto comprendono sottopopolazioni di cellule geneticamente e fenotipicamente diverse; molte di esse sono probabilmente in grado di completare solo alcuni dei processi coinvolti nella progressione metastatica. Il secondo principio è che le metastasi possono svilupparsi solo in specifici organi, in quanto il microambiente di diversi organi e tessuti (il "soil") è biologicamente unico. Le cellule endoteliali della rete vascolare di diversi organi esprimono differenti recettori di membrana e fattori di crescita che influenzano il fenotipo delle metastasi che si svilupperanno in quel punto. In altre parole, l'esito della progressione metastatica dipende dalle multiple interazioni ("cross-talk") delle cellule metastatizzanti con i meccanismi omeostatici, che la cellula tumorale può sfruttare a suo vantaggio. La terapia della metastasi non deve quindi essere diretta soltanto verso le cellule tumorali stesse, ma anche verso i fattori omeostatici che promuovono meccanismi quali crescita tumorale, sopravvivenza, angiogenesi, invasione e metastasi. [5]

In particolare, il processo invasivo è accompagnato dall'azione concertata di proteasi multiple, come ad esempio le metalloproteasi della matrice (matrix metalloproteinases, MMPs) ed alcuni membri del sistema dell'attivatore urochinasico del plasminogeno, il quale include uPA (urokinase Plasminogen Activator), il suo recettore uPAR (urokinase Plasminogen Activator Receptor) ed il suo inibitore PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1). [6] Entrambi questi sistemi sono regolati da inibitori endogeni quali i TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteases). Diversi studi hanno evidenziato l'importanza delle proteasi e dei loro inibitori nella diffusione metastatica della cellula cancerosa. [7, 8]

1.2.1 - Il sistema dell'uPA (*urokinase plasminogen activator*)

I principali componenti del sistema dell'attivatore urochinasico del plasminogeno sono la proteasi serinica uPA, il suo recettore di membrana uPAR ed i due inibitori PAI-1 e PAI-2. [9] Il sistema uPA è coinvolto in un ampio spettro di processi biologici quali fibrinolisi, infiammazione, formazione della placca aterosclerotica, rimodellamento della matrice durante la cicatrizzazione delle ferite, invasione tumorale, angiogenesi e metastasi. [10]

Il legame dello zimogeno pro-uPA al suo recettore uPAR sull'estremità in avanzamento delle cellule in migrazione, e la conseguente attivazione di uPA, provoca l'inizio di una cascata proteolitica che risulta nella conversione del plasminogeno a plasmina [Fig. 7], la quale, mediante la sua attività proteolitica, può degradare un'ampia serie di componenti della membrana basale extracellulare (ad esempio fibrina e fibronectina), attivare fattori di crescita latenti come TGF- β (*transforming growth factor β*) oltre che ad attivare altri enzimi quali metalloproteasi. [11]

Un gran numero di dati, ricavati da sistemi modello, suggerisce che il sistema uPA giochi un ruolo chiave nell'invasione tumorale e nel processo metastatico. [12] In precedenza si credeva che uPA mediasse semplicemente la disseminazione tumorale, catalizzando la degradazione della matrice extracellulare e permettendo alle cellule tumorali di invadere localmente e di disseminarsi a distanza. Dati recenti suggeriscono invece che il sistema uPA giochi un ruolo più ampio nel cancro e che sia coinvolto in stadi multipli nella formazione e nella progressione della malattia. [12] Ad esempio, è stato dimostrato che uPA può stimolare la proliferazione cellulare, la migrazione e modulare l'adesione cellulare [Fig. 8]. Coerentemente con il loro coinvolgimento nella progressione tumorale, uPA, uPAR e PAI-1 sono spesso overespressi in molte tipologie di tumore. Inoltre, alti livelli di queste proteine generalmente correlano con prognosi infausta; al contrario, alti livelli di PAI-2 tendono a predire un *outcome* favorevole. In aggiunta al valore prognostico, i componenti del sistema uPA possono anche avere valore predittivo per quanto riguarda la risposta a specifiche terapie. [11]

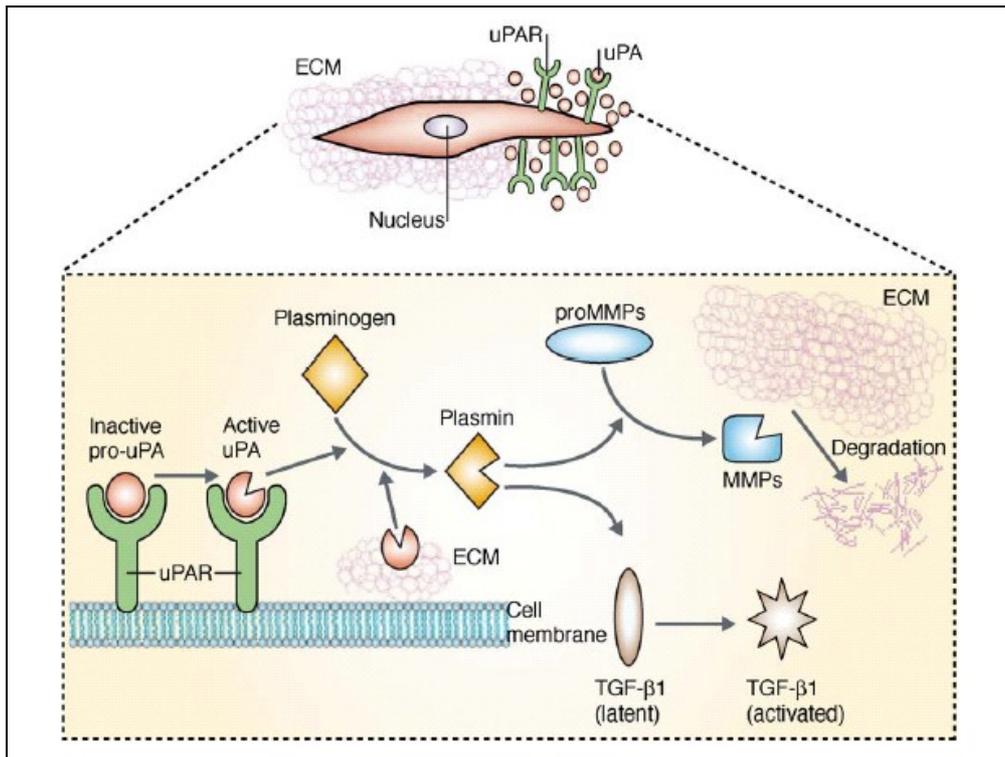


Figura 7
 (tratta da Duffy MJ, Duggan C, *Clinical Biochemistry* 2004, 37:541–548)
 Modello del funzionamento del sistema uPA.

1.2.1.1 - uPA

uPA è una proteasi serinica del peso di 53 kDa; è sintetizzata in forma cataliticamente inattiva, come un polipeptide a singola catena. L'attivatore fisiologico è sconosciuto, anche se diverse proteasi quali plasmina, catepsina B e L, e callicreina umana di tipo 2 possono catalizzare l'attivazione di uPA *in vitro*. [9] Strutturalmente, uPA è divisibile in tre domini: un N-terminale contenente il sito di legame a uPAR (ATF, *amino terminal fragment*); un centrale a funzione sconosciuta ed un C-terminale contenente il sito catalitico. La proteasi matura (attivata) è costituita da due catene unite da un singolo ponte disolfuro. In contrasto con la maggior parte delle proteasi in grado di degradare la matrice extracellulare, uPA è caratterizzato da ristretta specificità di substrato; la sua attività catalitica più documentata è la conversione di plasminogeno inattivo in plasmina. La plasmina è, come uPA, una proteasi serinica, ma con specificità di substrato più ampia; essa è in grado di degradare la maggior parte delle proteine della matrice, attivare i precursori di diverse metalloproteasi (MMP-3, MMP-9, MMP-12 E MMP-13) [13], e attivare o rilasciare alcuni fattori di crescita, fra i quali HGF (*hepatocyte growth factor*), IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), TGF- β , FGF-2 (*fibroblast-like growth factor 2*), EGF (*epidermal growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) [14]. Questi peptidi ad effetto pleiotropico hanno la capacità di favorire la progressione tumorale stimolando la proliferazione e la migrazione cellulare,

sopprimendo l'apoptosi e promuovendo l'angiogenesi. Si può quindi comprendere come la plasmina giochi un ruolo cruciale in diverse fasi della progressione tumorale.

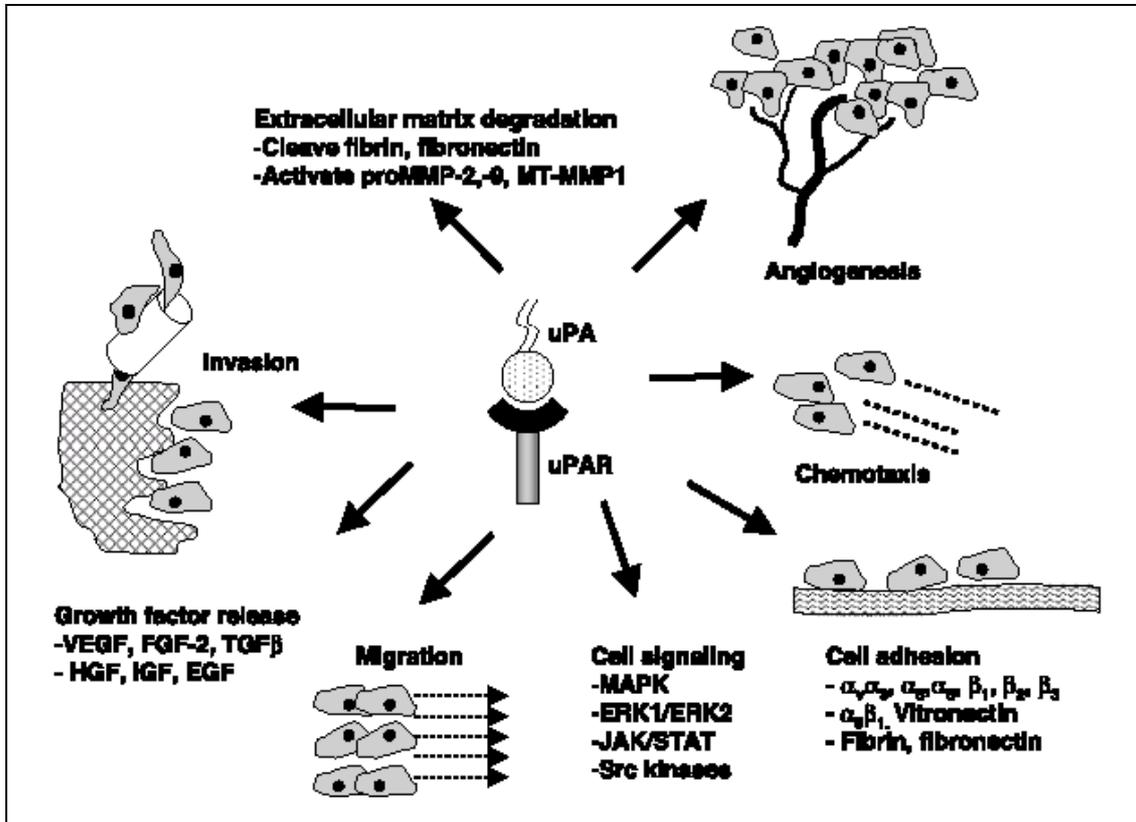


Figura 8
 (tratta da Choong PFM, Anne PW, *Clinical Orthopaedics and related research* 2003, 415: 46–58)
 Azioni molecolari del sistema uPA.

1.2.1.2 - uPAR

uPAR (o CD87) è una glicoproteina ricca in cisteine, costituita di tre domini, unita alla membrana cellulare da un'ancora di glicosil-fosfatidilinositolo (*GPI-anchor*); non si tratta quindi di un recettore transmembrana. [15] Il complesso attivo ligando-recettore è in realtà trimetrico e coinvolge due molecole di uPAR e una di uPA. Il legame di uPA a uPAR non solo potenzia la proteolisi, ma porta anche a trasduzione del segnale. [15] Siccome uPAR manca di un dominio transmembrana, la segnalazione richiede l'interazione tra il recettore e altre proteine. Potenziali proteine partner di uPAR nella trasduzione del segnale includono integrine, recettori accoppiati a proteine G (GPCRs), e caveolina. [15] Il legame tra ligando e recettore porta quindi alla stimolazione di diversi eventi fisiologici, dipendenti dalla conversione di plasmina a plasminogeno, ovvero catalisi-dipendenti, descritti nel precedente paragrafo [16], oppure catalisi-indipendenti, quali segnalazione

intracellulare, segnalazione tramite integrine e chemiotassi; questi ultimi processi portano a attivazione dell'angiogenesi, della proliferazione cellulare, della migrazione e alla modulazione dell'adesione [17]: caratteristiche fondamentali del fenotipo maligno, che rendono il sistema uPA un regolatore critico del comportamento tumorale.

1.2.1.3 - PAI-1 e PAI-2

La conversione di plasminogeno in plasmina mediata da uPA è regolata dai due inibitori PAI-1 (43 kDa) e PAI-2 (47 o 60 kDa), i quali legano uPA attivo in soluzione oppure il complesso uPA-uPAR sulla membrana cellulare, con una stechiometria di 1:1. [18] Sia PAI-1 che PAI-2 appartengono alla famiglia degli inibitori delle proteasi chiamati *serpin* (*serine protease inhibitors*), una famiglia di proteine che mostra una struttura terziaria conservata ed utilizza un caratteristico meccanismo di inibizione "suicida". [19] PAI-1 sembra essere l'inibitore dominante ed è prodotto da piastrine, cellule endoteliali, della granulosa e tumorali [20]; PAI-2 è prodotto da fagociti, cellule tumorali e del trofoblasto.

Una importante proprietà di PAI-1 è l'abilità di indurre l'internalizzazione e la degradazione dei complessi uPA-uPAR. Tale meccanismo richiede l'interazione con LRP (*low-density lipoprotein receptor related protein*). Il complesso uPA-PAI-1 viene degradato, mentre il recettore uPAR, mediante endocitosi, viene trasportato sulla superficie cellulare e riciclato. [21]

Siccome il sistema uPA gioca un ruolo critico nella progressione tumorale, specialmente per quanto riguarda invasione e metastasi, ci si può ragionevolmente aspettare che i livelli di espressione dei suoi componenti possano correlare con il potenziale metastatico e quindi con il tipo di prognosi.

E' stata riportata una forte correlazione tra l'espressione dei componenti del sistema uPA e l'*outcome* clinico in pazienti con tumori al seno [22, 23], ginecologici [24], gastrointestinali [25], polmonari [26], renali [27], alla vescica [28] e dei tessuti molli [29]. In tutti questi casi, un marcato aumento dei livelli di uPA e uPAR sopra la norma è associato a prognosi peggiore e fenotipo maligno; la stessa correlazione è stata trovata spesso per PAI-1, mentre alti livelli di PAI-2 tendono ad associarsi con prognosi migliore.

uPA e PAI-1 sono attualmente considerati tra i fattori prognostici molecolari più estesamente validati per quanto riguarda il tumore al seno. [30, 31] Per predire l'*outcome* di questi pazienti, sia uPA che PAI-1 danno informazioni indipendenti dai fattori prognostici classici quali stato linfonodale, dimensioni del tumore e grado istologico. Inoltre, l'impatto prognostico di uPA e PAI-1 è più forte di quello di altri fattori quali recettori per estrogeni, HER-2/neu, p53 e catepsina D. Diversi studi recenti hanno dimostrato che sia uPA e PAI-1 possono dare informazioni sul decorso clinico anche in pazienti con tumore al seno con linfonodi ascellari negativi; ed è proprio in questo

sottogruppo di pazienti che sono maggiormente richiesti nuovi e potenti markers prognostici. [30, 31]

Recentemente, per la validazione del valore prognostico di uPA e PAI-1 nel cancro al seno sono stati condotti due studi clinici: un trial prospettico randomizzato comprendente 556 pazienti [32] e una analisi multicentrica di 8377 pazienti [33]. Da tali studi è emerso che:

- uPA e PAI-1 sono secondi solo allo stato linfonodale nel predire la sopravvivenza libera da malattia e la sopravvivenza totale;
- uPA e PAI-1 danno un'informazione prognostica indipendente dallo stato linfonodale, dalla grandezza del tumore, dal grado istologico, dallo stato dei recettori ormonali e dall'età del paziente;
- Per pazienti linfonodo-negativi uPA e PAI-1 sono i fattori prognostici più importanti in assoluto;
- Come uPA e PAI-1, anche alti livelli di uPAR sono associati con esito patologico negativo.

Il *management* ottimale di pazienti con cancro non richiede solo fattori prognostici associati all'esito della malattia; servono anche fattori predittivi che diano informazioni sul tipo di risposta/resistenza a specifiche terapie. In maniera simile ad altri marker, come i recettori per estrogeni o HER-2/neu, le proteine del sistema uPA hanno capacità sia prognostiche che predittive. Uno studio recente, comprendente 815 donne con cancro al seno a stadi avanzati, ha dimostrato che le pazienti con alti livelli di uPA, uPAR e PAI-1 mostrano una minore risposta terapeutica al tamoxifene ed un minore periodo libero da malattia dopo l'inizio del trattamento rispetto alle pazienti con bassi livelli delle stesse proteine. [34] Altri studi hanno dimostrato che, in donne con cancro al seno a stadi precoci, alti livelli di uPA e PAI-1 predicono una miglior risposta a chemioterapia adiuvante con CMF (ciclofosfamide, metotrexate e 5-fluorouracile). [35]

Anche se la conversione di plasmina a plasminogeno mediata da uPA richiede un dominio catalitico intatto, molte altre funzioni pro-tumorali del sistema uPA non richiedono l'attività catalitica ma soltanto il legame del dominio amino-terminale di uPA a uPAR. In questo senso, il recettore uPAR può essere un valido bersaglio per una terapia antitumorale. Possibili approcci terapeutici possono essere peptidi per inibire l'interazione uPA-uPAR [36], RNA antisenso o approcci di terapia genica per *downregolare* l'espressione di uPAR [37] ed anticorpi monoclonali anti-uPAR [38] o anti-ATF [39].

Il ruolo fisiologico primario del sistema uPA sembra essere il rimodellamento della matrice extracellulare. Siccome la maggior parte dei tessuti umani sono quiescenti durante la vita adulta, sembra improbabile che l'inibizione del sistema uPA possa comportare particolari tossicità

collaterali; ciò è stato osservato in modelli murini mancanti di uPA. [40] L'apparente mancanza di tossicità per la sua inibizione rende questo sistema proteolitico un candidato ideale per diventare un bersaglio per terapia antitumorale. Fino ad oggi, tuttavia, tutti gli studi di terapia molecolare anti-uPA sono stati fatti su modelli animali; la ricerca in questo campo non si è ancora spostata sull'area umana.

La sfida futura sarà identificare agenti biologici e strategie in grado di bloccare l'interazione tra uPA e uPAR in un modo e per un tempo sufficiente a dare un beneficio clinico significativo. L'esistenza di molti processi ridondanti in natura tuttavia suggerisce che, se il sistema uPA viene inibito, altri sistemi simili potrebbero diventare biologicamente più attivi e recuperare il ruolo del sistema uPA. Quindi, ciò che potrebbe avere maggiori probabilità di successo, per quanto riguarda l'uccisione di cellule tumorali rendendo minimi i rischi di sviluppo di resistenza, è una terapia combinativa, includente il sistema uPA tra gli altri, in grado di agire su numerosi bersagli. E' auspicabile che una nuova terapia molecolare con il sistema uPA come bersaglio possa complementare i protocolli tradizionali, in modo da aumentarne la capacità tumoricida ed al contempo ridurne la tossicità.

1.3 - La Matrice Extracellulare

L'abilità delle cellule di riconoscere ed interagire con la matrice extracellulare è di fondamentale importanza per il normale sviluppo e il continuo mantenimento dell'architettura dei tessuti e delle loro funzioni.

La matrice extracellulare è coinvolta in una vasta gamma di fenomeni che includono l'adesione cellulare, la migrazione, la proliferazione e l'espressione genica [41, 42], ed è il principale costituente di tre fondamentali tessuti, l'osso, la cartilagine e il tessuto connettivo.

La matrice extracellulare è composta da una componente fibrillare, che genera resistenza alla trazione, e dalla sostanza fondamentale, la cui funzione è invece quella di conferire resistenza alla pressione (gel idratato). La presenza di acqua facilita la diffusione di sostanze nutritive e di scarto tra tessuti e sangue o linfa [Fig. 9].

La parte fibrillare della matrice extracellulare è costituita principalmente da fibre collagene, fibre elastiche e fibronectina.

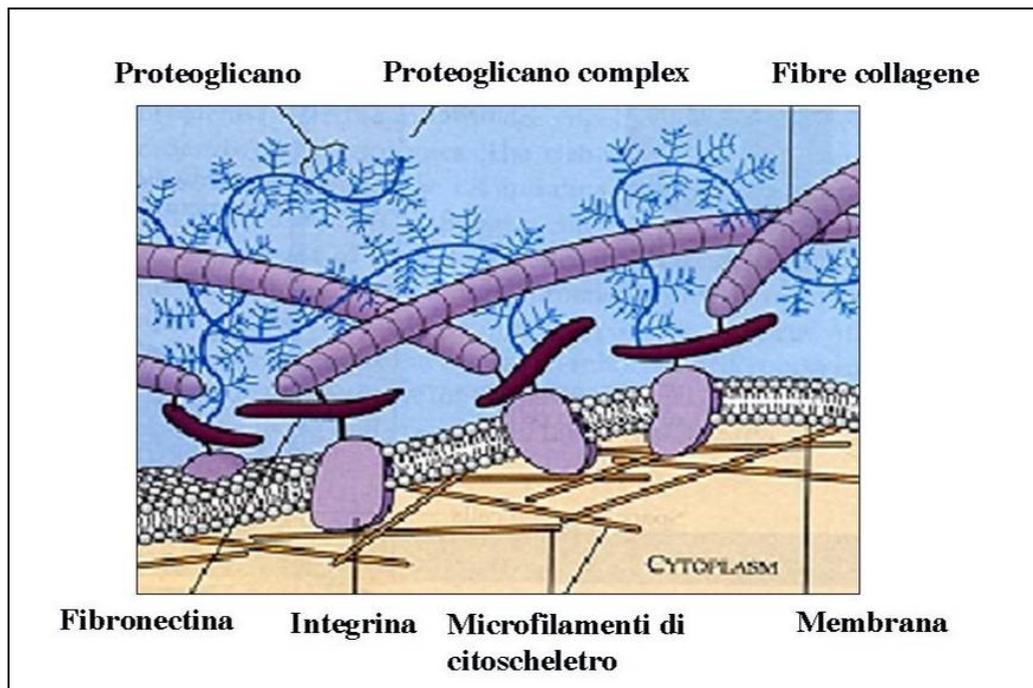


Figura 9
Struttura della Matrice Extracellulare

Le fibre collagene sono fibre flessibili ma inestensibili di 10-300nm di diametro che conferiscono una resistenza alla trazione superiore all'acciaio.

Sono costituite da fibrille di 10-300 nm di diametro.

Le fibrille sono costituite da molecole di tropocollagene lunghe 280nm e spesse 1,5nm. Ogni molecola di tropocollagene è costituita a sua volta da 3 catene α di 1000 aa (1/3 glicina) [Fig. 10].

Esistono diverse catene α che generano circa 20 tipi di fibre collagene diverse.

Il collagene è per quantità e qualità la glicoproteina più importante della componente fibrillare. Esso ha funzione non solo di sostegno ma è anche implicato nell'adesione e divisione cellulare.

Si distinguono vari tipi di fibre collagene, tra cui:

Il collagene di tipo I si trova nel connettivo propriamente detto, nell'osso, nella dentina e nel cemento (fibroblasti, osteoblasti, odontoblasti, cementoblasti).

Il collagene di tipo II è costituito da fibre sottili ed è quasi esclusivo della cartilagine ialina ed elastica (condroblasti).

Il collagene di tipo III costituisce la fibra reticolare, è altamente glicosilato e forma fibrille di 0,5-2,0 μ m. Si trova in fibroblasti, cellule muscolari ed epatociti.

Il collagene di tipo IV forma reti di tropocollagene che si combinano a formare la rete della membrana basale. Si trova nelle cellule epiteliali, nel muscolo e nelle cellule di Schwann.

Il collagene di tipo V forma fibrille sottili che si combinano con le fibrille di collagene di tipo I. Si può ritrovare in fibroblasti e cellule mesenchimali.

Il collagene di tipo VI forma filamenti a grani, si trova nei tessuti interstiziali e consiste di tre catene polipeptidiche, $\alpha 1$ e $\alpha 2$ del peso di circa 140 kDa, $\alpha 3$ di 210 kDa. Queste catene formano monomeri eterotrimerici e sono a loro volta associati a formare larghi oligomeri (dimeri e tetrametri) che si assemblano a costituire distinte fibrille.

Il collagene VI è una forma di collagene piuttosto raro, la sua catena contiene segmenti di triple eliche e inusuali N- e C- domini globulari terminali. Molti studi hanno dimostrato che i domini a tripla elica sono i responsabili di molte funzioni del collagene VI e della sua interazione con i componenti della ECM [Fig. 11]. [43]

Le fibre elastiche sono fibre sottili che si possono stirare 1,5 volte la loro lunghezza e possono formare spessi fasci. Sono prodotte da fibroblasti del connettivo e da cellule muscolari lisce dei vasi.

L'asse centrale delle fibre è costituito da elastina ed è circondato da una guaina di microfibrille di fibrillina (10 nm di diametro). L' elastina è una proteina ricca in glicina, lisina, alanina, valina e prolina e le sue catene sono allineate insieme in modo che quattro elastine di quattro catene diverse formino legami covalenti (legami crociati di desmosina). È un polimero insolubile che svolge principalmente la funzione di sostegno.

La fibronectina è una delle molecole responsabili del collegamento tra la matrice e la superficie cellulare. E' una glicoproteina dimerica che possiede siti di attacco sia per il collagene che per i glicosaminoglicani e contiene come elemento strutturale una sequenza di aminoacidi arginina-glicina-acido aspartico (modulo RGD), mediante la quale si lega a recettori di adesione cellulare, come le integrine che sono proteine

transmembrana costituite da 2 subunità alfa e beta.

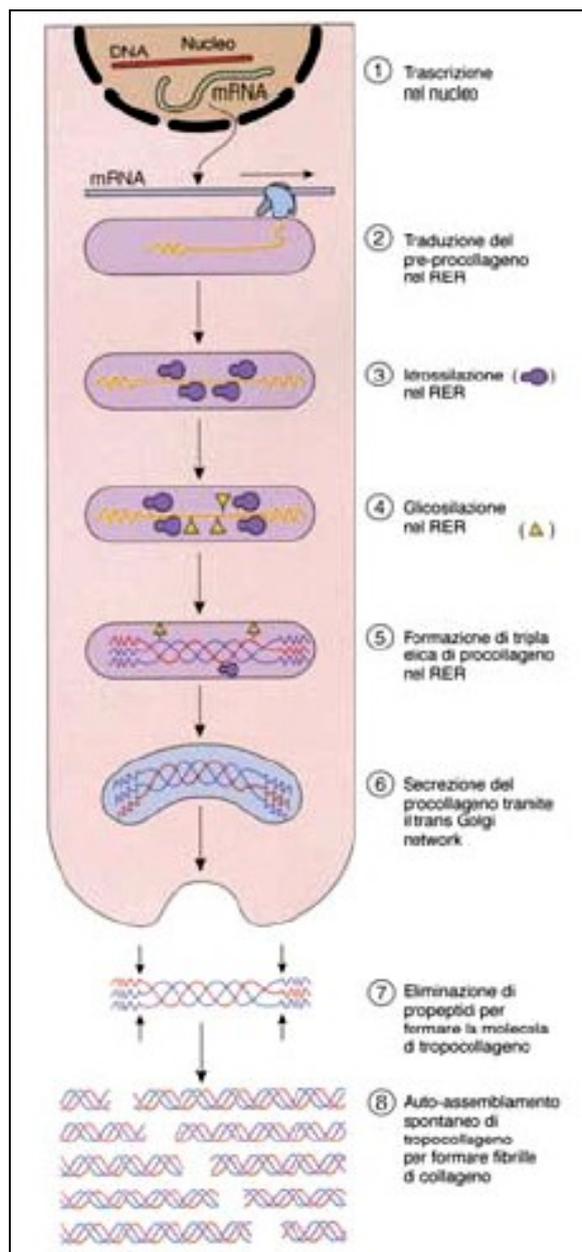


Figura 10
Sintesi del Collagene

Esistono 20 diverse integrine con diverse combinazioni di alfa e beta e precisamente 15 diverse subunità alfa e 8 diverse subunità beta. Esse si legano a brevi sequenze di aminoacidi di molecole della matrice extracellulare, quali collagene, fibronectina e laminina e contribuiscono ad ancorare componenti del citoscheletro. [44]

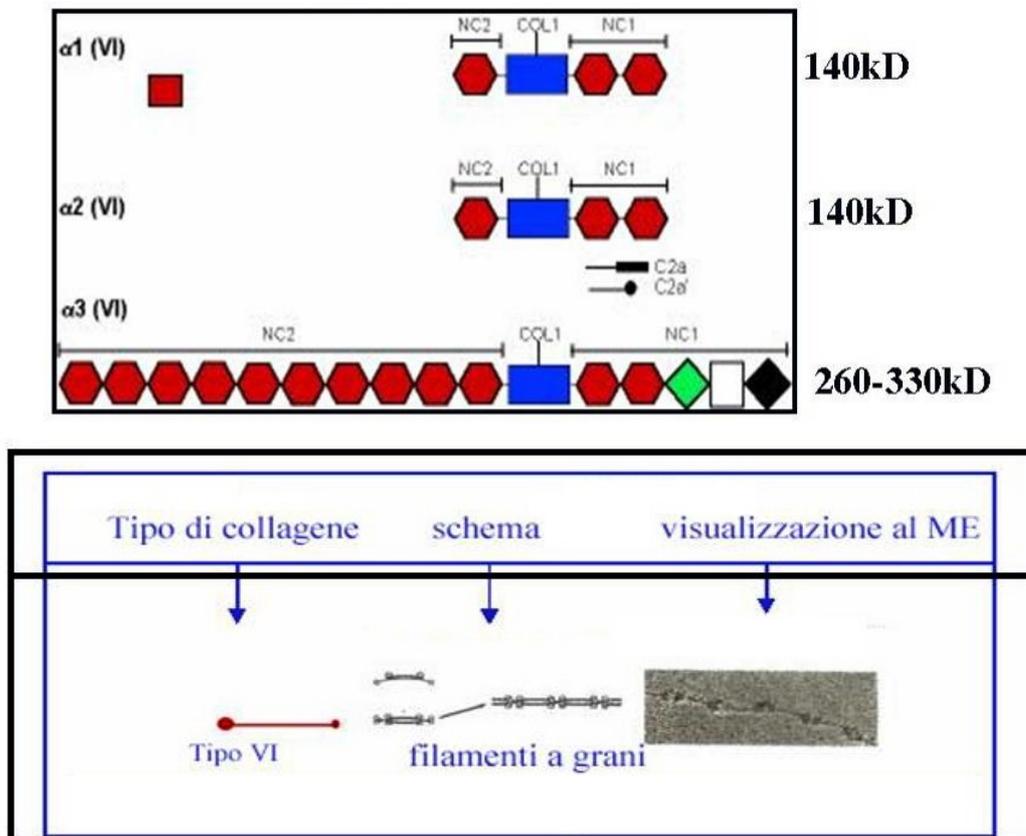


Figura 11
Struttura molecolare e visione al microscopio elettronico del Collagene VI.

La sostanza fondamentale è un materiale amorfo (gel) costituito da complessi di proteine quali glicosaminoglicani e proteoglicani, che sono in grado di trattenere moltissima acqua.

I glicosaminoglicani (GAGs) sono lunghe catene disaccaridiche ripetute e cariche negativamente (solforate), molto idrofiliche e contenenti sempre un amminozucchero (N-Acetylglucosammina ed N-Acetyl galattosammina); i cationi (Na^+) dei glicosaminoglicani legano acqua idratando la matrice. La presenza di un residuo carbossilico o sulfidrilico conferisce alle subunità disaccaridiche una carica elettrica negativa necessaria a richiamare ioni e acqua [Fig. 12].

L'eparina, il cheratan solfato e il condroitin solfato (circa 300 unità) sono esempi di GAGs solforati, mentre l'acido ialuronico è un GAG non solforato, (25.000 unità).

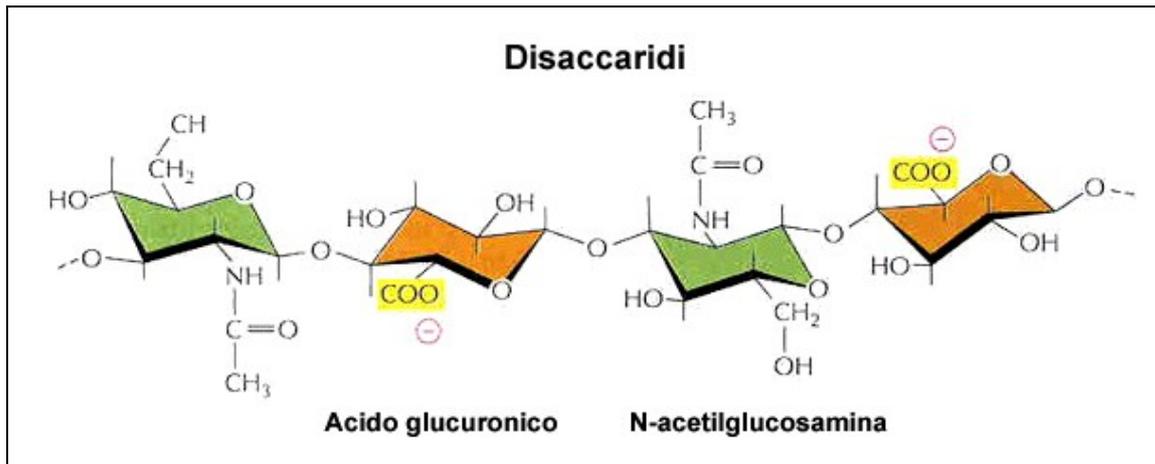


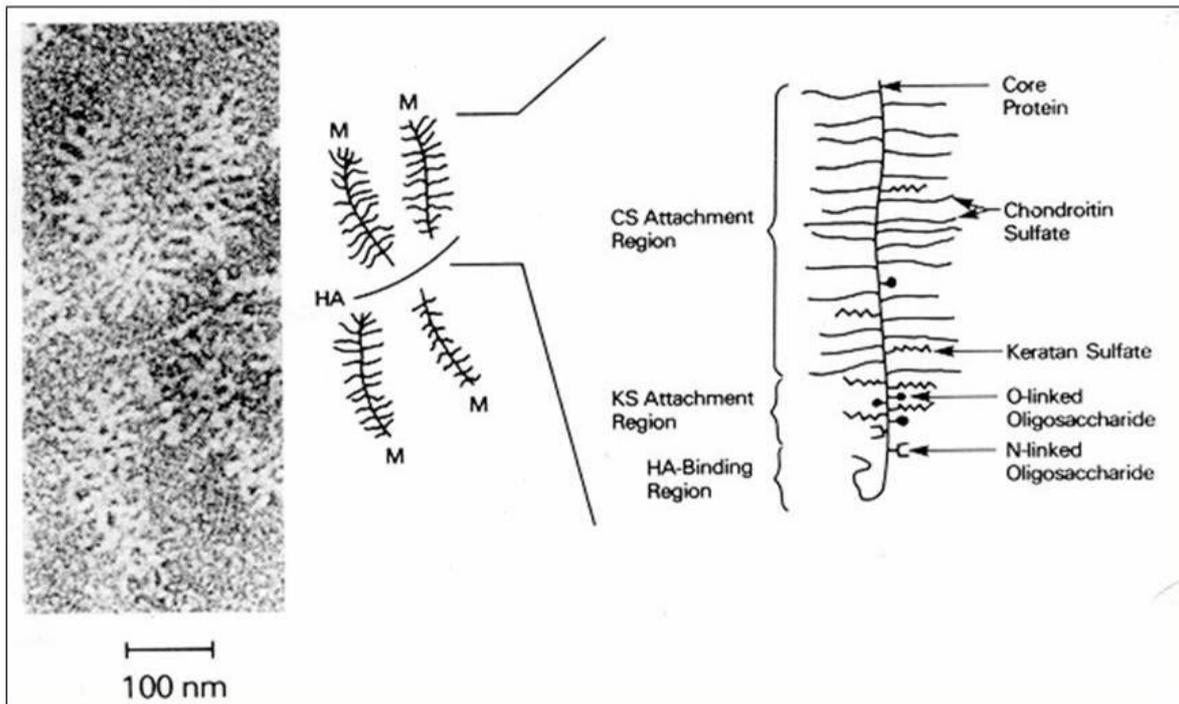
Figura 12
Struttura dei Glicosaminoglicani.

1.3.1 - I Proteoglicani

I proteoglicani (PGs) sono un gruppo di molecole, non solforate, che contengono catene di glicosaminoglicani legate covalentemente al loro “core” proteico. I proteoglicani, imbrigliando acqua e ioni, sono responsabili delle modificazioni e dei cambiamenti di densità della matrice.

Si dividono in PGs extracellulari, come Aggrecan, Versican, Decorina, i quali partecipano in misura determinante alla formazione della ECM, PGs intracellulari, che si trovano nei granuli di secrezione dei mastociti, trombociti e cellule Natural Killer (NK), e PGs transmembrana, come il Syndecan; questa proteina ha una porzione centrale che attraversa la membrana della cellula, il suo dominio extracellulare è caratterizzato da catene di condroitin solfato ed eparan solfato, mentre il dominio intracellulare interagisce con l’actina ed il citoscheletro.

I PGs sono spesso associati all’acido ialuronico mediante altre proteine che fanno da ponte, in modo da ottenere aggregati a forma di piuma [Fig. 13], estremamente idrofilici, e questo spiega l’elevata quantità di acqua presente nella matrice. Tuttavia i proteoglicani sono anche legati alle fibrille di collagene con lo scopo di limitare l’eccessivo richiamo d’acqua, che cambierebbe radicalmente le proprietà fisiche dei tessuti.



V.C.Hascall and G.K. Hascall. Cell Biology of Extracellular Matrix (1981)

Figura 13
Aggregato di Proteoglicani

1.3.2 - La molecola NG2

Il proteoglicano NG2 è stato scoperto inizialmente nel 1981 da un gruppo di ricercatori del “La Jolla Institute” [45, 46, 47] nelle cellule neuronali in proliferazione del cervello di ratto e nel 1996 è stato trovato espresso, da Pluschke e collaboratori, nel melanoma umano e per tale motivo nominato MSCP (Melanoma Chondroitin Sulphate Proteoglycan) [48]; questa molecola costituisce una glicoproteina di membrana, preferenzialmente espressa dalle cellule progenitrici in divisione del mesenchima e della glia, che subisce una sotto-regolazione in seguito a differenziamento.

Il gene è sul cromosoma 15q23 ed è espresso in cellule del sistema nervoso e in numerosi tipi di cellule immature.

Per quel che riguarda il sistema nervoso, è stato trovato espresso in:

- cellule precursori di oligodendrociti
- periciti e cellule di Schwann immature
- cellule del Sistema Nervoso Periferico (SNP).

In seguito è stato trovato espresso anche in:

- cellule immature del muscolo liscio

- mioblasti dello scheletro
- cartilagine in via di sviluppo
- cellule staminali epidermiche
- cellule del melanoma umano
- vasi sanguigni nel sarcolemma delle fibre muscolari di individui adulti.

Elevati livelli di espressione di questa molecola sono stati osservati in alcuni tipi di cellule maligne di tumori, come melanomi, glioblastomi e condrosarcomi [49], insinuando il dubbio per cui NG2 non “inibito” da fenomeni di sotto-regolazione, ma espresso abbondantemente in cellule tumorali, possa essere almeno in parte coinvolto in processi patologici e possa stimolare la proliferazione e metastatizzazione.

1.3.2.1 - La struttura

La proteina NG2 [Fig. 14] è un proteoglicano di membrana ad elevato peso molecolare (500 kDa ca.), con un core proteico di 300 kDa ed è costituita da un largo dominio extracellulare (2224 aminoacidi), un singolo dominio transmembrana (25 aminoacidi) ed una corta coda citoplasmatica (76 aminoacidi).

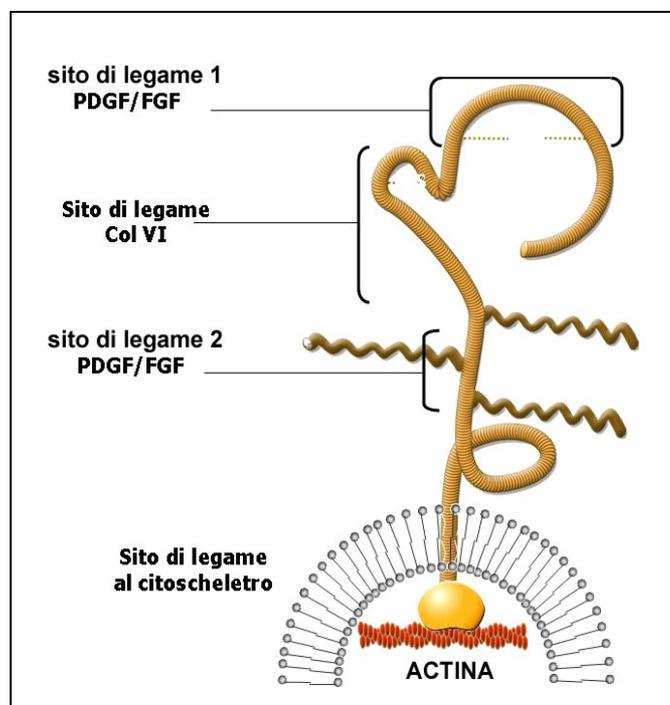


Figura 14
Struttura del proteoglicano NG2, 8071 bp/2325 aa/~700-800kD.

La regione extracellulare può essere divisa in 3 domini:

- un dominio N-terminale contenente otto cisteine, stabilizzato da legami disolfuro (S-S) intracatena;
- un dominio serina-glicina con le catene di condroitin solfato;
- un dominio contenente cisteina.

Nel dominio extracellulare sono state trovate quattro zone ripetute, ognuna di 200 aminoacidi. Queste ripetizioni contengono una corta sequenza simile alla regione che lega il Ca⁺⁺ nelle caderine. Il dominio citoplasmatico contiene tre residui di treonina che potrebbero essere siti per la fosforilazione ad opera della proteina chinasi C. Questo potrebbe suggerire che NG2 sia coinvolta in processi di trasduzione del segnale.

Infine, nel dominio transmembrana è presente un residuo di cisteina, ma al momento non si conoscono ancora le caratteristiche di tale dominio rispetto alle capacità funzionali della molecola.

1.3.2.2 - Coinvolgimento della molecola NG2 nei processi di adesione e migrazione cellulare

Il proteoglicano NG2, grazie all'interazione con il citoscheletro e con proteine della matrice extracellulare [50], sembra essere coinvolto nei processi di adesione e migrazione cellulare, che sono legati alla progressione metastatica.

L'evento metastatico, ovvero la crescita progressiva di focolai tumorali secondari a distanza rispetto alla lesione primaria, è la causa più importante di morte correlata al cancro. La progressione metastatica consiste in una lunga serie di eventi sequenziali e intercorrelati. Ognuno di questi eventi può essere limitante, in quanto per una cellula l'incapacità di compiere uno o più di essi significa arrestare l'intero processo.

Nei tumori invasivi le cellule neoplastiche invadono la matrice e penetrano nei vasi sanguigni e linfatici, determinando la diffusione della malattia. Il 30% dei pazienti presenta metastasi alla diagnosi [51, 52, 53].

L'evento metastatico può essere diviso in due fasi:

- invasione della matrice extracellulare (ECM)
- disseminazione vascolare con impianto metastatico delle cellule tumorali nell'organo bersaglio.

L'invasione dell'ECM è un processo attivo che comprende il distacco delle cellule tumorali dal tumore primitivo, l'attacco ai componenti dell'ECM e la migrazione delle cellule tumorali.

In condizione di normalità, le cellule sono adese fra di loro mediante molecole di adesione (ad esempio le caderine); una sotto-regolazione di tali fattori riduce la capacità di adesione cellulare e ne facilita il distacco dal tumore primitivo e l'avanzamento nei tessuti circostanti. Per penetrare in questi tessuti, le cellule tumorali devono aderire ad alcuni componenti della matrice, come laminina e fibronectina. E' stato ipotizzato che le cellule tumorali abbiano un numero più elevato di recettori

per queste molecole distribuiti su tutta la superficie cellulare, rispetto alle cellule normali che presentano i recettori di membrana per la laminina polarizzati sulla superficie della membrana basale. [53]

Dopo l'attacco ai componenti dell'ECM, le cellule tumorali secernono enzimi proteolitici attraverso i quali la membrana basale viene liscata e la matrice extracellulare degradata, aprendo così vie di migrazione. Sembra che la migrazione sia mediata da citochine derivate dalle cellule tumorali come ad esempio il fattore di mobilità autocrino.

I prodotti di degradazione dei componenti della matrice, derivati dal collagene e dai proteoglicani, promuovono la crescita angiogenica e chemiotattica, facilitando ulteriormente la migrazione delle cellule tumorali nell'ECM degradata.

La successiva disseminazione delle cellule tumorali è intravasale e si attua mediante la formazione, da parte delle cellule tumorali stesse, di aggregati cellulari che meglio resistono agli attacchi del sistema immunitario dell'organismo.

La disseminazione intravasale può avvenire attraverso la via linfatica (mezzo di diffusione più sfruttato dalle cellule dei carcinomi) e attraverso la via ematica (tipica dei sarcomi). Questo ultimo tipo di disseminazione coinvolge soprattutto le vene. In questo caso, le cellule trasportate dal sangue seguono il flusso ematico che drena il sito del tumore primitivo. Fegato e polmoni sono organi bersagliati molto frequentemente da questa disseminazione ematogena poiché il sangue refluo dall'area portale arriva al fegato e il sangue delle vene cave arriva ai polmoni. [53]

La diffusione tramite arterie può invece avvenire quando le cellule tumorali passano attraverso il letto capillare o nelle anastomosi atero-venose polmonari o quando metastasi polmonari danno luogo ad emboli metastatici.

L'ultimo processo è la fuoriuscita dal circolo ematico, per fare ciò le cellule tumorali aderiscono all'endotelio vasale e fuoriescono attraverso la membrana basale dei vasi nell'organo bersaglio. In questo processo vengono coinvolte molecole di adesione quali integrine, recettori della laminina e diversi enzimi proteolitici.

Di particolare importanza è la molecola di adesione CD44, che è espressa sui linfociti T normali ed interviene nella migrazione in siti specifici del tessuto linfoide. Questa migrazione è accompagnata dal legame del CD44 con l'endotelio delle venule. Sembra che alcuni tumori esprimano varianti del CD44 e usino queste molecole per impiantarsi nei linfonodi.

La disseminazione tumorale (organotropismo) dipende in parte dalla localizzazione anatomica del tumore, in parte da altri fattori, ad esempio le cellule tumorali possono presentare molecole di adesione i cui ligandi sono espressi in preferenza sulle cellule endoteliali di determinati organi

bersaglio, oppure alcuni organi bersaglio possono liberare sostanze chemiotattiche che tendono ad attirare le cellule tumorali. [53]

Data l'elevata quantità di fattori e molecole che partecipano alle varie fasi dei processi di metastatizzazione, la conoscenza dei meccanismi molecolari alla base delle interazioni tra esse assume un importante significato.

Studi di immunoprecipitazione hanno rivelato che, a differenza di quanto accade per molti proteoglicani, che interagiscono con altre molecole mediante legami ionici, l'interazione NG2-collagene VI è di tipo proteina-proteina. Tali esperimenti mostrano che anticorpi anti-NG2 coprecipitano il collagene VI assieme all'NG2 e al suo core proteico. [50]

L'interazione tra collagene VI ed NG2 si riflette nella loro distribuzione in molte linee cellulari che sono state analizzate usando immunofluorescenza. Il fatto che non esista una corrispondenza esatta tra le due molecole indica che non tutti i tipi di collagene VI sono complessati con NG2. Inoltre variazioni nella distribuzione di NG2 sulla superficie cellulare si riflettono in paralleli cambiamenti nella distribuzione del collagene VI, suggerendo ancora una volta un legame tra le due molecole. [50]

Per evidenziare tale legame e' stata effettuata la transfezione con il cDNA di NG2 di ratto nelle linee cellulari B28 (neurone di ratto) e U251 (glioma umano), linee che normalmente non producono NG2, ma sintetizzano il collagene VI e lo secernono nel tessuto delle colture. [54] Il risultato ottenuto con l'immunofluorescenza mostra il collagene VI localizzato alla superficie delle cellule NG2-positive, facendo supporre che la molecola NG2 possa funzionare come recettore del collagene VI.

Alcuni lavori hanno anche dimostrato che, sebbene la funzione dei recettori del collagene VI sia mediata da molecole integriniche, l'interazione fra NG2 e collagene VI può attuarsi indipendentemente da tali molecole, confermando l'ipotesi per cui NG2 possa essere un nuovo tipo di recettore per il collagene VI. [54]

Oltre che con la matrice extracellulare ed in particolare con il collagene VI, NG2 può interagire con il citoscheletro cellulare, costituito prevalentemente di actina andando a formare due diversi tipi di strutture contenenti actina. [55]

In cellule fortemente aderenti tra di loro e con morfologia non alterata, NG2 è organizzato sulla superficie cellulare in strutture lineari che sono co-localizzate con gruppi di fibre contenenti actina e miosina.

Invece, in cellule che hanno perso la loro normale morfologia, e che sono in procinto di migrazione o di divisione, NG2 è presente in lunghi aggregati che si estendono alla periferia di tali cellule. Questo sottolinea ancora una volta la possibilità di un coinvolgimento di NG2 nei processi di

migrazione e diffusione cellulare e supporta l'idea per cui l'associazione di NG2 con queste strutture cellulari possa essere importante per regolare i processi che regolano la dinamicità cellulare, come la mobilità e i cambiamenti morfologici. [55]

1.4 - SDP35 e XTP1

In un recente studio (Volpi G., dati non pubblicati) sono state caratterizzate due nuove probabili proteine RhoGAP, SDP35 e XTP1, che mostrano una grandissima omologia di sequenza tra di loro e la cui espressione è strettamente legata alla neoplasia.

Le proteine RhoGAP sono molecole che presentano una regione conservata di 150 residui chiamata dominio RhoGAP o BH, fondamentale per l'attività delle GAP (GTPase Activating Proteins) che catalizzano la reazione di idrolisi delle GTPasi monomeriche.

Le prime pubblicazioni avevano identificato 53 e 60 proteine RhoGAP codificate dal genoma umano [56, 57]; tuttavia una nuova ricerca, condotta utilizzando soltanto la sequenza del dominio RhoGAP, ha riportato 73 proteine [58]. Analisi filogenetiche indicano che tutte queste proteine condividono un progenitore comune nella loro storia evolutiva, spiegando perché hanno almeno un 20% di omologia nella sequenza del dominio catalitico e conservano la presenza del motivo catalitico "arginine finger". [59, 60]

Oltre al dominio RhoGAP queste proteine possono contenere una varietà di altri motivi strutturali o funzionali [56, 61], forse per una migliore regolazione dei processi che controllano o forse per l'espletamento di altre funzioni. Ad oggi più di 70 GAP sono state caratterizzate in specie differenti [62, 56, 63, 57]: alcune mostrano specificità per una sola RhoGTPase, mentre altre sono meno specifiche; per alcune GAP la specificità sembra essere differente *in vitro* e *in vivo*. Recentemente, uno studio sulle RhoGAP ed i loro domini addizionali ha suggerito che proteine che condividono gli stessi domini condividono anche una stessa attività GTPasica ed ha indicato che lo stato ancestrale di queste proteine implicava soltanto la presenza del dominio RhoGAP e l'attività su Rac1. [64]

Il motivo per cui le proteine della famiglia RhoGAP siano così numerose (almeno 70 membri) rispetto alle GTPasi della famiglia Rho (21 membri) ed il suo significato rimangono fino ad oggi un mistero.

Teoricamente l'attivazione di una Rho GTPasi può verificarsi per stimolazione da parte di una GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) o per inibizione da parte di una GAP. In realtà, attualmente, le GEF sono considerati i mediatori chiave delle Rho GTPasi per la loro responsività agli stimoli extracellulari e perché i GEF mutanti costitutivamente attivi sono dei potenti oncogeni. [65] [Fig. 15]

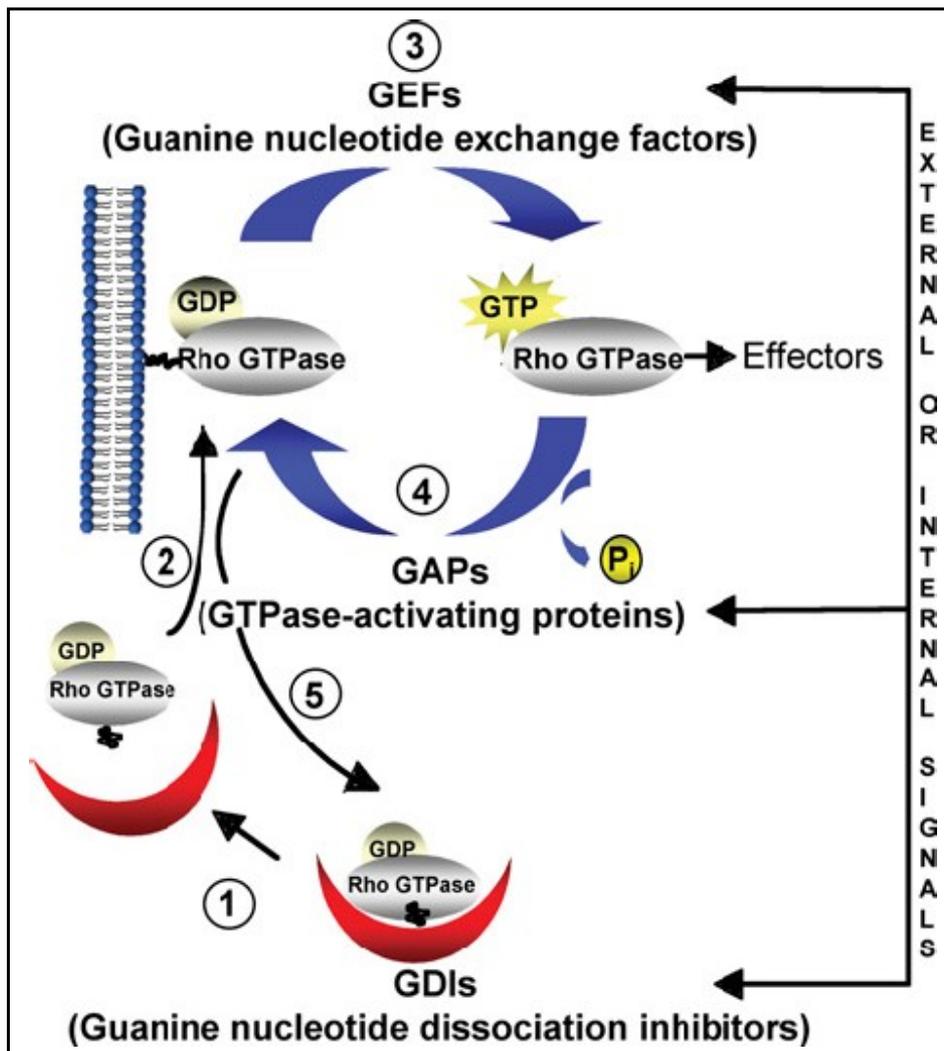


Figura 15
 (Da Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007)
 Ciclo delle Rho GTPasi. In assenza di segnali intracellulari e/o extracellulari, le Rho GTPasi sono mantenute nel citosol dalle GDI che mascherano le loro modificazioni lipidiche. Fattori interni e/o esterni promuovono il loro rilascio dal complesso di inibizione (1) permettendo il loro legame con la membrana plasmatica (2) dove sono attivate dalle GEF (3) e possono trasmettere il segnale alle proteine effettrici. Quindi, le GAP inattivano le GTPasi accelerando l'attività GTPasica intrinseca, portandole nella forma legata al GDP (4). Di nuovo, le GDI stabilizzano la forma inattiva legata al GDP nel citoplasma, aspettando future istruzioni (5).

Tuttavia, questa teoria sta cambiando, alla luce di recenti scoperte che indicano un ruolo delle GAP che va oltre la loro funzione classica di inibitori. Studi recenti mostrano che le stesse GAP possono funzionare da effettori delle GTPasi attivate e che la loro inibizione può da sola promuovere l'attivazione di Rho e, quindi, della risposta mediata da Rho in assenza di stimoli extracellulari. [66] Inoltre, l'esistenza di nuovi ruoli per le proteine GAP è supportata dall'evidenza che alcune proteine G (Rho-related Rdn1 e 2, RhoE, KappaB-Ras1 e 2) mancano dell'amminoacido richiesto per l'attività GTPasica e che alcune GAP non contengono il dominio catalitico conservato "Arg finger" (OCRL-1, INPP5B, CHR5ORF e ARAP2) o lo stesso dominio RhoGAP (BNIP2), suggerendo l'assenza del tipico switch molecolare e/o della classica attività RhoGAP. [67, 68] Infine, l'importanza del ruolo biologico delle GAP è sottolineata anche dal fatto che alcune di esse sono implicate in patologie umane [69, 70, 71, 72, 73] e neoplasie [74, 75, 76].

Fino ad oggi, la partecipazione delle GAP nella tumori genesi è relazionata soprattutto alla loro alterata espressione nelle cellule neoplastiche. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per indagare l'espressione di queste molecole nei tessuti tumorali e quale sia la loro reale funzione durante la tumori genesi. Il pattern di alterazioni riscontrate nelle cellule tumorali indica per lo più un coinvolgimento del pathway mediato da Rho, sebbene non si possano escludere meccanismi alternativi. Molti approcci sperimentali in tumori, linee cellulari tumorali e non tumorali in cui le alterazioni erano provocate per transfezione hanno messo in luce il coinvolgimento delle RhoGAP nel conferimento del fenotipo tumorale. Le più importanti alterazioni delle proteine RhoGAP coinvolte nel fenotipo tumorale sono:

- alterazioni della sub-unità regolatoria di PI3K nel cancro dell'ovaio [77];
- fusione di ARFGAP26 con il gene MLL in cellule leucemiche [78];
- sotto-regolazione della β -chimerina in cellule di carcinoma della mammella [79];
- soppressione di cellule di metastasi di cancro mammario da parte di DLC1 [80];
- alterazione dell'espressione di ARHGAP21 nel carcinoma del testa/collo a cellule squamose [81];
- p190 RhoGAP come soppressore tumorale anti-Ras [82];
- sottoregolazione di Rho tramite chimeri RhoGAP [83];
- sovraregolazione di RACGAP1 nel cancro dell'ovaio [84];
- coinvolgimento di SRGAP1 nella resistenza al tamoxifene [85];
- STARD13 o DLC2 in carcinoma epatocellulare e linee cellulari di carcinoma mammario [86, 87];
- P190 RhoGAP nelle papille terminali e nel carcinoma mammario [88];
- coinvolgimento di RalBP1 nella trasformazione mediata da Ras [89];

- espressione dell'antigene minore di istocompatibilità HLA-1 in tumori solidi [90];
- sovraregolazione di RhoGAP4 in cellule di glioma transfettate con l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno [91].

Sebbene le caratteristiche strutturali e funzionali di SDP35 e XTP1 siano ancora in gran parte sconosciute, la letteratura recente le classifica nella famiglia delle RhoGAP [56, 58]. Tuttavia, il loro dominio RhoGAP è peculiare poiché presenta una lunghezza particolarmente ridotta e l'assenza del motivo "Arg finger" tipicamente conservato nella maggior parte delle proteine RhoGAP. Inoltre SDP35 e XTP1 presentano un dominio DEP. [Fig. 16]

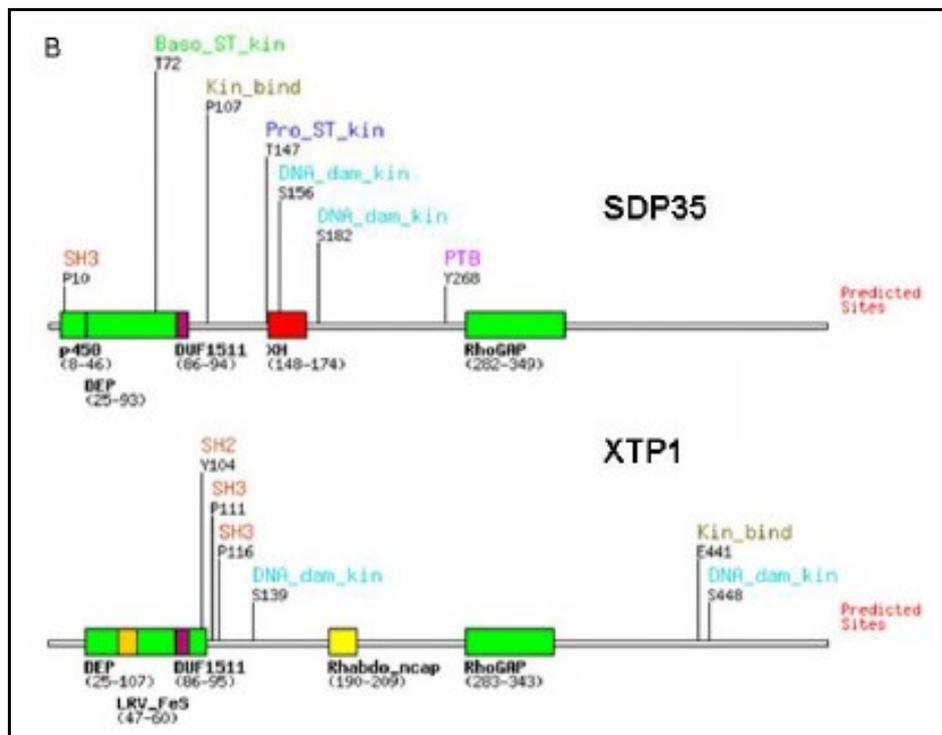


Figura 16

(da Volpi G. PhD tesis)

Rappresentazione grafica dei domini predetti e dei siti di modificazione post-traslazionale. DUF1511 e Rhabdo_ncap: funzione sconosciuta; p450 e LRV_FeS: interazione proteina-proteina.

Il dominio DEP (Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin) è un modulo proteico di circa 100 residui, inizialmente identificato in proteine segnale come Dishevelled, Egl-10 e Pleckstrin [92] e più recentemente ritrovato in alcune chinasi, nelle RGS ed in Epac, il fattore di scambio del nucleotide guaninico regolato da cAMP. Il dominio DED è presente in molti organismi differenti: è estremamente raro nelle piante e molto diffuso nei mammiferi. [93] nella maggior parte dei casi questo dominio è presente in singola copia e solo un piccolissimo numero di proteine che contiene 2 copie. [94, 95, 96]

Recentemente, sono state identificate strutture distinte nella conformazione del dominio DEP e le proteine che lo contengono sono state raggruppate in sei sotto-famiglie: alcuni domini divergenti di lievito, le chinasi contenenti FYVE, la sotto-famiglia delle Dishevelled (dsh), le proteine RGS, Epac e Pleckstrin. [97] In alcune di queste sotto-famiglie è stato indagato il ruolo del dominio DEP. Nella Dishevelled, il dominio dsh-DEP partecipa a diversi pathway di segnalazione, come l'attivazione di JNK (c-Jun N-terminal Kinase), la sovraregolazione dell'attività della β -catenina e la stimolazione della trascrizione mediata da *lef-1*. [98, 99, 100, 101, 102] Inoltre è ben documentato il ruolo del dominio DEP delle Dishevelled nella traslocazione di membrana [103] e nello switch tra i pathway di PCP (planar cell polarity) canonica e non canonica dipendenti da Wnt. [104, 105, 106] Il chiaro coinvolgimento del dominio DEP nel traffico vescicolare e di membrana è ben documentato per la sotto-famiglia R7 delle proteine RGS, dove è responsabile dell'interazione con le proteine SNARE-correlate R7BP e R9AP [107, 108, 109, 110] o con le proteine SNARE-interagenti Snapin [108, 111]. Nel caso di Epac ed RGS9, il dominio DEP sembra mediare la localizzazione di membrana e, per RGS9 soltanto, indirizzare l'attività RGS verso la segnalazione mediata dai recettori della dopamina D2 e non dai recettori muscarinici M2. [112, 113, 114] Al contrario, il dominio DEP di Pleckstrin non sembra essere coinvolto direttamente nella localizzazione di membrana della proteina e la sua funzione molecolare rimane incerta, anche se potrebbe mediare le interazioni proteina-proteina.

Esistono, inoltre, prove di un ruolo del dominio DEP nel traffico nucleolare di RGS6 legato alla trascrizione di rDNA o indotto da stress [115] ed anche del suo impatto sui livelli di attività basale e/o stimolata della RacGEF P-Rex1 [116]. La dimostrazione recente che il dominio DEP della proteina Sst2 di lievito regola le risposte al segnale dei recettori accoppiati alla proteina G (GPCRs) ha attribuito definitivamente a questo dominio un ruolo che va oltre quello del semplice ancoraggio alla membrana. [117, 94, 118] L'indirizzamento da parte del dominio DEP di regolatori ed effettori verso specifici GPCR sembra fornire un mezzo per dettare la natura, la durata e la specificità di un ampio spettro di risposte.

Quando veniva forzata l'espressione di SDP35 e XTP1 in colture cellulari, le cellule andavano incontro a modificazioni morfologiche, a partire dalla perdita delle fibre da stress fino all'arrotondamento cellulare ed al distacco dal substrato. Gli effetti sul riarrangiamento del citoscheletro e la perdita delle adesioni focali risultava inoltre indipendente dalle diverse componenti della matrice extracellulare utilizzate per gli esperimenti, suggerendo che non fossero associati ad un unico sistema integrina-ligando. [Volpi G. dati non pubblicati]

Ulteriori esperimenti dimostravano che il pathway delle Rho non era coinvolto nella produzione di questi effetti. [Volpi G. dati non pubblicati, 119, 120, 121, 122]

Recentemente è stato provato il ruolo di Rac1 e cdc42 nella distensione cellulare agendo sulle fibre di actina [123] e che l'espressione di dominanti negativi costitutivamente attivi di queste molecole promuove la capacità distensiva delle cellule [124]. Esperimenti di co-transfezione hanno evidenziato un possibile ruolo come Rac1-GAP e cdc42-GAP per SDP35, mentre XTP1 ha mostrato un'azione più selettiva come Rac1-GAP ed, inoltre, la sua funzione non era completamente abolita quando era compromessa la via di segnalazione di Rac. [Volpi G. dati non pubblicati]

Come già dimostrato per altre proteine GAP [125, 126, 72, 127, 128, 129], SDP35 e XTP1 potrebbero agire attraverso un meccanismo non convenzionale. Potrebbero agire per competizione sui siti di legame delle GTPase senza mostrare attività catalitica; Rac1 e cdc42 potrebbero essere target indiretti di queste due molecole; l'attività GAP delle due molecole potrebbe richiedere co-fattori non presenti nei test *in vitro*.

In recenti esperimenti, si è evidenziato che il dominio DEP di SDP35 da solo era capace di produrre gli stessi effetti sulla forma cellulare e l'ancoraggio al substrato della molecola intera e che la localizzazione nucleare di SDP35 era essenziale alla sua funzione. [Volpi G. dati non pubblicati]. [Fig. 17] In una recente classificazione, i domini DEP di SDP35 e XTP1 non sembrano clusterizzare con nessun dominio DEP conosciuto.[98]

Una pubblicazione molto recente ha identificato XTP1 come uno dei geni candidati di un pannello di geni la cui espressione correlerebbe con la formazione di metastasi e la cattiva prognosi in pazienti con cancro della mammella.[130, 131] In un altro lavoro riguardante il cancro della vescica, SDP35 è risultato sotto-espresso nel cluster I (il sottogruppo dei tumori a basso grado, raramente progressivi ed associati ad una prognosi altamente favorevole) ed over-espresso nel cluster III (il sottogruppo dei tumori ad alto grado, con rischio di progressione tumorale futura e di morte). [132] Dunque, SDP35 e XTP1 potrebbero svolgere un ruolo importante nell'acquisizione da parte delle cellule di un potenziale metastatico, contribuendo al distacco dal substrato ed eventualmente all'intra- ed extra-vasazione.

In studi preliminari, l'inoculazione contemporanea in topo di cellule di carcinoma mammario non metastatiche 67NR transfettate con SDP35 e non transfettate, ha prodotto masse tumorali composte dai due tipi di cellule dimostrando la capacità delle cellule over-esprimenti SDP35 di sopravvivere e partecipare alla formazione di neoplasie *in vivo*. Tuttavia, le cellule transfettate sembravano essersi replicate meno di quelle non transfettate. [Volpi G. dati non pubblicati] Questi risultati, se confermati su una casistica più ampia, sarebbero in disaccordo con dati recenti che mostrano un aumento dei livelli di XTP1 durante la fase G2/M del ciclo cellulare [131]. Si suggerirebbe quindi

un diverso comportamento per SDP35 e XTP1 durante le fasi del ciclo cellulare o che SDP35 agisca diversamente *in vivo* ed *in vitro*.

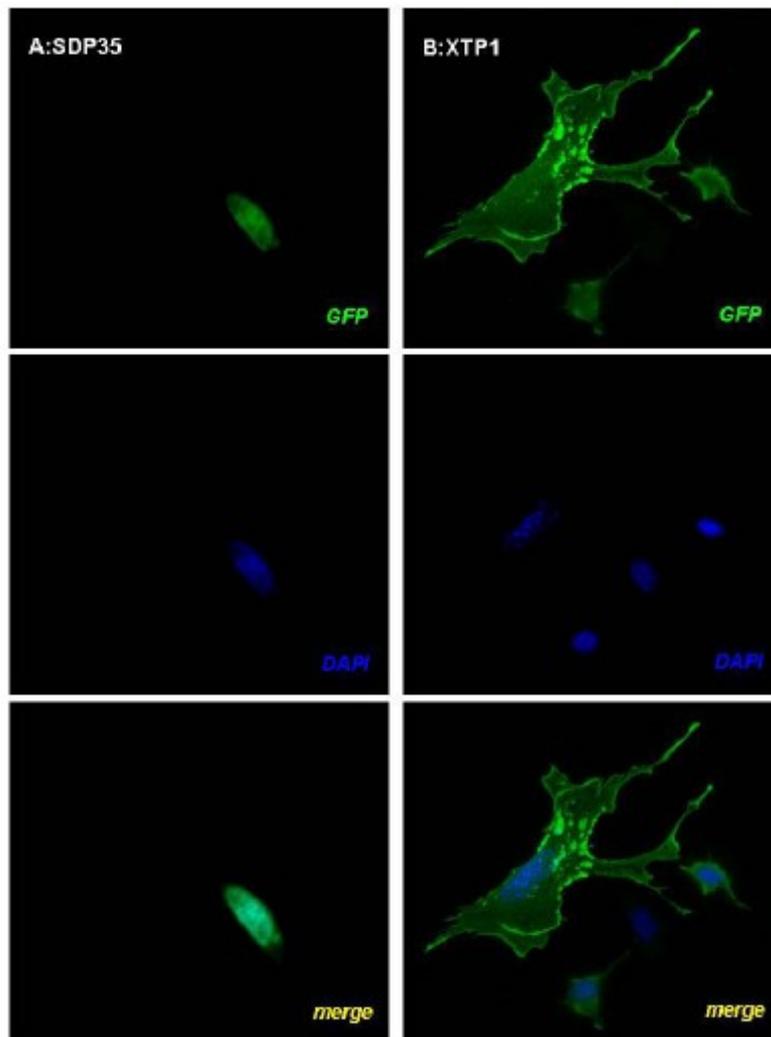


Figura 17
(da Volpi G. PhD tesis)
Localizzazione sub-cellulare delle proteine di fusione SDP35-GFP e XTP1-GFP. (A) Localizzazione nucleare di SDP35 overespresso in cellule NIH3T3. (B) Accumulo citoplasmatico ed alla membrana di XTP1.

Per altro, le cellule over-esprimenti SDP35 non mostravano capacità metastatica *in vivo*, suggerendo che SDP35 da solo non è in grado di conferire il fenotipo metastatico. Inoltre, le cellule transfettate isolate dalle masse tumorali subcutanee potevano essere mantenute in coltura senza un distacco apprezzabile dal substrato e non avevano acquisito maggiore capacità migratoria, diversamente da quanto osservato negli esperimenti con colture cellulari. [Volpi G. dati non pubblicati]

Rimane dunque da chiarire il significato funzionale di questi fenomeni. Bisognerà anche considerare meglio i rapporti tra conformazione del citoscheletro, motilità cellulare e formazione di metastasi.

1.5 - Apoptosi

Il termine “apoptosi” è stato coniato nel 1972 da Kerr e Searle a partire da una parola greca che indica la caduta dei petali o delle foglie.

L’apoptosi è quel processo in cui la cellula si frammenta mantenendo l’integrità della membrana plasmatica e quindi, contrariamente alla necrosi, senza dispersione del contenuto cellulare. I frammenti cellulari sono poi fagocitati da fagociti e da cellule circostanti senza conseguenze negative per il tessuto.

L’apoptosi è anche definita “morte cellulare programmata”. In effetti è un processo svolto attivamente dalla cellula con significato protettivo nei confronti del tessuto: contribuisce all’omeostasi numerica cellulare ed è il mezzo di auto-eliminazione delle cellule non correttamente differenziate o danneggiate. [133]

Numerosi sono gli stimoli in grado di attivare l’apoptosi e le funzioni da questa svolte:

- Nello sviluppo embrionale e fetale e nella metamorfosi l’apoptosi porta all’eliminazione di tutte le strutture che svolgono un proprio ruolo solo durante una data fase dello sviluppo ed ha un vero e proprio ruolo morfogenetico nello sviluppo del sistema nervoso.
- Il normale turn-over tissutale si avvale dell’apoptosi per l’eliminazione delle cellule usurate.
- L’apoptosi è molto importante nel sistema immunitario, sia nell’ontogenesi, sia nell’omeostasi, sia nel meccanismo dell’immunità cellulo-mediata.
- I fattori di crescita sono in quantità limitante e svolgono il ruolo di veri e propri fattori di sopravvivenza: molti tipi cellulari sembra abbiano insito un “programma di morte”, che solo la continua presenza di fattori di sopravvivenza impedisce di attuare. Nel corso della vita post-natale, questo meccanismo consente di adattare in modo molto rapido differenziamento e proliferazione di alcune cellule staminali al fabbisogno dell’organismo.
- Anche gli ormoni costituiscono fattori di sopravvivenza per alcuni tipi cellulari.

- Il contatto cellula-cellula e/o cellula-matrice extracellulare costituisce un fattore di sopravvivenza: alcune cellule, qualora si verifichi la mancanza di contatto, si auto-percepiscono come inutili o dannose ed attivano il meccanismo di apoptosi (in questo caso chiamata “anoikis”, dal greco “senza casa”).
- Danni al DNA o gravi stress al reticolo endoplasmatico o ai mitocondri (per esempio causati da farmaci, radicali liberi, radiazioni ionizzanti, ecc.), qualora superino una certa soglia, possono indurre la morte per apoptosi.
- Le infezioni virali fanno anch’esse scattare nella cellula un meccanismo che tende a indurre apoptosi, anche in questo caso per difendere l’organismo intero dalla propagazione virale.

Si possono distinguere 3 diverse fasi del processo apoptotico: 1) induzione; 2) esecuzione; 3) riconoscimento e fagocitosi.

La fase di induzione è una fase regolabile e reversibile in cui si susseguono stimoli contrastanti di sopravvivenza e di morte. Il processo apoptotico può determinarsi attraverso almeno 2 differenti pathways, una attivata da segnali di morte esogeni attraverso recettori di superficie (via recettoriale) ed una determinata da segnali endogeni e regolata dal mitocondrio (via mitocondriale). Entrambe le pathways convergono poi nell’attivazione di specifiche proteasi, le caspasi. [133]

Con l’evento proteolitico di attivazione della cascata delle caspasi inizia la fase di esecuzione. A questo seguono una serie preordinata di eventi proteolitici e nucleo litici che amplificano il segnale e conducono alle modificazioni morfologiche caratteristiche dell’apoptosi. Poiché in questa fase si ha dispendio energetico, l’eventuale carenza di ATP potrebbe condurre la cellula apoptotica alla necrosi per l’impossibilità di completare il processo.

Nella successiva fase di riconoscimento e fagocitosi la cellula (o i corpi apoptotici in cui essa si è frammentata) espone sulla sua superficie segnali detti “eat-me” che la rendono appetibile ed emette sostanze chemiotattiche per richiamare i macrofagi. Se, a questo punto, la cellula apoptotica non può essere fagocitata, come accade in vitro, essa va incontro a necrosi secondaria perché non riesce a mantenere le proprietà di impermeabilità della membrana. [133, 134, 135]

Il processo apoptotico si avvale di molecole specifiche, i cui geni sono altamente conservati. Questi geni sono in grado di dare risposte stereotipate a stimoli diversi e possono essere raggruppati nelle seguenti categorie [Fig. 18]:

- recettori di membrana (Fas/APO1/CD95, TNF, TRAIL)
- adattatori (FADD, APAF-1)
- effettori (caspasi, endonucleasi)
- modulatori (anti-apoptotici, come Bcl-2, pro-apoptotici come Bax)
- inibitori (CrmA, cFLIP, survivina)

- induttori (p53, c-myc, reaper)
- della fagocitosi (flippasi)

I recettori di membrana all'origine della via di segnalazione recettoriale sembrano trovarsi già assemblati in trimeri. Questi vengono attivati da ligandi che possono essere solubili oppure portati sulla superficie di cellule che entrano poi in contatto diretto con la cellula da avviare ad apoptosi. Il legame con il ligando provoca un cambiamento di conformazione nel dominio intracellulare del recettore, detto Death Domain (DD), che permette l'assemblaggio di un complesso formato da almeno un adattatore e da una pro-caspasi iniziatrice. I legami tra le molecole del complesso sono omeotipici: l'adattatore possiede un dominio DD per legare il recettore ed un dominio DED (Death Effector Domain) o CARD (CASPase Recruitment Domain) per legare la pro-caspasi. [133, 135]

Anche la via di segnalazione mitocondriale porta alla formazione di un complesso, denominato apoptosoma, costituito da un adattatore, APAF-1, una pro-caspasi iniziatrice, una molecola di citocromo C ed una di ATP o dATP. [133, 136]

Questi complessi sono capaci di attivare le pro-caspasi attraverso tagli proteolitici trasformandole in caspasi; le caspasi agiscono poi esse stesse come enzimi proteolitici nei confronti di altre procaspasi dando origine così ad una cascata di eventi che portano all'apoptosi.

Possiamo dunque distinguere due gruppi di caspasi: le iniziatrici (2, 8, 9, 10) e le effettrici (3, 6, 7). Queste ultime sono capaci di attivare l'endonucleasi CAD, responsabile della frammentazione del DNA tipica dell'apoptosi, bloccandone l'inibitore. Vengono invece inibite tutte le molecole che favoriscono la sopravvivenza cellulare. Il processo apoptotico infatti è il risultato dell'integrazione di più segnali di morte o di sopravvivenza a livello della membrana mitocondriale. Questa integrazione è mediata da molecole dette modulatori che appartengono tutte alla stessa famiglia ma possono essere pro- o anti-apoptotiche. Nei mammiferi i modulatori fanno tutti parte della famiglia di Bcl-2 ed interagiscono tra di loro attraverso i domini BH1, BH2, BH3 e BH4. Quando i membri pro-apoptotici della famiglia prevalgono si avrà la formazione di micropori a livello della membrana mitocondriale e di conseguenza la fuoriuscita di molecole pro-apoptotiche in grado di amplificare il segnale. Tuttavia, quale sia il ruolo esatto dei modulatori e le modalità con cui molecole anti-apoptotiche come Bcl-2 o BCL-X_L proteggono l'integrità della membrana mitocondriale e molecole pro-apoptotiche come Bax, Bak o Bid inducono l'apertura di megacanalini, non è ancora del tutto chiaro. [133, 136]

Le caspasi, sia quelle coinvolte nella risposta infiammatoria sia quelle caratteristiche dell'apoptosi, non devono però assolutamente attivarsi per eventi casuali, per cui sono di norma complessate con inibitori naturali, endogeni, che devono essere rimossi. Un ruolo particolare di protezione della cellula nei confronti dell'apoptosi è svolto da una importantissima classe di proteine, le proteine

dello stress termico (Heat Shock Proteins, HSP); alcuni tipi di HSP legano molecole come il citocromo C, l'APAF-1 o le caspasi, impedendone l'assemblarsi nell'apoptosoma. Esistono anche altre modalità di inibizione dell'apoptosi, che sono state riscontrate nelle cellule tumorali, le quali acquisiscono un vantaggio selettivo dall'incapacità di essere indotte all'apoptosi, e riescono così ad eludere gli effetti di farmaci e di trattamenti genotossici. Queste cellule codificano per recettori, adattatori o modulatori pro-apoptotici mutanti, che hanno perso uno dei domini di interazione, per cui non sono più in grado di esercitare il loro ruolo, ma competono con i rispettivi prodotti genici normali. Ad esempio, un adattatore mutante, RIP, ha solo il dominio DD, per cui si lega al recettore attivato dal segnale di morte ma non ne trasduce il messaggio perché non possiede alcun dominio DED o CARD che possa interagire con il corrispondente dominio di una caspasi iniziatrice. Queste molecole sono dette molecole esca perché ingannano il meccanismo di induzione dell'apoptosi. Dunque le molecole con funzione pro-apoptotica (come gli adattatori) possono considerarsi oncosoppressori, e infatti una loro mutazione con perdita di funzione promuove la sopravvivenza; viceversa, le molecole anti-apoptotiche, come Bcl-2, sono proto-oncogeni: infatti l'espressione eccessiva (guadagno di funzione) di Bcl-2 è associata a una leucemia linfoide. [133, 135, 136]

Un'altra categoria di molecole importante perché in grado di indurre apoptosi attraverso la via mitocondriale è quella degli induttori, i quali determinano uno sbilanciamento tra modulatori anti- e pro-apoptotici a favore dei secondi. Alcuni induttori si attivano quando la cellula percepisce uno scompenso tra i segnali di proliferazione ed il momento in cui tali segnali vengono inviati, come myc, altri quando la cellula non riesce a compiere correttamente le tappe del ciclo cellulare a causa di danni al DNA, come p53. Quest'ultima molecola è uno dei più importanti oncosoppressori. Essa viene attivata da danni al DNA, conseguenti a radiazioni ionizzanti o ad altri agenti mutageni, nonché dalla presenza di oncogeni virali. Trattandosi di un fattore di trascrizione, induce la sintesi di diverse proteine, la cui funzione è quella di inibire la progressione del ciclo cellulare finché il DNA è danneggiato. Tuttavia, se il danno persiste, il che si verifica in genere quando il danno è esteso o non riparabile, p53 induce la sintesi di un modulatore pro-apoptotico, Bax, che si localizza sulla membrana mitocondriale e favorisce l'apertura dei megacanalini. [133, 136]

Nel corso del processo apoptotico, una delle prime modificazioni della cellula coinvolge i fosfolipidi della membrana plasmatica: la fosfatidil-serina (PS), localizzata di norma nello strato citosolico, viene trasferita sullo strato esterno con un meccanismo di ribaltamento, "a flip-flop". Questo è sufficiente per additare la cellula ai macrofagi, che percepiscono l'esposizione della PS come un segnale di appetibilità (segnale "eat-me"). Alla PS si associano anche altre molecole normalmente citoplasmatiche, come l'annexina I, e probabilmente si hanno ulteriori alterazioni delle molecole di superficie, con variazioni che coinvolgono anche gli oligosaccaridi del

glicocalice. Tutte queste modificazioni sono percepite da monociti e macrofagi grazie ad una numerosa schiera di recettori di superficie, tra cui molecole di tipo lectinico (che legano glucidi). I fagociti sono richiamati da segnali chemiotattici, tra cui la lisofosfatidil-colina, rilasciati dalla cellula apoptotica. [133, 135]

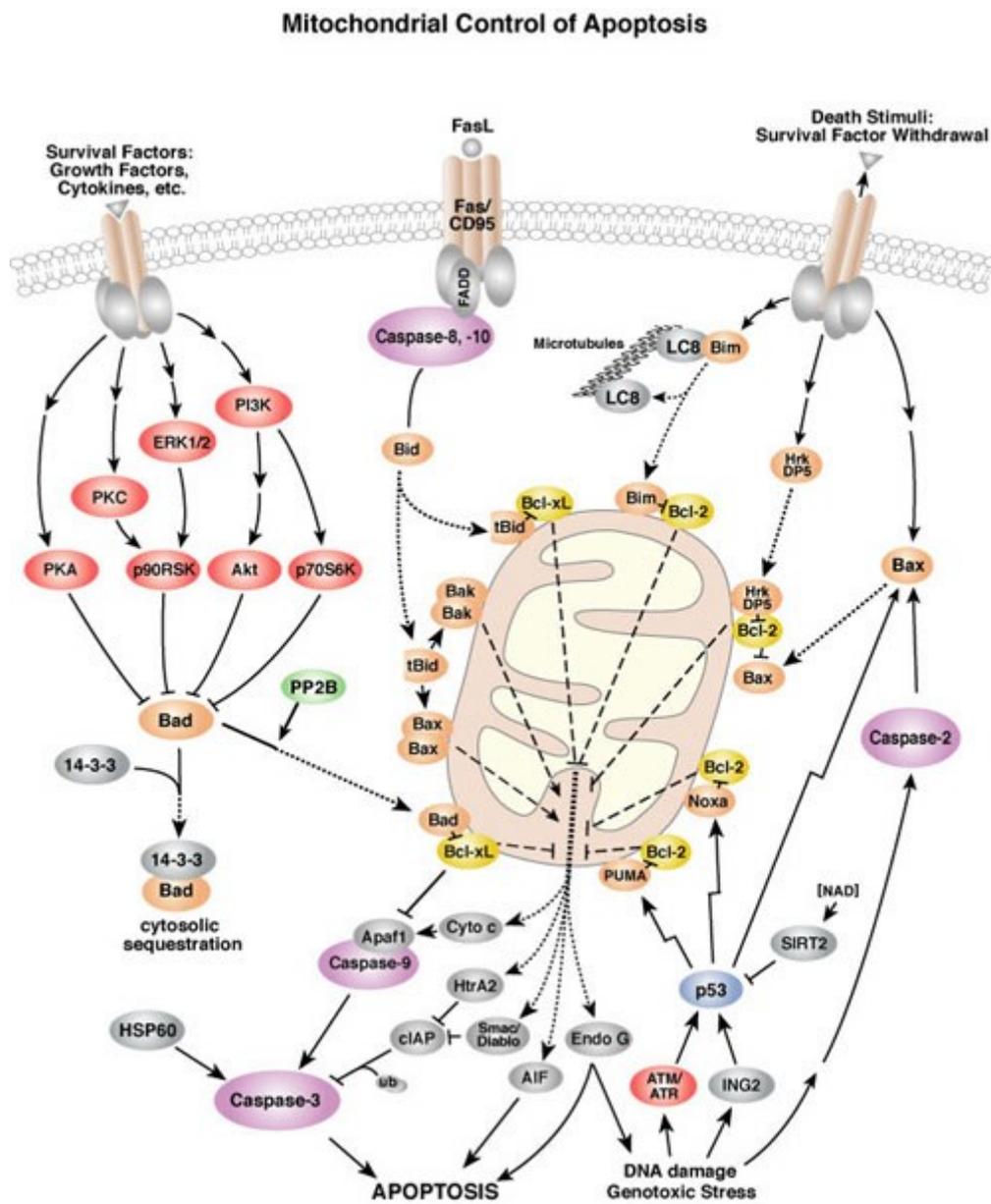


Figura 18
 Schema riassuntivo del processo apoptotico e delle interazioni molecolari coinvolte in esso.

1.6 - Adesione cellulare ed apoptosi: il meccanismo di anoikis

La normale omeostasi cellulare e tissutale è il risultato di un equilibrio dinamico tra proliferazione cellulare, differenziazione ed apoptosi. L'anoikis è il processo apoptotico attivato da contatti cellula-matrice inadeguati ed è responsabile del mantenimento del corretto numero cellulare nel tessuto epiteliale che è soggetto ad ingente turnover. Il ruolo fondamentale dell'anoikis è chiaramente evidenziato dal fatto che l'interruzione di questo meccanismo contribuisce all'evento neoplastico. [137]

L'anoikis è stata inizialmente riscontrata nelle cellule epiteliali, precursori della maggioranza delle neoplasie umane, ed in quelle endoteliali. Nei primi studi fu infatti dimostrato che l'espressione di alcuni oncogeni in cellule epiteliali normali conferiva resistenza all'anoikis. [138, 139] Studi successivi hanno confermato che la soppressione dell'anoikis contribuisce in maniera importante al fenotipo maligno nel carcinoma della mammella, del colon e dei polmoni. [140, 141, 142]

Ci si aspetta che il blocco dell'anoikis conferisca un vantaggio selettivo all'interno delle cellule epiteliali pre-cancerose, permettendo un maggior tempo di sopravvivenza in assenza di ancoraggio alla matrice e facilitando un'eventuale riadesione e colonizzazione di siti secondari. Alcuni studi hanno però evidenziato un secondo interessante vantaggio: la stimolazione con EGF (epidermal growth factor) nelle cellule di carcinoma dell'epidermide A431 [143] e nelle cellule di carcinoma mammario MDA-MB468 [144] induceva sia la progressione del ciclo cellulare sia l'arrotondamento cellulare, che induce anoikis. Questo suggerisce che i pathway di segnalazione dei fattori di crescita, quando eccessivamente stimolati, come spesso accade nelle cellule tumorali, possono causare modificazioni citoscheletriche in grado di attivare l'anoikis. Questo fenomeno potrebbe rappresentare una pressione selettiva forte ed immediata per le cellule a sviluppare resistenza all'anoikis, probabilmente attraverso l'attivazione di oncogeni. Inoltre, questi studi sottolineano l'importanza dell'interazione delle vie di segnalazione delle integrine e dei fattori di crescita al fine di produrre una risposta cellulare appropriata.

Anche se attraverso meccanismi differenti, la resistenza all'anoikis sembra comunque essere coinvolta anche nell'evoluzione di neoplasie non epiteliali come il melanoma [145, 146] ed il neuroblastoma [147], in cui la resistenza è conferita dalla de-differenziazione.

Diversi studi dimostrano che i geni che causano una transizione dal fenotipo epiteliale a quello mesenchimale conferiscono anche resistenza a varie forme di apoptosi, tra cui l'anoikis. Questi geni includono molecole di segnale, fattori di trascrizione e molecole di adesione cellula-cellula. L'annullamento della funzione del co-repressore CtBP, attraverso l'utilizzo della proteina

adenovirale E1a, induce la transizione dal fenotipo mesenchimale a quello epiteliale aumentando enormemente la sensibilità all'anoikis. [137]

Numerose molecole di segnalazione dei sistemi chinasi/fosfatasi sono implicate nell'anoikis come regolatori centrali. Poiché l'attivazione di ras previene l'anoikis [138] e le integrine possono stimolare vari aspetti del pathway di ras, le ricerche sul tema dell'anoikis si sono concentrate sui due maggiori effettori di ras, PI3K (phosphoinositide-3 kinase) e raf. [Fig. 19]

1.6.1 - Il pathway di segnalazione PI3K/Akt

Le prime tre molecole di segnalazione integrinica che sono state collegate alla sopravvivenza cellulare sono FAK (focal adhesion kinase), Shc e ILK (integrin-linked kinase). [148, 149, 150] Ognuna di queste proteine può intervenire nel pathway di PI3K/Akt, sebbene possano agire anche attraverso meccanismi differenti.

ILK interagisce con la porzione citoplasmatica delle sub-unità integriniche $\beta 1$ e $\beta 3$ ed è attivata in modo transitorio dall'adesione cellula-matrice o dalla stimolazione da parte di fattori di crescita. Se overespresso in linee cellulari, ILK attiva Akt sia direttamente che indirettamente. L'inattivazione della fosfatasi fosfolipidica PTEN, che spesso si verifica nelle linee cellulari di carcinoma prostatico, attiva costitutivamente sia ILK che Akt. La transfezione di un dominante negativo ILK in cellule di carcinoma prostatico prive di PTEN oppure il trattamento di queste cellule con un inibitore chimico specifico di ILK riduce la fosforilazione in serina473 di Akt e, di conseguenza, la sua attività chinasi. [151] Ciò implica che ILK sia un attivatore di Akt *in vivo*, come successivamente dimostrato. [152] L'overespressione di ILK è in grado di sopprimere l'anoikis anche in alcune linee cellulari epiteliali. [153]

Anche FAK può attivare Akt attraverso l'attivazione diretta di PI3K o indirettamente il pathway p130cas-crkII-DOCK180-rac. [154] Al momento si è dimostrato solo per FAK che regoli l'espressione degli inibitori delle caspasi appartenenti alla famiglia delle IAP (inhibitor of apoptosis), attraverso un meccanismo proposto che coinvolge l'attivazione da parte di PI3K/Akt della via di NF-kB. [155]

Sebbene Shc sia considerato un attivatore del pathway delle MAP chinasi attraverso grb2, studi più recenti lo indicano come un potente attivatore di PI3K/Akt. [156] In cellule ematopoietiche, Shc attivato recluta gab2 attraverso grb2; gab2, a sua volta, recluta la sub-unità regolatoria di PI3K, p85, portando all'attivazione di PI3K. [137]

I recettori per insulina ed IGF (insuline-like growth factor) sono i maggiori attivatori di Akt ed i loro ligandi sono fattori di sopravvivenza fondamentali in molti tipi cellulari. Alcuni studi hanno dimostrato che, sebbene gli IGFs proteggano dall'anoikis i fibroblasti embrionali di topo *serum-starved* [157] e le cellule di carcinoma prostatico LNCap [158], non sono in grado di inibire l'anoikis in cellule epiteliali della mammella, nonostante le cellule mammarie richiedano normalmente insulina per sopravvivere quando sono attaccate alla matrice extracellulare [159]. Quando cellule mammarie attaccate ad una matrice non permissiva di collagene, necessaria per la loro sopravvivenza, venivano stimulate con insulina, i recettori per l'insulina si dimostravano ancora capaci di auto-fosforilazione, ma non erano più in grado di fosforilare e reclutare l'adattatore IRS-1 o attivare a valle il segnale di sopravvivenza mediato da PI3K/Akt. [159] Dunque, in questo sistema cellulare, il legame delle integrine è un prerequisito per il segnale insulinico.

È interessante come in alcuni tipi cellulari EGFR e le integrine formino dei complessi dove si possono osservare numerose cross-attivazioni dei due tipi di recettori [160, 161]; segnalazioni disaccoppiate provenienti da fattori di crescita e recettori della matrice potrebbero deregolare la sopravvivenza cellulare attraverso la dissociazione del segnale dei fattori di crescita dalle alterazioni del citoscheletro. In questo contesto è possibile apprezzare la prevalenza dell'over-espressione di FAK, che previene l'anoikis, in linee cellulari di tumori umani. [162, 163]

Nel caso del recettore di PDGF (platelet derived growth factor), l'interazione tra recettore ed integrine è extracellulare, suggerendo una possibile cooperazione o competizione diretta fra molecole della matrice e fattori di crescita per il legame con il recettore. [164]

Nel sistema LNCap, i livelli di IGF risultano diminuire lentamente nel corso delle 16 ore successive al distacco cellulare, che è seguito immediatamente dall'anoikis. [158] Gli autori dello studio attribuirono questa anoikis alla riduzione di IGF. Inoltre, proposero che l'assenza di IGF desse inizio al declino dell'attività di Akt ed alla cascata di eventi successivi: attivazione di Gsk-3, degradazione della ciclina D, iperfosforilazione di Rb e conseguente repressione del promotore di IGF. Con il promotore di IGF represso le cellule sono condannate definitivamente ad anoikis. [158]

Determinare l'esatto ruolo di Akt nell'anoikis è complicato poiché Akt stesso è un target delle caspasi attivate. [165] Quindi la perdita di attività di Akt potrebbe essere una conseguenza e non una causa di anoikis. Akt fosforila regolatori dell'apoptosi, come la caspasi-9 e BAD [166], e fattori di trascrizione, come i Forkhead, i cui geni target programmano il fenotipo di sopravvivenza. Comunque, la sopravvivenza mediata da Akt probabilmente coinvolge nuovi substrati non ancora identificati di Akt e chinasi che hanno un'attività simile a quella di Akt. Akt è richiesta anche per l'attivazione di PAK (p21-activated kinase) da parte di ras [167]; quindi PAK stesso o qualche attivatore di PAK potrebbe essere un nuovo substrato critico di Akt. PAK, come Akt, può

fosforilare BAD ed ha effetti anti-apoptotici. [168, 169] I regolatori trascrizionali Forkhead sono substrato anche di una serie di chinasi Akt-correlate conosciute nel loro insieme come SGKs (serum- and glucocorticoid-inducible kinases). [170]

Uno studio interessante mostra come l'adesione alla fibronectina di transfettanti stabili CHO che esprimono l'integrina $\alpha_5\beta_1$ protegga dall'apoptosi in condizioni *serum starved*, mentre l'adesione alla vitronectina no. Questa protezione correla con i livelli di espressione di Bcl-2 e lo studio riporta che il promotore di Bcl-2 è regolato da molecole di segnalazione come FAK, Shc e Akt che potrebbero rispondere, in questo sistema, a specifiche integrine. [171]

1.6.2 - Il segnale mediato da raf-ERK

Esistono molte prove che implicano l'attivazione di ERK (extracellular signal-regulated kinase) nella progressione del ciclo cellulare e nella sopravvivenza. [172] È ormai stabilito con certezza che la funzione di raf-1 è critica per l'attivazione di ERK.

BAG-1 (Bcl-2-interacting protein) attiva la chinasi raf-1 e la dirige al mitocondrio, dove i suoi effetti sulla sopravvivenza sembrano aumentare. [173] BAG-1 interagisce anche con l'inibitore p53-inducibile del pathway ras-raf-MAP-kinase, Siah-1, e previene l'arresto della crescita da parte di Siah-1. [174]

Sebbene il meccanismo esatto dell'attivazione di raf-1 rimane incerto, si sa che i PAKs, che hanno un ruolo ben definito nella segnalazione integrinica, possono attivare raf-1 con la fosforilazione diretta in serina338. [175] L'attività di PAK può essere regolata sia dai fosfoinositidi che da PI3K. [176] Il legame delle integrine alla fibronectina può stimolare la fosforilazione di raf-1 in serina338 attraverso questo pathway. Questo potrebbe anche spiegare il coinvolgimento dei PAKs nella stimolazione dell'attività di ERK da parte delle integrine. [137]

L'induzione dell'espressione di TGF- α (transforming growth factor- α) è stato ipotizzato come meccanismo indiretto per la sopravvivenza mediata da raf. [177] In cellule epiteliali MCF10a è stato riscontrato un aumento significativo di TGF- α in risposta all'espressione di una proteina raf-1 tamoxifen-inducibile. L'apporto esogeno di questa citochina era sufficiente per sfuggire all'anoikis e l'inibizione del recettore per TGF- α con AG1478 abrogava il blocco dell'anoikis da parte di raf o TGF- α . È stato dimostrato anche il superamento dell'anoikis indotto da EGF in cheratinociti. [178] Poiché raf-1 può essere attivato dai recettori per EGF, questo dato implica un feedback positivo, che coinvolge raf e la stimolazione autocrina della crescita, che promuove la sopravvivenza cellulare.

Inoltre, il pathway di ERK è anche influenzato dallo stato del citoscheletro actinico. In cellule 3T3, sia il distacco che il trattamento di cellule in adesione con cytochalasin D è sufficiente per prevenire la traslocazione di ERK nel nucleo, in risposta alla stimolazione mitogenica. [179] È difficile conciliare la necessità di adesione per la traslocazione di ERK con la capacità di EGF di salvare le cellule in sospensione dall'anoikis; tuttavia la differenza dei tipi cellulari utilizzati in questi studi potrebbe essere importante.

Uno studio interessante riguarda il meccanismo attraverso il quale ras protegge le cellule intestinali di ratto RIE-1 dall'anoikis. [180] In questo lavoro sono stati usati domini effettori mutanti di ras per dimostrare che l'attivazione di solo uno tra PI3K, raf e RalGDS non era sufficiente per sfuggire all'anoikis, suggerendo che devono invece essere attivati pathway multipli. Diversi esperimenti indicavano che fosse richiesta l'attivazione di ERK, sebbene non fosse necessaria quella di Akt, per sfuggire all'anoikis e che sostanzialmente ras non attivava Akt in questa linea cellulare; l'inibizione del recettore di EGF non aveva effetto. Gli autori indicavano la mancanza di attivazione di Akt da parte di ras anche in un'altra linea cellulare epiteliale e l'assenza di effetti dell'eliminazione di ras sull'attivazione di Akt in cellule di carcinoma DLD1. È ancora una volta importante sottolineare l'importanza del contesto cellulare nei pathway di segnalazione che controllano l'anoikis.

1.6.3 - Jun N-terminal kinases: JNKs

Numerosi studi hanno suggerito un ruolo sia pro-apoptotico che anti-apoptotico per le JNKs. I primi risultati indicavano che il distacco dalla matrice delle cellule epiteliali induceva in modo forte e rapido l'attivazione delle JNKs, che potrebbero contribuire all'anoikis. [181] Studi successivi hanno supportato un ruolo pro-apoptotico sulla base dell'osservazione che fibroblasti di embrione di topo mancanti di JNK 1 e 2 erano resistenti all'apoptosi indotta da UV, anisomicina e danno al DNA. [182] Questi effetti erano legati al fallimento nel rilascio del citocromo c dal mitocondrio o nell'attivazione di Bid. È importante sottolineare che il processo di anoikis coinvolge anche il rilascio del citocromo c. [183]

Al contrario, Almeida e collaboratori hanno osservato che in fibroblasti *serum-starved* le JNKs venivano attivate in risposta all'adesione ad una matrice di fibronectina e non al distacco da questa. [184] In questi esperimenti l'attivazione di JNK veniva stimolata dalla cotransfezione di FAK che era accompagnata da un aumento della sopravvivenza. Quindi fu proposto un pathway di sopravvivenza a partire dalle integrine, attraverso FAK, fino a JNK. Alcuni risultati, infatti, suggeriscono che le JNKs siano normalmente coinvolte nella progressione del ciclo cellulare in

fibroblasti: cellule aderenti 3T3 mostrano un picco nell'attività delle JNKs in fase G1 del ciclo cellulare e la transfezione di un dominante negativo MKK4, che funge da regolatore positivo a monte dell'attività delle JNKs, causa l'arresto della crescita in fase G1 delle cellule 3T3. [185] In questo studio, l'attività di JNK veniva stimolata sia dall'adesione alla matrice (in cellule HUVEC, 3T3 e 293) sia da FAK (in cellule 293).

Chiaramente la regolazione di JNK è molto differente nei fibroblasti rispetto alle cellule epiteliali: nei fibroblasti, ma non nelle cellule epiteliali, ras stimola l'attività di JNK e la progressione del ciclo cellulare è inibita dal dominante negativo MKK4. Infatti l'anoikis sembra agire attraverso meccanismi differenti nei due tipi cellulari, poiché i fibroblasti devono essere privati dei fattori di crescita per rispondere al distacco dalla matrice. [137] Questo potrebbe riflettere le diverse circostanze nelle quali i fibroblasti e le cellule epiteliali devono trovarsi per andare incontro ad anoikis *in vivo*.

1.6.4 - Il citoscheletro

Le differenze evidenti tra le strutture citoscheletriche delle cellule adese rispetto a quelle sospese suggeriscono che il segnale di sopravvivenza nell'anoikis potrebbe essere largamente regolato dal citoscheletro. Esistono ormai evidenze certe che le molecole di segnalazione ed i regolatori dell'apoptosi siano associati al citoscheletro e quindi potrebbero insieme regolare l'anoikis agendo da sensori dell'integrità citoscheletrica. [137]

Ci sono numerosi collegamenti tra il citoscheletro ed il pathway di JNK. Primo, MKK4/SEK1 interagisce direttamente con la proteina citoscheletrica integrina-associata ABP280/filamina. [186] Cellule di melanoma mancanti di filamina sono refrattarie alla stimolazione di JNK ed il ripristino della filamina ripristina l'attività di JNK. Inoltre, la filamina è substrato delle caspasi ed il clivaggio della filamina potrebbe avere un ruolo nella regolazione delle JNKs. [187] Secondo, le JNKs potrebbero controllare il riarrangiamento citoscheletrico associandosi direttamente con la p150^{Spir}, un membro della famiglia dei WASP (effettori delle rho-like GTPases che regolano il citoscheletro actinico). [188] In esperimenti di transfezione, le due molecole collaborano nel causare riarrangiamenti citoscheletrici. Terzo, MLK2, una MAP Kinase Kinase Kinase che attiva JNK, è co-localizzato con JNK lungo i microtubuli ed associata con KIF3. [189]

Un'altra connessione con il citoscheletro coinvolge Bim e Bmf, due proteine pro-apoptotiche della famiglia della Bcl-2. [190, 191, 192] Bim normalmente sembra essere sequestrata da DLC1 (microtubule-associated dynein light chain 1). In seguito a trattamento con un agente in grado di

distruggere i microtubuli, Bim viene rilasciato ed interagisce direttamente con Bcl-2 e stimola il rilascio del citocromo c dal mitocondrio. Bmf è sequestrato da DLC2 (actin/miosin-associated dynein light chain 2) in cellule MCF7. La sospensione cellulare, il trattamento con cytochalasin e l'irradiazione UV possono indurre il rilascio di Bmf che può così legare Bcl-2. Il rilascio di Bim e Bmf è indipendente dall'attività caspatica, quindi queste proteine potrebbero regolare direttamente le fasi iniziali dell'apoptosi e dell'anoikis agendo da sensori dell'integrità del citoscheletro.

È interessante notare che fibroblasti isolati da topi cheratina-8^{-/-} sono circa 100 volte più sensibili alla morte indotta da TNF (tumor necrosis factor) rispetto alle cellule normali; in questo risultato sembra essere implicato un legame tra il recettore 2 di TNF e le citocheratine. [193]

Un'ultima connessione è quella con la plectina citoscheletrica, una proteina che forma legami con i microtubuli, i filamenti intermedi e l'actina. La maggior parte della pro-caspasi-8 è stata trovata associata con i mitocondri in cellule MCF7 non stimolate. La stimolazione dell'apoptosi da parte del ligando di FAS causava immediatamente la processazione della pro-caspasi-8 mitocondriale e successivamente la sub-unità attiva dell'enzima veniva traslocata e clivava la plectina. Inoltre, fibroblasti da embrioni di topo mancante di plectina mostravano un'attenuata riorganizzazione citoscheletrica in seguito a trattamento con ligando di FAS, indicando la degradazione della plectina come evento spartiacque. [194]

È stato dimostrato che la GTPase rac-1, la cui più importante funzione è il controllo del citoscheletro, conferisce resistenza all'anoikis nelle cellule MDCK. [195] La completa inibizione dell'attività della PI3K cellulare ripristina la sensibilità nelle cellule MDCK, suggerendo che rac protegge le cellule tramite l'attivazione del pathway PI3K/Akt. Non si possono però escludere altri effetti di rac sul citoscheletro. È noto che sia rac che cdc42 segnalano attraverso PAK ed è stato dimostrato che sono regolate dalla proteina chinasi A cAMP-dipendente (PKA) [196]. In cellule 3T3, il distacco dalla matrice attiva transitoriamente PKA. PKA attivato potrebbe fosforilare ed inattivare PAK, prevenendo la risposta delle MAPKs alla stimolazione da parte dei fattori di crescita. È interessante sottolineare che PKA è associata con la proteina citoscheletrica actinica ezrin [197], suggerendo una possibile integrazione tra il citoscheletro ed i sistemi del metabolismo e della morte cellulare.

1.6.5 - I death receptors

Una questione aperta nella ricerca sull'anoikis è come possa essere attivata inizialmente la cascata delle caspasi dal distacco cellulare. Un'ipotesi è che i death receptors si attivino o per auto-associazione o per interazione con ligandi death endogeni.

Alcuni risultati indicano che la molecola adattatrice dei death receptors, FADD, potrebbe essere coinvolta nell'anoikis, poiché un dominante negativo FADD troncato contenente soltanto il dominio death è in grado di inibire l'anoikis. [198, 199]

È stato riportato che l'anoikis in cellule HUVEC richiede l'interazione tra il death receptor endogeno FAS ed il suo ligando, FAS ligando. [200] In questo studio l'anoikis era inibita da anticorpi bloccanti FAS o FAS ligando e FAS era up-regolato ed associato con FADD dopo il distacco cellulare. Altri hanno tentato di replicare questo studio, ma i risultati sono stati in completo contrasto con i precedenti. [137]

Insomma, il ruolo dei death receptors nell'anoikis è ancora da stabilire. Un dato interessante è che, nelle cellule T, FAS è strettamente associato con la proteina citoscheletrica actinica ezrin, che è richiesta per la risposta del recettore al FAS ligando. Se questo fosse dimostrato in altri tipi cellulari, potrebbe rappresentare un nuovo meccanismo di controllo da parte del citoscheletro dei death receptors, positivo nelle cellule sospese o negativo in quelle adese.

Figura 19

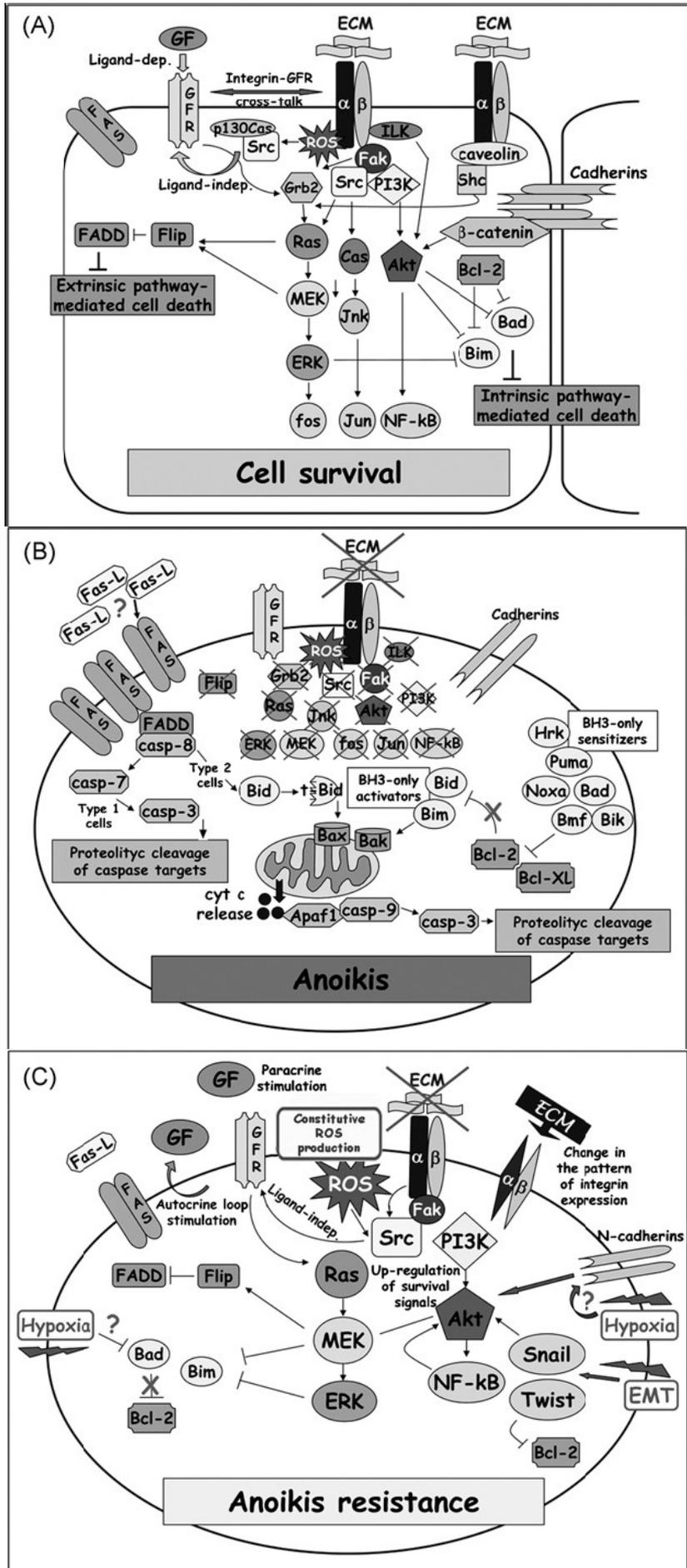
(da Chiarugi P. Bioch Pharm 2008, 76: 1352-1364)

Pathway di segnalazione attivati durante la sopravvivenza, l'anoikis e la resistenza all'anoikis.

(A) Il legame delle integrine alla matrice extracellulare attiva diverse vie di sopravvivenza che stimolano la trascrizione ed inibiscono le proteine pro-apoptotiche. I recettori dei fattori di crescita collaborano con le integrine nel promuovere la sopravvivenza ed anche segnali di contatto mediati dalle caderine sono in grado di stimolare le vie di sopravvivenza.

(B) La mancanza di contatto con la matrice extracellulare impedisce l'attivazione delle vie di sopravvivenza e l'inibizione di quelle apoptotiche dirigendo la cellula all'anoikis per via mitocondriale. Sembra che il pathway estrinseco sia anche attivato da un aumento di espressione del recettore Fas sulla superficie cellulare (la prossimità dei recettori ne provoca l'attivazione). Anche Fas-L risulta aumentato, ma non è chiaro se la sua presenza sia necessaria per l'attivazione di Fas durante l'anoikis.

(C) L'acquisizione della resistenza all'anoikis può avvenire attraverso diverse strategie che convergono sulla stimolazione della sopravvivenza e/o sulla inibizione del pathway apoptotico. Le cellule possono sfuggire all'anoikis acquisendo l'attivazione costitutiva dei pathway di sopravvivenza per esempio attraverso un loop generato da un fattore di crescita autocrino o la stimolazione paracrina da parte delle cellule vicine. Un'altra strategia è quella di cambiare il pattern di espressione delle integrine in modo da continuare a ricevere la corretta segnalazione di sopravvivenza. Anche la maggiore produzione costitutiva di ROS nelle cellule tumorali serve a superare l'anoikis attraverso l'attivazione dei recettori per i fattori di crescita in modo indipendente dal ligando; l'ipossia generata dai ROS produce la sotto-espressione dei fattori pro-apoptotici. La transizione da epiteliali a mesenchimali (EMT) è un'altra delle strategie per sfuggire all'anoikis.



1.6.6 - TrkB

TrkB è un recettore tirosina chiansi che ha come ligando principale il fattore neurotrofico cerebrale. Gioca un ruolo essenziale nello sviluppo e nella funzione del sistema nervoso, promuovendo, ad esempio, la sopravvivenza dei neuroni. [201]

Diversi studi hanno dimostrato, però, che questo recettore sia anche in grado di conferire la resistenza all'anoikis in molteplici tipi cellulari in diverse specie sia *in vitro* che *in vivo*. In particolare, TrkB protegge dall'anoikis mediata dall'attivazione del pathway PI3K/PKB e, curiosamente, non è in grado di bloccare l'anoikis stimolata attraverso altri meccanismi. Inoltre, uno studio recente ha dimostrato che, per la funzione anti-anoikis di TrkB, è fondamentale ed indispensabile l'attività chinastica della molecola, mentre è assolutamente irrilevante la presenza del dominio extracellulare di adesione. [201]

È interessante sottolineare che cellule esprimenti TrkB sono in grado di formare aggregati in sospensione *in vitro* e, quando trapiantate in topo, dimostrano capacità tumorigeniche, di invasione di vasi e tessuti e metastatiche. L'espressione di TrkB sembra legata, inoltre, a notevoli proprietà proliferative. [202]

Sulla base di questi risultati, TrkB è ormai considerato a tutti gli effetti un vero e proprio oncogene. Tuttavia, rimangono ancora da svelare i meccanismi attraverso cui questo recettore agisce per impedire l'anoikis e se possa rappresentare un promettente target per la terapia neoplastica.

2 - SCOPO DELLA TESI

I sarcomi delle parti molli sono un gruppo eterogeneo di tumori rari che insorgono in modo predominante nei tessuti originanti dal mesoderma embrionale. Questi tumori rappresentano una frazione inferiore all'1% di tutti i tumori negli adulti ed il 7-10% dei tumori nei bambini. Più del 95% sono benigni e fra i maligni i più frequenti sono l'istiocitoma fibroso, il liposarcoma, il rabdomiosarcoma, il sarcoma sinoviale, il leiomiosarcoma e lo schwannoma.

La rarità, la scarsa differenziazione e l'ampia varietà cellulare che caratterizzano questi tumori rendono difficoltosa la diagnosi basata sul quadro istologico ed anche la predizione della prognosi e della risposta alla terapia.

Questo studio, quindi, si propone di caratterizzare sei cellulari derivate da colture primarie di IFM e LMS primitivi e dalle loro metastasi polmonari nel tentativo di poterle utilizzare come modello rappresentativo del tumore negli approcci sperimentali. La caratterizzazione di queste colture sotto il profilo proliferativo, apoptotico e delle dinamiche di adesione ed invasività potrebbe fornire nuovi spunti per future ricerche, chiarire alcuni meccanismi molecolari ed identificare il ruolo biologico di nuovi possibili marcatori tumorali. In particolare, la possibilità di studiare l'assetto molecolare ed il comportamento *in vitro* di due cloni cellulari derivati da una stessa coltura di metastasi, uno dei quali cresce in sospensione e l'altro adeso, e confrontarli tra loro per individuare eventuali punti critici e molecole chiave implicati nel conferimento di un fenotipo più aggressivo, si presenta come un'opportunità interessante e promettente.

Questo studio lancia, inoltre, il tentativo di comprovare in esperimenti *ex vivo* la consistenza clinica e l'eventuale valore realmente prognostico di nuove interessanti molecole coinvolte nei meccanismi di metastatizzazione. Questo è stato possibile grazie all'ampia casistica di tessuto congelato ed incluso in paraffina, proveniente da pazienti con un lungo follow-up e completa documentazione clinica ed istologica, di cui dispone il Laboratorio di Ricerca Oncologica dello IOR.

Al momento i bersagli terapeutici utilizzati nei sarcomi coinvolgono recettori extracellulari, antigeni e proteine intracellulari come chinasi-ciclina dipendenti, tirosina-chinasi, serina-chinasi e fattori di trascrizione. La sfida attuale è quella di riconoscere i punti "critici" funzionalmente attivi, necessari e sufficienti per la sopravvivenza delle cellule tumorali.

La conoscenza del profilo d'espressione a livello sia di RNA sia di proteine, oltre che il cariotipo, appare, quindi, necessaria ad una più precisa caratterizzazione degli istotipi dei sarcomi delle parti

molli. Inoltre soltanto lo studio combinato dei geni e della loro espressione, intesa come insieme di processi cellulari, porterà al riconoscimento di molecole essenziali nella progressione maligna dei sarcomi, utili non solo alla prognosi, ma anche allo sviluppo di terapie bersaglio ed al loro monitoraggio.

3 - MATERIALI E METODI

3.1 - Linee cellulari

Si disponeva per lo studio di sei linee cellulari da sarcomi delle parti molli. Discriminando per istotipo, si avevano tre linee cellulari di Istiocitoma Fibroso Maligno e tre di Leiomioma. Per ogni istotipo si disponeva di cellule provenienti da tumore primario e cellule provenienti da metastasi polmonari. Le cellule di metastasi erano rappresentate da due linee (due cloni) per ogni istotipo, derivate da un'unica linea cellulare originaria e differenziate per la diversa capacità di crescere in adesione o in sospensione.

Riassumendo, le linee cellulari usate erano: 118485, cellule di Istiocitoma Fibroso Maligno primario; 98337/A, cellule di metastasi polmonare di IFM in adesione; 98337/B, cellule di metastasi polmonare di IFM in sospensione; 121397, cellule di Leiomioma primario; 112634/A, cellule di metastasi di LMS in adesione; 112634/B, cellule di metastasi di LMS in sospensione. [Tab. 1]

Linee cellulari	Tumore d'origine
118485	Istiocitoma Fibroso Maligno primario
98337/A	Metastasi polmonare da IFM in adesione
98337/B	Metastasi polmonare da IFM in sospensione
121397	Leiomioma primario
112634/A	Metastasi polmonare da LMS in adesione
112634/B	Metastasi polmonare da LMS in sospensione

Tabella 1

Elenco delle linee cellulari utilizzate nello studio: codice identificativo e tessuto tumorale d'origine di ogni linea.

3.2 - Casistica tessuti

Lo studio è stato condotto su 38 campioni, provenienti da pazienti affetti da Istiocitoma Fibroso Maligno (16 casi) e Leiomiomasarcoma dell'apparato muscolo-scheletrico (22 casi), ricoverati presso gli Istituti Ortopedici Rizzoli di Bologna [Tab. 2].

Di tutti i pazienti si disponeva di materiale istologico e di completi dati clinici. Tutti i pazienti erano affetti da neoplasie a grado istologico IV e, per quanto riguarda i pazienti IFM, 6 presentavano il sottotipo mixoide e 10 quello storiforme pleomorfo. 28 casi su 38 avevano sviluppato metastasi.

Sono stati inoltre analizzati 14 metastasi [Tab. 3] e 17 tessuti sani adiacenti al tumore [Tab. 4].

Al momento del prelievo istologico i pazienti esaminati non erano stati sottoposti a nessun tipo di terapia pre-operatoria (radioterapia o chemioterapia) e presentavano tumori primitivi di dimensioni maggiori ai 5 cm.

L'età dei soggetti considerati andava dai 16 agli 85 anni, con un età mediana alla diagnosi di 60 anni.

Il follow-up clinico e' stato calcolato considerando il tempo alle metastasi, la sopravvivenza libera da malattia e la sopravvivenza totale; queste ultime sono state calcolate dalla data di diagnosi all'esito finale o all'ultimo giorno di follow-up.

10 pazienti erano liberi da malattia e 28 presentavano metastasi durante il follow-up.

Il follow-up clinico andava da un minimo di 3 mesi ad un massimo di 120 mesi, con una media di 44,289.

I pazienti liberi da malattia presentavano un follow-up minimo di 2 anni.

Per tutti i campioni, si disponeva del tessuto operatorio neoplastico fresco, conservato a -80°C e del corrispettivo pezzo fissato in formalina e incluso in paraffina.

Caso n°	Metastasi	Età	Genere	Sede	TIPO	Diagnosi	Esito malattia
1	*	72	M	COSCIA	PRI	IFM V MIXOIDE GR 4	dod
2		54	M	GAMBA	PRI	IFM V MIXOIDE GR 4	ned
3		63	M	COSCIA	PRI	IFM V MIXOIDE GR 4	ned

4	*	61	M	SCAPOLA	PRI	IFM V MIXOIDE GR 4	awd
5	*	73	F	COSCIA	PRI	IFM V MIXOIDE GR 4	ned
6	*	54	F	COSCIA	PRI	IFM V MIXOIDE GR 4	dod
7	*	64	M	COSCIA	PRI	IFM V STOR PLEOM GR 4	dod
8		62	M	BRACCIO	PRI	IFM V STOR PLEOM GR 4	ned
9		38	M	COSCIA	PRI	IFM V STOR PLEOM GR 4	ned
10		85	F	COSCIA	PRI	IFM V STOR PLEOM GR 4	dod
11		67	F	CINGOLO PELVICO	PRI	IFM V STOR PLEOM GR 4	dod
12	*	72	F	GAMBA	PRI	IFM V STOR PLEOM GR 4	dod
13		76	F	COSCIA	PRI	IFM V STOR PLEOM GR 4	dod
14	*	38	M	COSCIA	PRI	IFM V STOR PLEOM GR 4	dod
15	*	62	M	CINGOLO PELVICO	PRI	IFM V STOR PLEOM GR 4	ned
16	*	66	F	COSCIA	PRI	IFM V STOR PLEOM GR 4	dod
17	*	71	M	COSCIA	PRI	LEIOMIOSARCOMA	dod
18	*	57	M	AVAMBRACCIO	PRI	LEIOMIOSARCOMA	awd
19	*	63	M	BRACCIO	PRI	LEIOMIOSARCOMA	dod
20	*	76	F	COSCIA	PRI	LEIOMIOSARCOMA	dod
21	*	34	M	COSCIA	PRI	LEIOMIOSARCOMA	dod
22	*	62	M	COSCIA	PRI	LEIOMIOSARCOMA	dod
23	*	66	M	AVAMBRACCIO	PRI	LEIOMIOSARCOMA	awd
24	*	34	M	DORSO LOMBARE	PRI	LEIOMIOSARCOMA	dod
25	*	55	M	COSCIA	PRI	LEIOMIOSARCOMA	dod
26		78	M	GAMBA	PRI	LEIOMIOSARCOMA	ned
27		38	M	GAMBA	PRI	LEIOMIOSARCOMA	ned
28	*	61	F	COSCIA	PRI	LEIOMIOSARCOMA	dod
29	*	43	M	COSCIA	PRI	LEIOMIOSARCOMA	ned
30	*	52	M	COSCIA	PRI	LEIOMIOSARCOMA	dod
31		79	F	COSCIA	PRI	LEIOMIOSARCOMA	ned
32	*	57	F	COSCIA	PRI	LEIOMIOSARCOMA	dod
33	*	76	M	COSCIA	PRI	LEIOMIOSARCOMA	dod
34	*	66	F	CAVO POPLITEO	PRI	LEIOMIOSARCOMA	dod
35	*	74	F	COSCIA	PRI	LEIOMIOSARCOMA	dod
36	*	42	F	COSCIA	PRI	LEIOMIOSARCOMA	dod
37	*	71	F	GAMBA	PRI	LEIOMIOSARCOMA	ned
38	*	16	M	FEMORE	PRI	LEIOMIOSARCOMA	awd

Tabella 2

Casistica dei tessuti di tumore primario di IFM e LMS e dati clinici: “dod” = morto per malattia; “ned” = libero da malattia; “awd” = vivo con malattia; il simbolo * indica i pazienti che hanno sviluppato metastasi durante il follow-up.

Caso metastasi n°	Diagnosi
1	metastasi polmonare da IFM GR.4
2	metastasi polmonare da IFM GR.4
3	metastasi polmonare da IFM GR.4
4	metastasi polmonare da IFM GR.4

5	metastasi polmonare da IFM GR.4
6	metastasi polmonare da IFM GR.4
7	metastasi linfoghiandolare da IFM GR.4
8	metastasi linfoghiandolare da IFM GR.4
9	metastasi polmonare da LEIOMIOSARCOMA
10	metastasi polmonare da LEIOMIOSARCOMA
11	metastasi ossea da LEIOMIOSARCOMA
12	metastasi delle parti molli da LEIOMIOSARCOMA
13	metastasi linfoghiandolare da LEIOMIOSARCOMA
14	metastasi delle parti molli da LEIOMIOSARCOMA

Tabella 3

Casistica dei tessuti di metastasi di IFM e LMS.

Caso sano n°	Diagnosi
1	Sano di IFM
2	Sano di IFM
3	Sano di IFM
4	Sano di IFM
5	Sano di IFM
6	Sano di IFM
7	Sano di IFM
8	Sano di LMS
9	Sano di LMS
10	Sano di LMS
11	Sano di LMS
12	Sano di LMS
13	Sano di LMS
14	Sano di LMS
15	Sano di LMS
16	Sano di LMS
17	Sano di LMS

Tabella 4

Casistica dei tessuti sani: il tessuto è stato prelevato in sede adiacente al tumore.

Le curve di sopravvivenza di 38 pazienti mostravano una sopravvivenza libera da malattia del 26,3% ed una sopravvivenza totale del 39,4%.

Una differenza significativa e' stata riscontrata tra i due sottotipi istologici, IFM e LEIO, in termini di sopravvivenza libera da malattia (37,5% e 18,1% rispettivamente, $p = 0,01$) [Fig. 20-A], mentre il Test di Breslow non e' risultato essere significativo per la sopravvivenza totale (50% e 32% rispettivamente, $p = 0,06$) [Fig. 20-B].

9 casi su 11 con metastasi erano leiomiiosarcomi e in entrambi i sottotipi la maggior parte delle metastasi sono comparse entro il terzo anno.

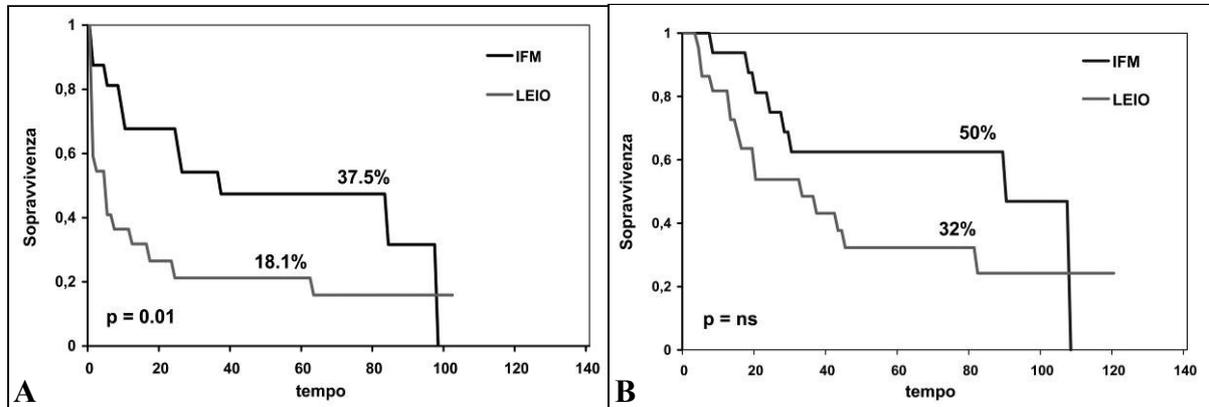


Figura 20
 Sopravvivenza libera da malattia in IFM e LMS (A); sopravvivenza totale in IFM e LMS (B).

3.3 - MTT test

L'indice proliferativo delle colture primarie selezionate è stato valutato con il saggio dell'MTT in piastra da 96 pozzetti. Per ogni pozzetto sono state seminate 10^3 cellule in 1ml di terreno di coltura. I valori di assorbanza rilevati dal lettore ELISA sono direttamente proporzionali alla proliferazione del campione in oggetto. Per ogni linea cellulare è stato stimato l'indice proliferativo in mezzo di coltura addizionato con fattori stimolanti (EGF, PDGF) vs mezzo di coltura "serum free".

3.4 - Saggio di adesione cellulare

Il saggio di adesione cellulare è stato effettuato seminando 10^4 cellule per pozzetto in piastre da 96 pozzetti coattati alternativamente con fibronectina, vitronectina, laminina, collagene tipo I, collagene tipo IV e, come controllo negativo, BSA. Dopo un'incubazione di 1h a 37°C in atmosfera umidificata con CO_2 5%, i pozzetti sono stati lavati 3 volte con 200 μl di PBS contenente $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. In ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μl di una soluzione di crystal violet 0,2% in etanolo 10% e, dopo un'incubazione di 5' a temperatura ambiente, il colorante è stato rimosso. Ogni pozzetto è stato lavato 4 volte con 300 μl di PBS. Sono stati quindi aggiunti ad ogni pozzetto 100 μl di Solubilization Buffer (una miscela 1:1 di NaH_2PO_4 0,1M pH4,5 ed etanolo 50%) ed è stata eseguita un'incubazione di 5' in agitazione a temperatura ambiente per assicurare la completa solubilizzazione del colorante legato alle cellule. L'assorbanza è stata determinata a 550nm con un lettore per micropiastre.

3.5 - Saggio di invasività cellulare

La capacità di invasione delle linee cellulari in studio è stata valutata seminando 3×10^5 cellule in medium serum-free in piccoli cestelli il cui fondo era costituito da una membrana semipermeabile coattata sul lato interno con ECM-gel. Questi cestelli sono stati posizionati in piastre da 24 pozzetti in cui era stato messo medium addizionato con FCS 10% ed incubate per 48h a 37°C in atmosfera umidificata con CO_2 5%. I cestelli sono stati quindi ripuliti accuratamente nella parte interna, posti in soluzione colorante per 20' e successivamente lavati in acqua distillata. Le cellule in grado di invadere il gel ed oltrepassare la membrana erano a questo punto colorate. E' stato dunque dissolto il colorante trattenuto dalle cellule di ogni cestello con 200 μl di una soluzione di acido acetico 10% in acqua ed è stato trasferito in un pozzetto di una piastra da 96 pozzetti. L'assorbanza è stata determinata a 550nm con un lettore per micropiastre.

3.6 - Estrazione di RNA

L'estrazione è stata effettuata da pellets cellulari delle 3 colture primarie oggetto di studio anche nel precedente anno.

E' stato utilizzato il TRIzol Reagent (Invitrogen), una soluzione monofasica costituita da fenolo e guanidina tiocianato. I pellets cellulari sono stati immersi in un opportuno volume di TRIzol Reagent. Tutto il materiale insolubile è stato separato dalla soluzione mediante centrifugazione e il sovrinatante è stato trasferito in una provetta pulita. Ad ogni campione sono stati aggiunti 200µl di cloroformio per ml di TRIzol. Dopo agitazione meccanica, l'emulsione è stata incubata brevemente a temperatura ambiente. I campioni sono stati centrifugati a 12000rpm per 15' a 4°C e la fase inorganica contenente l'RNA è stata recuperata. L'RNA è stato fatto precipitare con 500µl di etanolo per ml di TRIzol Reagent usato. I campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 10' e poi centrifugati a 12000rpm per 15' a 4°C. Dopo aver rimosso il sovrinatante, il sedimento di RNA è stato lavato con 800µl di etanolo al 75% per ml di TRIzol, agitato meccanicamente per pochi secondi e centrifugato a 10000rpm per 5' a 4°C. Alla fine della procedura l'etanolo è stato rimosso, il sedimento di RNA è stato fatto asciugare all'aria sotto cappa chimica e risospeso in un opportuno volume di RNAssecure reagent (Ambion). La concentrazione dell'RNA è stata determinata misurando l'assorbanza a 260nm allo spettrofotometro. Per la successiva analisi quantitativa si sono scelti campioni caratterizzati da un rapporto $A_{260}/A_{280} \cong 1.6$.

Per verificare l'assenza di eventuali contaminazioni da DNA genomico e l'integrità dell'RNA, è stata eseguita un'elettroforesi su gel di agarosio all' 1% in TBE 1X.

3.7 - Retrotrascrizione

Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 400ng di RNA estratto diluiti in 50µl di RNasi free water (Quiagen). Per la retrotrascrizione è stato utilizzato l'*High Capacity cDNA Archive kit* (Applied Biosystem, PE).

I 100µl di miscela di reazione contenevano: 400ng di RNA, acqua "RNasi free", tampone di retrotrascrizione 1X, miscela di deossinucleotidi trifosfato 1X, random primer 1X, Multiscribe

trascrittasi inversa 2.5 U/ μ l, inibitore delle RNasi 0.4 U/ μ l. La reazione è avvenuta nel “Thermal Cycler 2004” (Perkin-Elmer) sotto le seguenti condizioni:

- 25°C per 10’,
- 37°C per 120’.
- 4 ° C ∞

3.8 - Real Time PCR

L’espressione dei geni *UPA*, *UPAR*, *PAI-1*, *NG2*, *COLVI*, *XTP1* e *SDP35* è stata normalizzata all’espressione del gene costitutivamente espresso *GAPDH* e per tutti i campioni è stato scelto come calibratore un pool di linfociti sani.

Per l’amplificazione delle sequenze bersaglio sono stati utilizzati dei prodotti specifici per l’analisi quantitativa chiamati *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystem, PE). Il prodotto consiste in una miscela per la PCR contenente i *primers* ed una sonda del tipo *TaqMan*, specifiche per la sequenza di interesse (gene bersaglio o gene di riferimento endogeno) e presenti alla concentrazione ottimale per ottenere la massima efficienza di reazione.

Per ciascuno dei geni la reazione di amplificazione è stata condotta in duplicato. I 25 μ l di reazione contenevano: 1.25 μ l *Target Assay Mix 20X* o *Endogenous Control Assay Mix 20X*, 25ng di cDNA diluiti in 11.25 μ l di *RNase free water* (Qiagen), 12.5 μ l di *Taq Man Universal Master Mix (AmpliTaQ Gold DNA polimerasi, AmpErase UNG, deossinucleotidi trifosfato, fluorocromo di riferimento passivo, tampone di PCR ottimizzato) 2X* (Applied Biosystem). La reazione è avvenuta sotto le seguenti condizioni:

- 2’ a 50°C (attivazione dell’enzima UNG);
- 10’ a 95°C (attivazione della polimerasi);
- 15’’ a 95°C (denaturazione);
- 1’ a 60°C (allineamento ed estensione).

Sono stati impostati 45 cicli di reazione.

La PCR *Real Time* è stata eseguita utilizzando la macchina ABI PRISM[®] 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystem). Lo strumento combina un *thermal cycler* che ospita una piastra a 96 o 384 pozzetti, un laser per l’eccitazione della fluorescenza e la rivelazione del segnale tramite un

programma che acquisisce automaticamente il segnale e calcola la specifica fluorescenza rilasciata durante la fase esponenziale. L'emissione della fluorescenza (compresa fra 520nm e 620nm) è monitorata da una camera CCD (*charge coupled device*) ogni 7'' durante l'intero processo di PCR.

Per l'analisi di espressione dei geni coinvolti nei meccanismi di apoptosi sono stati utilizzati i SuperArray (Bioscience Corporation) seguendo il protocollo del kit.

Per la valutazione è stato utilizzato il metodo comparativo del $2^{-\Delta\Delta CT}$ dove:

$$\Delta CT_{\text{calibratore}} = CT(\text{gene}) - CT(\text{reference})$$

$$\Delta CT_{\text{campione}} = CT(\text{gene}) - CT(\text{reference})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{campione}) - \Delta CT(\text{calibratore})$$

3.9 - Saggio citofluorimetrico dell'Annessina V-FITC e Propidio

Ioduro

10^5 cellule per ogni linea sono state seminate in piastre da 6 pozzetti. Dopo 48h le cellule sono state prelevate da ogni pozzetto e diluite in PBS. Le cellule sono state poi centrifugate e risospese in 100 μ l di binding buffer (10mM HEPES, 140mM NaCl, 2,5mM CaCl₂, pH 7,40). Successivamente sono stati aggiunti 5 μ l di Annessina V-FITC e 5 μ l di Propidio Ioduro alla concentrazione di 1mg/ml. Dopo un'incubazione di 15' a temperatura ambiente la soluzione è stata portata a volume di 0,2ml con binding buffer e letta al citofluorimetro.

3.10 - Immunocitochimica

Le cellule sono state seminate su vetrini lasciate aderire ed incubate (37°C, CO₂ 5%) in terreno di coltura. I vetrini sono stati successivamente fissati in una soluzione acetone 70% - metanolo 30% e sono stati sottoposti ad immunocitochimica utilizzando il kit DakoCytomation LSAB+ System-AP

seguendo fedelmente le istruzioni del kit per l'anticorpo primario Anti-TrkB (H-181): sc-8316 (diluito 1:100, Santa Cruz Biotechnology). Per visualizzare la reazione antigenica con l'anticorpo primario Anti-Human Ki-67 Antigen Clone MIB-1 (diluito 1:75, DakoCytomation) è stato utilizzato un sistema di rivelazione che utilizza la diaminobenzidina (DAB). In entrambi i casi i nuclei sono stati contrastati con ematossilina.

3.11 - Immunoistochimica

L'analisi immunoistochimica è stata effettuata su tutte le 14 metastasi, mentre, per quanto riguarda i tumori primitivi, ne sono risultati valutabili solo 14 su 38, a causa di materiale insufficiente.

Per valutare l'espressione proteica, dai campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina sono state ottenute mediante il microtomo sezioni dello spessore di 5µm. Le sezioni sono state successivamente deparaffinate in xilene e reidratate mediante successivi passaggi in etanolo 100%, 95% e 70%, ed infine in acqua distillata. Sono state poi sottoposte ad un trattamento con una soluzione di H₂O₂ per 5 minuti a temperatura ambiente allo scopo di bloccare le perossidasi endogene. Per limitare le eventuali aspecificità di reazione, è stato applicato per 15 minuti il siero intero, non immune, della stessa specie dell'anticorpo secondario. Le sezioni sono state poi incubate per tutta la notte a 4°C con i seguenti anticorpi primari:

- RaNG2/D2 rabbit, diluizione 1:30 (gentilmente concesso dal Prof. Perris dell'Università di Parma);
- Collagen Type VI (α3 Chain) NCL-COLL-VI, NOVOCASTRA, diluizione 1:25.

Dopo i lavaggi con il tampone Fosfato (PBS) le sezioni sono state incubate con l'antisiero secondario diretto contro le IgG dell'antisiero primario, per 30 minuti a temperatura ambiente, e con i complessi streptoavidina-biotina perossidasi. Lo sviluppo è stato effettuato con una soluzione di 3-amino-9-etil-carbazolo al 100% in N-N-Dimetilformamide seguito dal contrasto nucleare con ematossilina e dal montaggio in soluzione acquosa. E' stato utilizzato un controllo positivo e negativo per ogni antigene studiato. I negativi sono stati trattati in modo da poter omettere l'anticorpo primario.

Il carcinoma umano alla mammella è stato usato come controllo positivo.

La positività della reazione immunoistochimica è stata valutata come negativa o minima (meno del 10% di cellule positive), debole (10 – 25%), moderata (26 – 50%), forte (>51%).

3.12 - Microscopia elettronica a trasmissione

Le cellule staccate dalle fiasche sono sospese in terreno e centrifugate (1000rpm, 8') per ottenere pellets. I campioni sono stati quindi fissati in glutaraldeide 2,5% in tampone cacodilato 0,1M, 2h a +4°C, postfissati in osmio 1% in tampone cacodilato 0,1M, 1h temperatura ambiente, disidratati con una serie graduata di alcool ed in ossido di propilene ed infine inclusi in resina epossidica.

Le sezioni semifini e fini sono state ottenute all'ultramicrotomo Reichert Ultracut S (Leica.) Queste ultime dopo colorazione con acetato di uranile e citrato di piombo sono state osservate al microscopio elettronico a trasmissione Philips 400T.

3.13 - Microscopia elettronica a scansione

Dopo 24h i vetrini coprioggetto sono stati lavati in PBS e le cellule fissate in glutaraldeide 1% in tampone cacodilato 0,1M per 20' a +4°C ed in osmio 1% in tampone cacodilato 0,1M. In seguito sono state disidratate tramite una serie graduata di alcool e passaggio in critical point drying, ricoperte di film di oro con metodica di sputtering.

3.14 - Immunofluorescenza

Le cellule, adese ai coprioggetto, sono state lavate dal terreno di coltura con PBS 1X, fissate in metanolo a -20°C per 7' e nuovamente lavate in PBS 1X.

In seguito sono state incubate prima in BSA (3% in PBS 1X) per 30' a temperatura ambiente e poi negli anticorpi primari:

- Integrin alpha 1 (CD49a)-mAb-clone:FB12 (Chemicon, diluito 1:50)
- Integrin alpha 2 (CD49b)-mAb-clone:P1E6 (Chemicon, diluito 1:5)
- Integrin alpha 3 A (CD49c) Cytoplasmic Domain-mAb-clone:29A3 (Chemicon, diluito 1:50)
- Integrin alpha 4 (CD49d)-mAb-clone:P1H4 (Chemicon, diluito 1:5)
- Integrin alpha 5 (CD49e)-mAb-clone:SAM-1 (Chemicon, diluito 1:50)
- Integrin alpha 6 A (CD49f)-mAb-clone:1A10 (Chemicon, diluito 1:5)
- Integrin alpha V (CD51)-mAb-clone:P3G8 (Chemicon, diluito 1:100)
- Integrin beta 1 (CD29)-mAb-clone:P4G11 (Chemicon, diluito 1:50)

Infine sono state incubate nell'anticorpo secondario-FITC Polyclonal Rabbit anti-Mouse F0313 (1:100 in PBS-BSA, Dako).

Su alcune sezioni di tessuto di IFM e LMS è stata inoltre condotta l'immunofluorescenza con doppia colorazione per valutare la co-localizzazione, mediante l'uso di:

- Ig di coniglio legate alla Rodamina (diluito 1:40) per l'anticorpo anti-rabbit NG2;
- Ig di topo legate alla Fluoresceina (diluito 1:25) per l'anticorpo anti-mouse del Collagene VI.

Le sezioni sono state incubate per 1 ora prima dell'osservazione al microscopio a fluorescenza; in seguito è stata effettuata colorazione a contrasto con il Dapi IV (4,6 diamidino-2-penylindole).

Tutti i campioni sono stati osservati al microscopio ottico Nikon Eclips E600.

Acquisizione immagini 100x originale con programma NIS-elements, esposizione 2s.

3.15 - Estrazione proteica

Pellets di ogni linea cellulare sono stati processati per l'estrazione proteica incubandoli in lisi buffer (NaCl 250mM, Tris-HCl pH 7,5 25mM, EDTA pH 8 5mM, NP40 0,1%) addizionato con inibitori

delle proteasi (PMSF 1:100, Aprotinin 2µg/ml, Leupeptin 1µg/ml, Ortovanadato 2mM) per 30' in ghiaccio. Successivamente i lisati sono stati centrifugati a +4°C per 5' a 12000rpm ed è stato recuperato il surnatante contenente la frazione proteica. Ogni lisato è stato dosato secondo il metodo di Bradford utilizzando il BioRad Protein Assay.

Per l'analisi di elettroforesi bidimensionale è stata effettuata un'estrazione proteica specifica in Tampone di Solubilizzazione (Urea 7M, Thiourea 2M, CHAPS 4%, DTT 1%, Anpholine 0,8%, DNase 1X, RNase 25µg/ml, Protease 1X).

3.16 - Western-blot

50µg di proteine per ogni campione sono stati utilizzati per l'analisi in western-blot. Al lisato cellulare è stato aggiunto Sample Buffer (Tris 0,5M pH6,8 12,5%; glicerolo 20%; SDS-10% 40%; 2-mercaptoetanololo 10%; H₂O distillata 17,5%; tracce di blu di bromofenolo) ed i campioni sono stati fatti denaturare a 95°C per 10'. Successivamente i campioni sono stati caricati in un SDS-PAGE al 12% (per Erk totale, P-Erk e P-Akt) o al 10% (per P-EGF-R) insieme ad uno standard proteico (BioRad Biotinylated SDS-PAGE Standard Low, per Erk totale, P-Erk e P-Akt; BioRad Biotinylated SDS-PAGE Standard High per P-EGF-R) diluito 1:4 in Sample Buffer e fatto denaturare a 95°C per 5'. La corsa elettroforetica è stata condotta a 30V per 30' e successivamente a 110V fino a fine corsa. Il blotting su membrana di nitrocellulosa è stato effettuato a 42mA overnight e successivamente la membrana è stata immersa in Blocking Solution 5% (latte 5% in TBST 1X) per un giorno intero. La membrana è stata quindi incubata per 1h negli anticorpi primari:

- Erk totale, p44/42 MAP Kinase Antibody (diluito 1:1000, Cell Signaling Technology)
- Anti-ERK1&2 [pTpY^{185/187}] Phosphospecific Antibody (diluito 1:1000, BioSource)
- Anti-Akt/PKB [pT³⁰⁸] Phosphospecific Antibody (diluito 1:1000, BioSource)
- Phospho-EGF Receptor (Tyr1068) (1H12) mAb (diluito 1:1000, Cell Signaling Technology)

Infine è stata incubata per 1h in Blotting-Grade Avidin-Horseradish Peroxidase Conjugate (diluito 1:6000, BioRad) unito agli anticorpi secondari:

- Amersham ECL Anti-mouse IgG, Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from sheep) (diluito 1:1000, GE Healthcare)

- Amersham ECL Anti-rabbit IgG, Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from donkey) (diluito 1:500, GE Healthcare)

Si è proceduto all'incubazione della membrana nella soluzione di rivelazione Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) per 1' ed il segnale è stato visualizzato con il Gel-Logic 2200 (Kodak).

3.17 - Elettroforesi bidimensionale (2DE)

I lisati sono stati purificati utilizzando il ReadyPrep 2-D Cleanup Kit (BioRad) seguendo fedelmente il protocollo del kit. Successivamente 150µg di proteine in 300µl di Tampone di Solubilizzazione (Urea 7M, Thiourea 2M, CHAPS 4%, DTT 1%, Anpholine 0,8%, DNase 1X, RNase 25µg/ml, Protease 1X) per ogni campione sono stati utilizzati per l'analisi in elettroforesi bidimensionale.

L'isoelettrofocalizzazione su IPG-strips pH 3-10 NL 17cm (BioRad) è stata eseguita con il Protean IEF Cell (BioRad) secondo il seguente programma:

- 50µA/strip 1h (reidratazione passiva)
- 50V 17h lineare (reidratazione attiva)
- 500V 1h lineare
- 1000V 1h lineare
- 8000V 1h gradiente
- 8000V fino a 50000Vh

Ognuna delle IPG-strips è stata quindi lavata in H₂O distillata ed equilibrata per 30' in agitazione prima in 5ml tampone di equilibratura (Tris pH 8,8 50mM, Urea 6M, Glicerolo 30%, SDS 2%) addizionato al momento dell'uso con 25mg di DTT e poi con 5ml dello stesso tampone addizionato al momento dell'uso con 225mg di IDA.

Ogni IPG-strip è stata posizionata su un gel di poliacrilammide al 12% in cui è stato caricato anche il Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range (BioRad) e la corsa elettroforetica è stata avviata a 5W per 30' e poi 35W fino a fine corsa.

I gels sono stati colorati con Brilliant Blue G – Colloidal (Sigma-Aldrich) *over night* e successivamente decolorati con una soluzione di Metanolo 25% in H₂O. Quindi sono state acquisite le immagini in scansione utilizzando il densitometro GS-800 (BioRad).

3.18 - Analisi statistica

Tutti i dati biologici sono stati valutati come valore mediano e come 25° e 75° percentile a causa della loro distribuzione non Gaussiana. Sono stati utilizzati i test non parametrici di Mann Whitney e di Wilcoxon per comparare i dati di espressione genica non appaiati ed appaiati rispettivamente; i valori $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

La sopravvivenza libera da malattia e la sopravvivenza globale sono state calcolate con il test di Kaplan–Meier e la comparazione tra le curve è stata eseguita con il test di Breslow.

4 - RISULTATI

4.1 - Caratterizzazione funzionale di sei colture primarie ed espressione di geni legati alle neoplasie

4.1.1 - Test MTT

Il test MTT è stato effettuato condizionando le cellule con terreno D'MEM "high glucose" addizionato con EGF 50ng/ml, EGF 100ng/ml, PDGF 50ng/ml, PDGF 100ng/ml. I risultati in termini di assorbanza a 550nm sono stati valutati a 72h versus le stesse cellule in D'MEM high glucose *serum free*.

Nelle linee da IFM, la stimolazione con EGF ha prodotto una buona risposta proliferativa dose-dipendente nelle 118485, mentre nelle cellule di metastasi la risposta appare significativa solo per le 98337/A indipendentemente dalla dose utilizzata. Nelle linee cellulari da LMS, in seguito a stimolazione con EGF si è osservato uno scarso incremento della proliferazione nelle 121397, una chiara risposta dose-dipendente nelle 112634/A ed un aumento della proliferazione solo alla dose maggiore nelle 112634/B. [Fig. 21]

La somministrazione di PDGF, nelle linee cellulari da IFM, ha evidenziato un notevole aumento della proliferazione, che risultava lievemente maggiore alla dose più bassa, nelle 118485, un'ottima risposta dose-dipendente nelle 98337/A e un lieve incremento proliferativo nelle 98337/B. Lo stesso trattamento, nelle cellule di LMS, ha prodotto nessuna risposta nelle 121397 ed un aumento della proliferazione solo alla dose minore nelle 112634/A e nelle 112634/B. [Fig. 22]

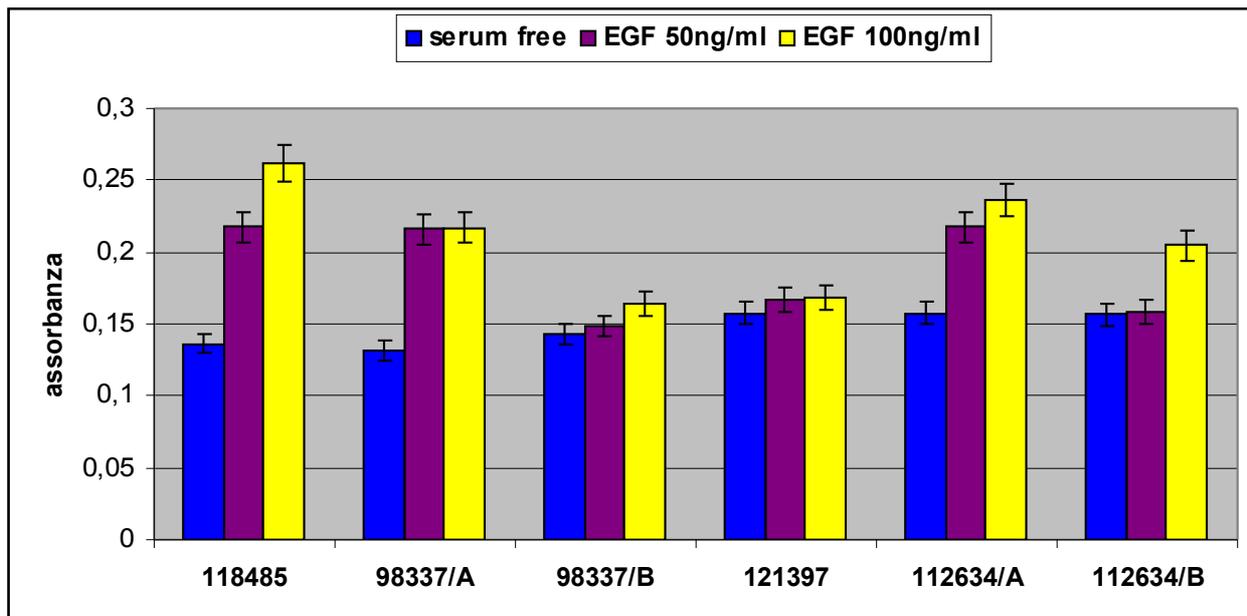


Figura 21
 Test MTT: andamento della proliferazione nelle linee cellulari in seguito a stimolazione con EGF.

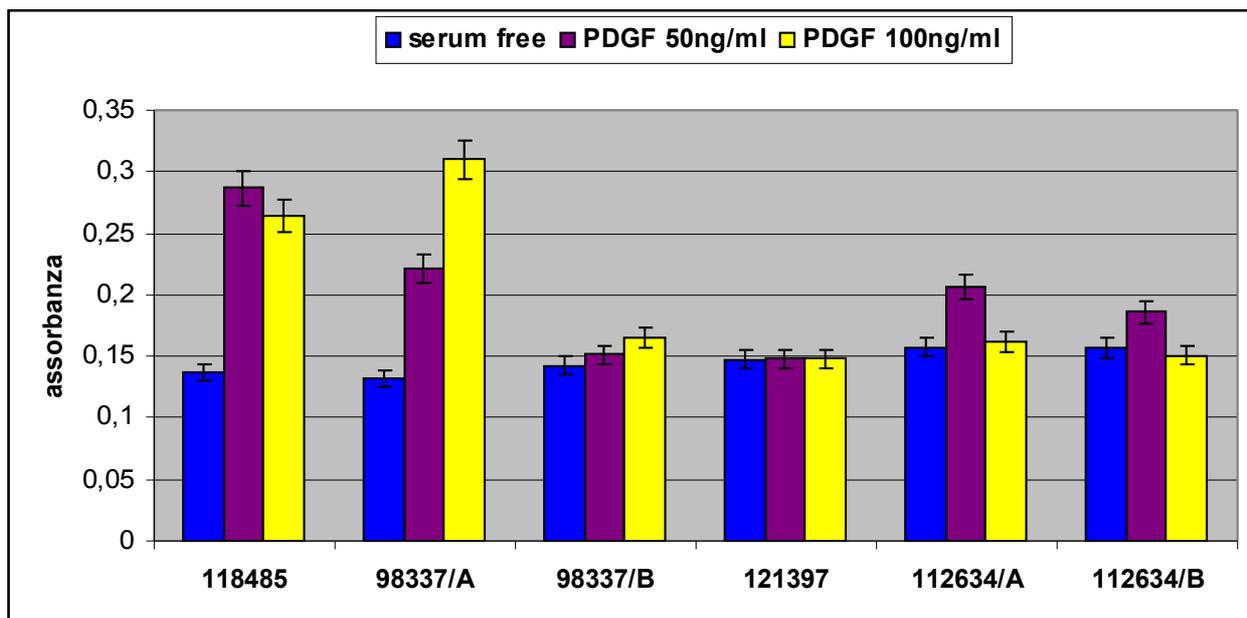


Figura 22
 Test MTT: andamento della proliferazione nelle linee cellulari in seguito a stimolazione con EGF.

4.1.2 - Western Blot

La tecnica di Western Blot è stata utilizzata per valutare l'espressione di ERK, Phospho-ERK, Phospho-Akt e Phospho-EGFR. Gli estratti proteici utilizzati sono stati ricavati dalle cellule in condizioni di base (D'MEM "high glucose" FCS 10%).

Phospho-EGFR è risultato espresso in tutte le linee cellulari sia di IFM che di LMS, con una maggiore espressione nelle 98337/B.

Nelle sei linee cellulari è stata riscontrata l'espressione di entrambe le proteine ERK, ERK1 ed ERK2, e la loro forma fosforilata è risultata presente in tutte le linee eccetto le 121397, mostrando bande più intense nelle 98337/B e nelle 112634/B.

Phospho-Akt è risultata molto espressa in tutte le linee, rivelando una minore presenza nelle 118485 e nelle 98337/A. [Fig. 23]

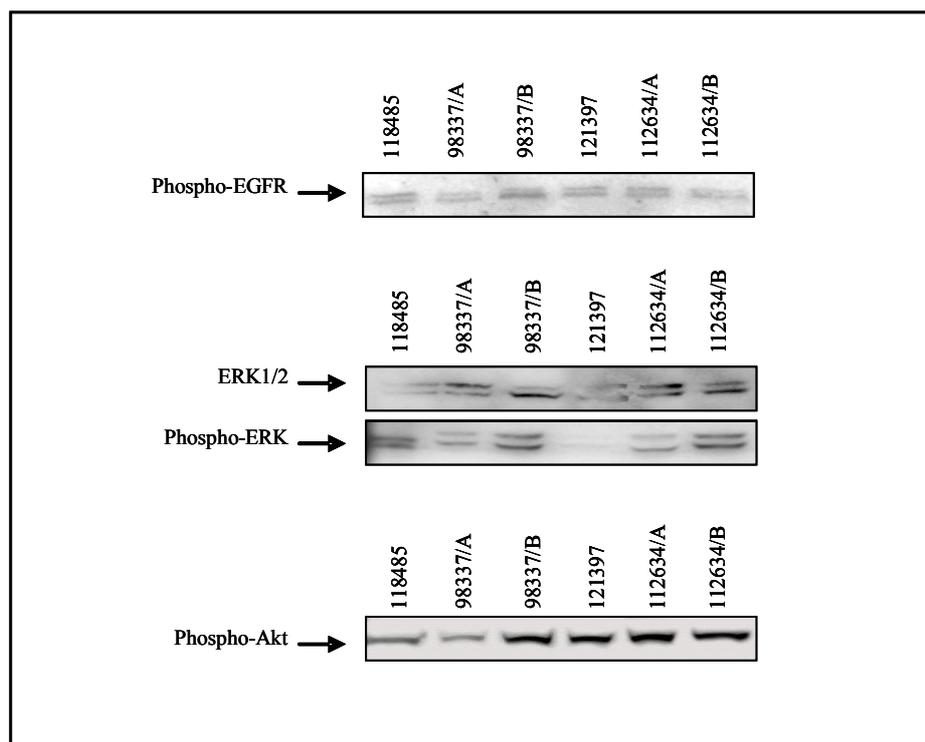


Figura 23
Western Blot: espressione proteica di Phospho-EGFR, ERK, Phospho-ERK e Phospho-Akt nelle linee cellulari di IFM e LMS.

4.1.3 - Saggio citofluorimetrico dell'Annessina V-FITC e Propidio Ioduro

Il saggio è stato effettuato sulle cellule in condizioni di base (D'MEM "high glucose" FCS 10%) ed i dati sono stati raccolti a 48h dalla semina.

L'analisi al citofluorimetro ha evidenziato nelle linee cellulari di IFM e di LMS una percentuale quasi sempre superiore ad 80% (inferiore solo nelle 98337/A) di cellule vive. La percentuale di cellule apoptotiche risultava non significativa in tutte le linee, così come la percentuale di cellule necrotiche. In particolare il saggio citofluorimetrico ha mostrato ed accertato la vitalità delle cellule 98337/B e 112634/B, le quali crescono in sospensione. [Fig. 24]

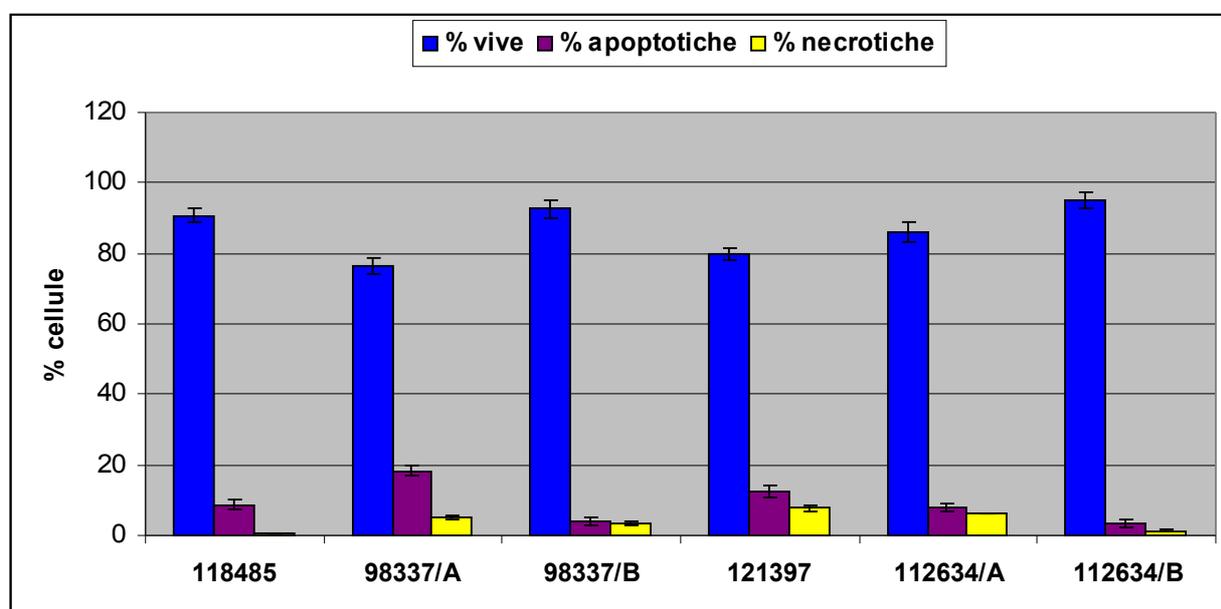


Figura 24

Saggio citofluorimetrico dell'Annessina V-FITC e Propidio Ioduro: percentuali di cellule vive, apoptotiche e necrotiche, per ogni linea cellulare, a 48h dalla semina.

4.1.4 - Real Time PCR

4.1.4.1 - Espressione di geni coinvolti nel processo apoptotico

L'espressione dei principali geni coinvolti nel processo apoptotico è stata analizzata utilizzando i SuperArray (Bioscience Corporation), contenenti ognuno una gamma di 96 primers che permettono la valutazione dell'espressione di 84 geni specifici appartenenti al pathway, 5 geni housekeeping e 3

controlli necessari per verificare la qualità dell'RNA e della PCR, e come riferimento è stato utilizzato un pool di linfociti sani. [Fig. 25]

Array Layout											
ABL1 A01	AKT1 A02	APAF1 A03	BAD A04	BAG1 A05	BAG3 A06	BAG4 A07	BAK1 A08	BAX A09	BCL10 A10	BCL2 A11	BCL2A1 A12
BCL2L1 B01	BCL2L10 B02	BCL2L11 B03	BCL2L2 B04	BCLAF1 B05	BFAR B06	BID B07	BIK B08	NAIP B09	BIRC2 B10	BIRC3 B11	BIRC4 B12
BIRC6 C01	BIRC8 C02	BNIP1 C03	BNIP2 C04	BNIP3 C05	BNIP3L C06	BRAF C07	NOD1 C08	CARD6 C09	CARD8 C10	CASP1 C11	CASP10 C12
CASP14 D01	CASP2 D02	CASP3 D03	CASP4 D04	CASP5 D05	CASP6 D06	CASP7 D07	CASP8 D08	CASP9 D09	CD40 D10	CD40LG D11	CFLAR D12
CIDEA E01	CIDEB E02	CRADD E03	DAPK1 E04	DFFA E05	FADD E06	FAS E07	FASLG E08	GADD45A E09	HRK E10	IGF1R E11	LTA E12
LTBR F01	MCL1 F02	NOL3 F03	PYCARD F04	RIPK2 F05	TNF F06	TNFRSF10A F07	TNFRSF10B F08	TNFRSF11B F09	TNFRSF1A F10	TNFRSF21 F11	TNFRSF25 F12
CD27 G01	TNFRSF9 G02	TNFSF10 G03	CD70 G04	TNFSF8 G05	TP53 G06	TP53BP2 G07	TP73 G08	TRADD G09	TRAF2 G10	TRAF3 G11	TRAF4 G12
B2M H01	HPRT1 H02	RPL13A H03	GAPDH H04	ACTB H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

Figura 25

Composizione della micropiastra dei SuperArray (Bioscience Corporation) per il pathway apoptotico.

In tutte le sei linee cellulari si evidenziava un profilo di espressione genica altamente deregolato con valori di mRNA, al di sopra o al di sotto del calibratore, distribuiti in modo estremamente variabile. I risultati ottenuti non consentivano di identificare nessun gruppo di geni la cui espressione differenziale caratterizzasse le singole linee cellulari (dati completi riportati in Appendice) [Figg. 26, 27]

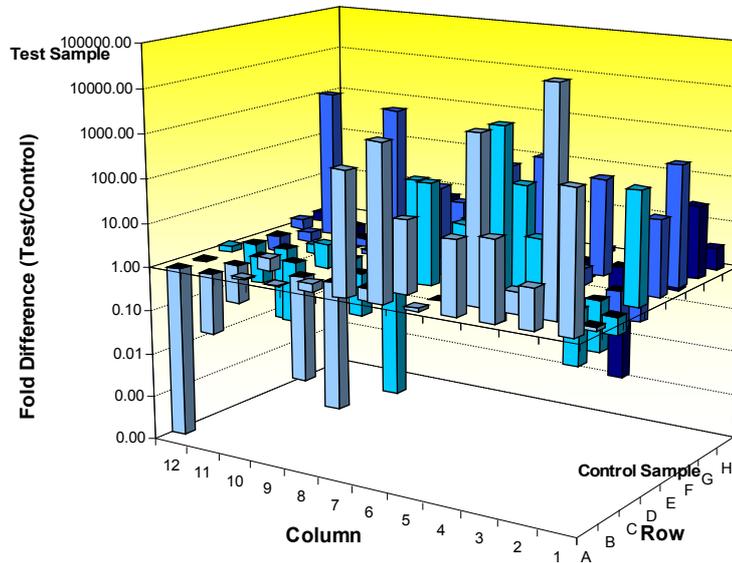
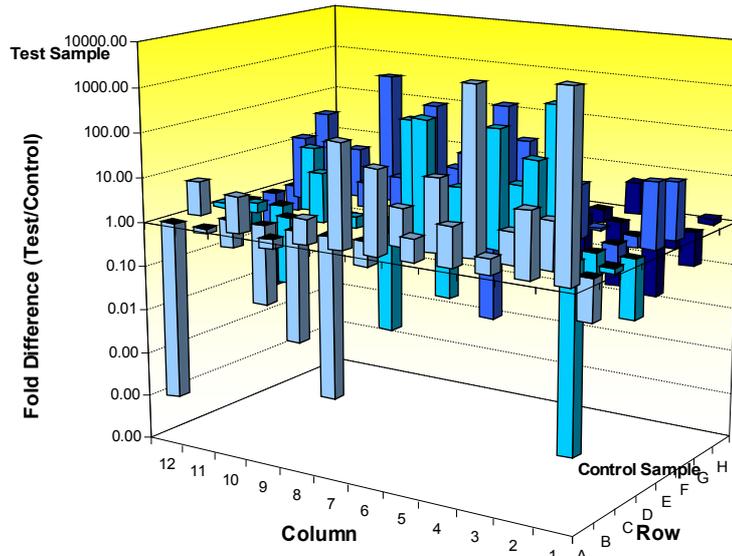
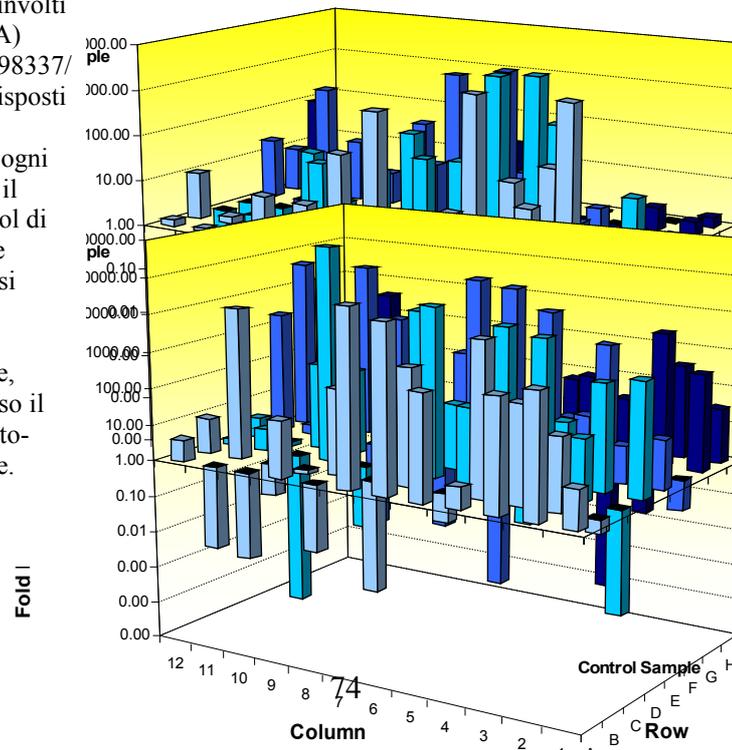


Figura 26

Rappresentazione grafica in 3D dell'espressione dei geni coinvolti nel pathway apoptotico in (A) 118485, (B) 98337/A e (C) 98337/B. Nel grafico i geni sono disposti come nella micropiastra del SuperArray (vedi fig.). Per ogni gene il valore 1 rappresenta il livello di espressione nel pool di linfociti sani utilizzato come calibratore. Le colonne che si sviluppano verso l'alto rappresentano una sovraespressione del relativo gene, quelle che si sviluppano verso il basso rappresentano una sottoespressione del relativo gene.



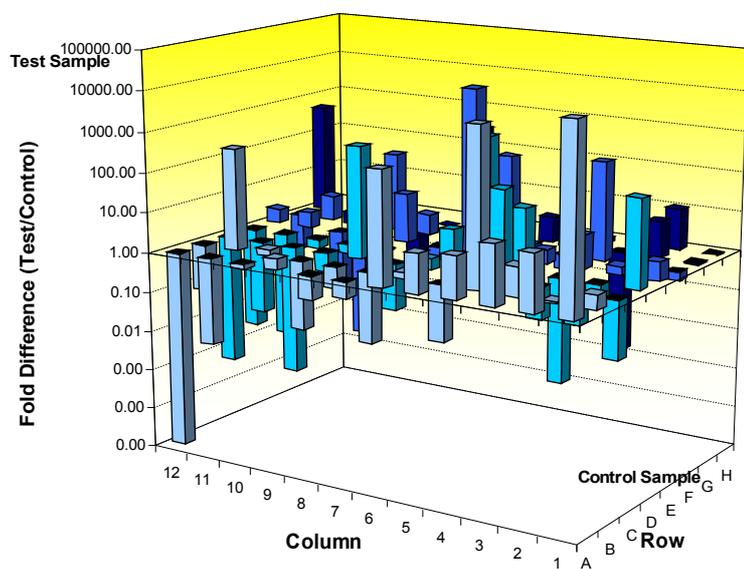
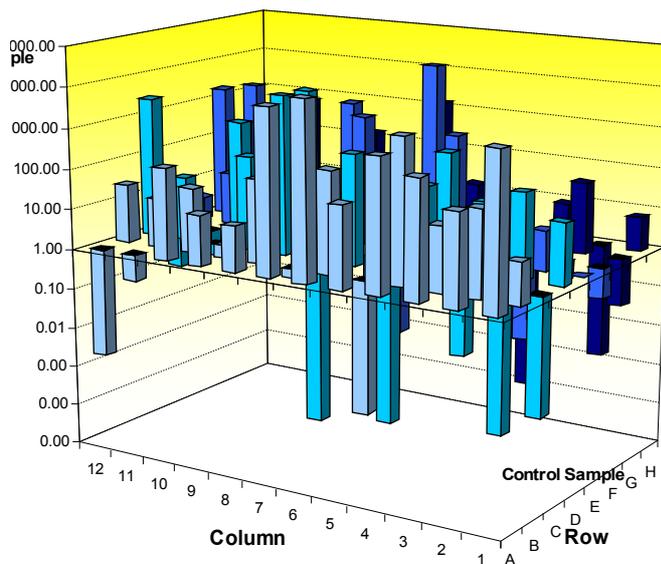


Figura 27

Rappresentazione grafica in 3D dell'espressione dei geni coinvolti nel pathway apoptotico in (A) 121397, (B) 112634/A e (C) 112634/B. Nel grafico i geni sono disposti come nella micropiastra del SuperArray (vedi fig.). Per ogni gene il valore 1 rappresenta il livello di espressione nel pool di linfociti sani utilizzato come calibratore. Le colonne che si sviluppano verso l'alto rappresentano una sovra-espressione del relativo gene, quelle che si sviluppano verso il basso rappresentano una sotto-espressione del relativo gene.



4.1.4.2 - Espressione di geni legati alla metastasi ed all'adesione

I geni uPA, uPAR, PAI-I, NG2, COL VI, XTP1 ed SDP35 sono tutti coinvolti, anche se attraverso meccanismi differenti, nel processo di migrazione cellulare. Sono, quindi, stati studiati per valutarne l'espressione nelle cellule di IFM e LMS, con la tecnica di Real Time PCR. Ogni gene è stato considerato più espresso nei casi in cui il valore di emissione luminosa calcolato con il metodo del $2^{-\Delta\Delta CT}$ è risultato superiore al valore 1+SD e meno espresso in tutti quei casi in cui il valore si è mostrato inferiore al valore 1-SD. Il livello di espressione normale 1, corrisponde al valore di emissione luminosa per ogni reazione di amplificazione della sequenza bersaglio e di riferimento di un pool di linfociti sani. L'espressione dei geni è stata normalizzata all'espressione del gene costitutivamente espresso *GAPDH*.

I risultati indicano che in tutte le linee studiate uPA e PAI-I erano overespressi rispetto al calibratore, mentre uPAR era sotto-espresso. Per quanto riguarda il sistema dell'attivatore del plasminogeno, l'aumento dell'espressione era maggiore nelle linee cellulari di metastasi (98337/A, 98337/B, 112634/A e 112634/B) rispetto a quelle provenienti dal tumore primario (118485 e 121397). Al contrario, PAI-I risultava meno espresso nelle linee di metastasi rispetto a quelle di tumore primario, fatta eccezione per le 98337/A dove si osservava un più forte incremento dei livelli di mRNA rispetto alla linea di IFM primario corrispondente (118485).

Anche i livelli di espressione del gene del proteoglicano NG2, coinvolto nel processo di metastatizzazione, e del suo co-recettore collagene VI, che sembra essere indispensabile per la spiccata attività di migrazione trans-endoteliale delle cellule NG2-positivo, risultavano maggiori del calibratore in tutte le linee cellulari con valori di mRNA superiori nelle cellule di metastasi rispetto al tumore primario corrispondente, fatta eccezione per le 98337/B che mostravano livelli di NG2 lievemente inferiori.

Un dato particolarmente interessante proviene dall'analisi dei geni XTP1 e SDP35, i quali sembrano essere coinvolti nei meccanismi di adesione cellulare. Entrambi, lievemente overespressi nelle cellule di tumore primario e di metastasi a crescita in adesione, aumentano da un centinaio ad un migliaio di volte nelle linee di metastasi a crescita in sospensione (98337/B e 112634/B) indipendentemente dall'istotipo del tumore di provenienza. [Tab. 5]

	uPA	uPAR	PAI-I	NG2	COL VI	XTP1	SDP35
--	-----	------	-------	-----	--------	------	-------

118485	10,27± 1,2	0,39± 0,2	2312,12± 1,2	347,29± 0,68	8051,27± 1,10	4,50± 0,035	22,47± 0,27
98337/A	2469,49± 1,5	0,53± 1,5	4110,22± 0,5	474,41± 0,72	28824,34± 0,92	3,23± 1,49	14,82± 1,54
98337/B	157,59± 0,5	0,59± 0,5	42,66± 0,51	263,20± 0,44	20666,41± 1,5	1243,34± 0,13	2556,58± 0,18
121397	133,89±0,18	0,27±0,00	8051,1826±0,20	41,87±0,35	549,17±0,48	1,98±0,29	12,90±0,23
112634/A	442,64±0,03	1,11±0,08	2521,38±0,17	99,73±0,42	636,93±0,34	71,01±0,09	131,59±0,06
112634/B	397,81±0,60	0,89±0,01	1898,17±0,96	174,24±0,53	982,28±0,53	76331,98±0,44	21321,18±0,67

Tabella 5

Real time PCR: risultati dell'analisi di espressione di uPA, uPAR, PAI-I, NG2, COL VI, XTP1 ed SDP35. I valori sono espressi in $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.1.4.3 - Espressione genica nei tessuti

4.1.4.3.1 - NG2 e COLL VI

I valori di $2^{-\Delta\Delta CT}$ per il gene NG2 nei 38 sarcomi primari variavano da 90 a 6817 con un valore mediano pari a 712. I 14 campioni di metastasi presentavano valori da 2721 a 32591, con un valore mediano di 8422, mentre la mediana dei risultati ottenuti dai 17 casi di tessuto normale era pari a 110 (da 13 a 711). Per il gene del COLL VI il valore mediano era di 4, 436 e 1302 rispettivamente nei tessuti sani, di tumore primario e di metastasi. [Tab. 6]

L'analisi statistica mediante il test di Wilcoxon ha evidenziato differenze statisticamente significative per l'espressione di NG2 sia tra tumori primari e metastasi, sia tra questi e il tessuto normale corrispondente. [Tab. 6] [Fig. 28-A] Per il COLL VI la differenza nei valori di espressione era statisticamente significativa solo nel confronto dei tessuti neoplastici con quelli sani. [Tab. 6] [Fig. 28-B]

	Primari	Metastasi	Sani
NG2	712	8422	110
p	0,04	0,001	
COLL VI	436	1302	4
p	0,05	0,01	

Tabella 6

Mediane dei valori d'espressione di NG2 e COLL VI nei tre gruppi (primari, metastasi e sani) e valori di p riferiti al confronto con il gruppo dei sani.

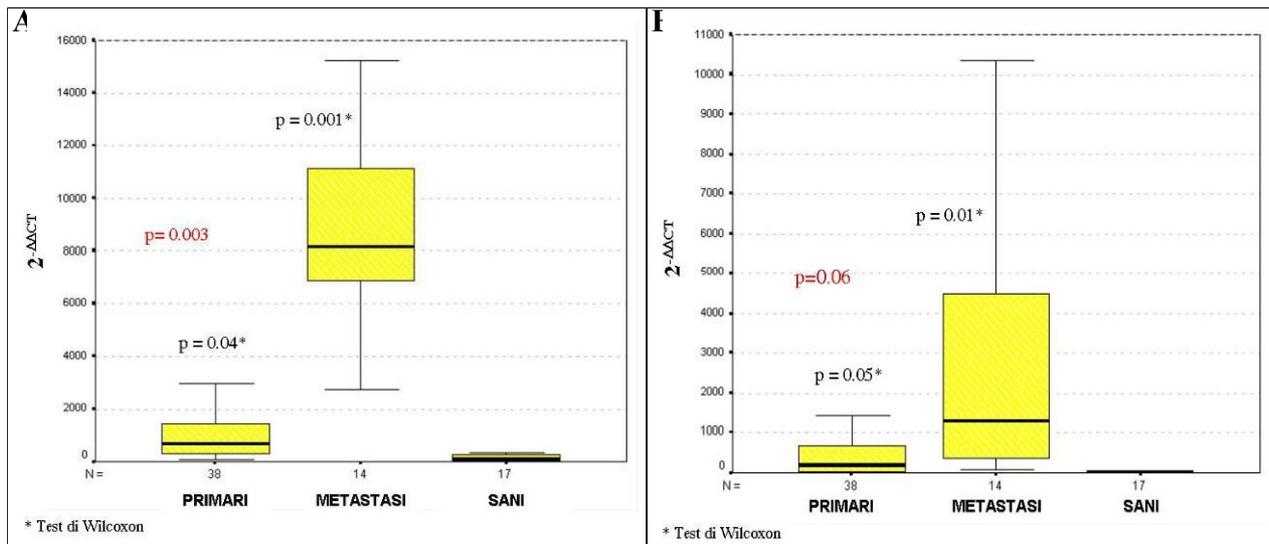


Figura 28

Rappresentazione grafica della distribuzione dei valori di espressione dei geni NG2 (A) e COLL VI (B). I valori di p contrassegnati con * si riferiscono al confronto con il gruppo dei sani; i valori di p indicati in rosso si riferiscono al confronto tra il gruppo dei primari e quello delle metastasi.

All'interno di ognuno dei due istotipi studiati (IFM e LMS) è stata confermata la differenza significativa tra i tumori primari e le metastasi (test di Wilcoxon per dati appaiati). [Tab. 7]

Per quello che riguarda i 16 casi di Istiocitoma Fibroso Maligno, il valore mediano nei tumori primari è risultato essere 330 e 1063 rispettivamente per i geni NG2 e COLL VI. La mediana negli 8 casi di metastasi da IFM era 6848 per il gene NG2 e 10785 per il gene COLL VI. La differenza fra il gruppo dei tumori primari e quello delle metastasi è risultata per entrambi i geni significativa ($p = 0,007$). [Tab. 7] [Fig. 29-A]

Per quello che riguarda i 22 casi primari di Leiomioma, la mediana per l'espressione genica di NG2 e COLL VI è risultata rispettivamente di 1255 e 299. Nel gruppo delle 6 metastasi si sono riscontrati valori mediani pari a 9767 per il gene NG2 e 837 per il COLL VI. La differenza fra il gruppo dei tumori primari e quello delle metastasi è risultata per entrambi i geni significativa ($p = 0,03$; $p = 0,08$). [Tab. 7] [Fig. 29-B]

Il confronto tra il sottogruppo di LMS e quello di IFM, effettuato tramite il Test di Mann Whitney per gruppi non appaiati, non ha evidenziato differenze significative, per entrambi i geni studiati. [Tab. 7]

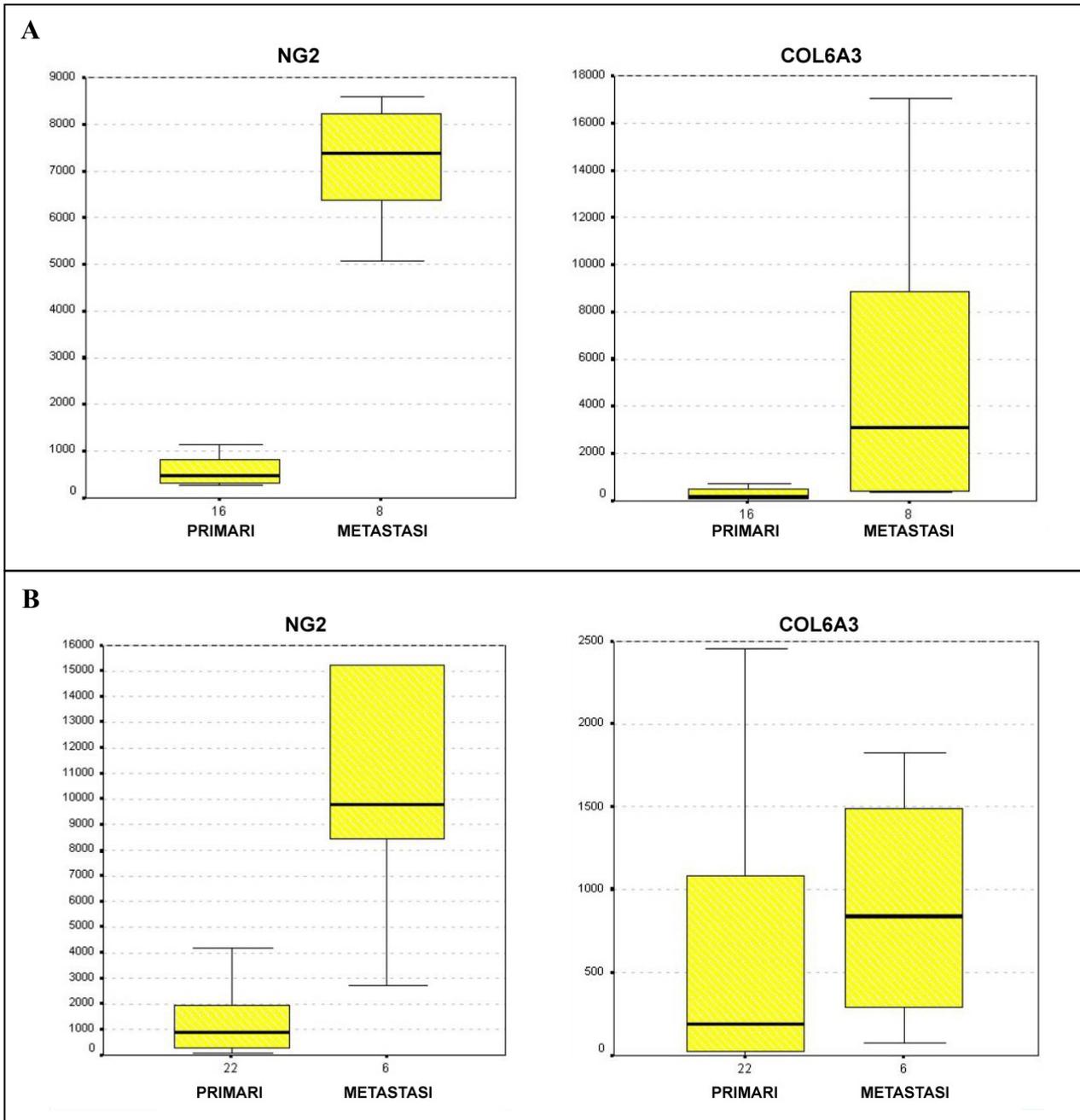


Figura 29
 Rappresentazione grafica della distribuzione dei valori di espressione dei geni NG2 e COLL VI in Istiocitoma Fibroso Maligno (A) e Leiomiosarcoma (B).

	IFM			LEIO			p*= ns
	Mediana	25° percentile	75° percentile	Mediana	25° percentile	75° percentile	
Primari NG2	330	282	379	1255	549	2978	ns
Metastasi NG2	6848	5893	7804	9767	8422	15233	ns
p =	0,007			0,03			
Primari COLL VI	1063	693	1434	299	29	441	ns
Metastasi COLL VI	10785	4501	17070	837	837	1490	ns
p =	0,007			0,08	0,08		

Tabella 7

Mediane e percentili (25° e 75°) dei valori d'espressione genica per NG2 e COLL VI nei gruppi di primari e metastasi, suddivisi per istotipo del tumore d'origine. I valori di p si riferiscono al confronto tra primari e metastasi; i valori di p^* si riferiscono al confronto tra gli istotipi.

4.1.4.3.2 - XTP1 e SDP35

I valori di $2^{-\Delta\Delta CT}$ per il gene XTP1 nei 38 sarcomi primari variavano da 2 a 167 con un valore mediano pari a 36. I 14 campioni di metastasi presentavano valori da 682 a 2751, con un valore mediano di 771, mentre i 17 casi di tessuto normale variavano da 1 a 23, con una mediana di 9. [Tab. 8]

L'analisi statistica mediante il test di Wilcoxon ha evidenziato differenze statisticamente significative sia tra tumori primari e metastasi ($p=0,005$), che con il tessuto normale corrispondente ($p=0,032$ per i primari; $p=0,004$ per le metastasi). [Tab. 9] [Fig. 30-A]

Per quanto riguarda l'espressione di SDP, i sarcomi primari presentavano valori di $2^{-\Delta\Delta CT}$ da 2 a 192, con una mediana di 64. Le metastasi variavano da 546 a 1262, con valore mediano di 787; i casi di tessuto normale presentavano una mediana di 7, con valori che andavano da 2 a 17. [Tab. 8]

Il test statistico di Wilcoxon ha evidenziato differenze significative tra l'espressione del gene nei tumori primari e quella nelle metastasi ($p=0,003$) ed anche tra primari, metastasi e tessuti normali ($p=0,03$ per i primari; $p=0,002$ per le metastasi). [Tab. 9] [Fig. 30-B]

	XTP1			SDP35		
	Mediana	25° percentile	75° percentile	Mediana	25° percentile	75° percentile
Primari	36	5	79	64	32	116
Metastasi	771	737	2743	787	688	1256
Sani	9	4	18	7	3	13

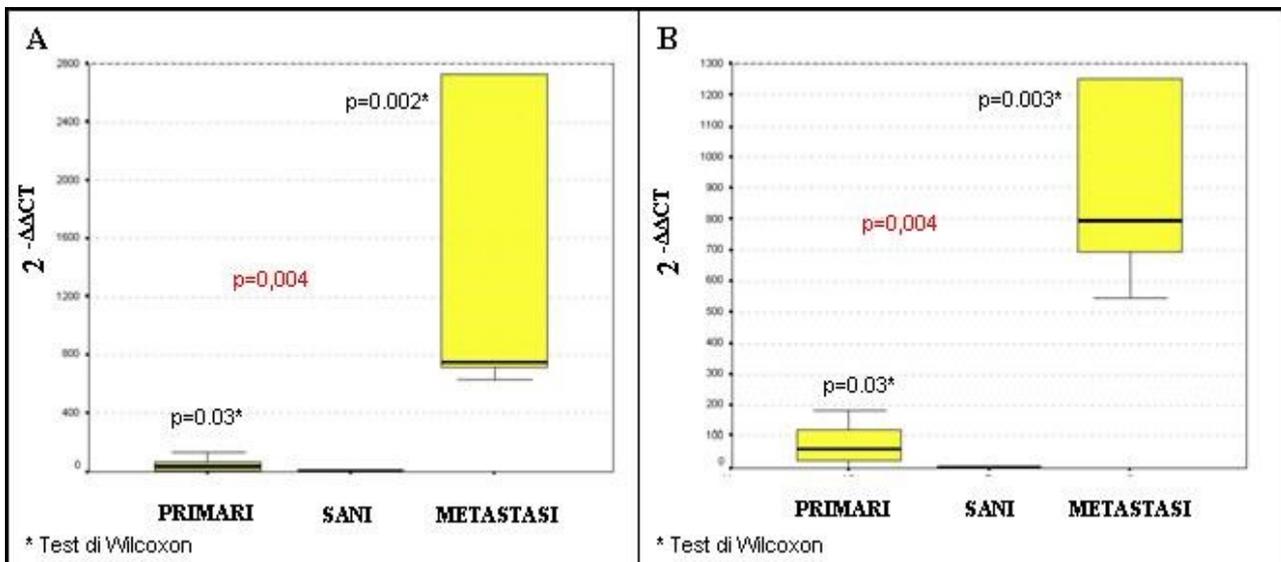
Tabella 8

Mediane e percentili (25° e 75°) dei valori d'espressione genica per XTP1 e SDP35 nei gruppi di primari, metastasi e sani. I valori di p si riferiscono al confronto tra primari e metastasi; i valori di p^* si riferiscono al confronto tra gli istotipi.

	XTP1			SDP35		
	Primari	Metastasi	$p=$	Primari	Metastasi	$p=$
	36	771	0,004	64	787	0,004
Sani	9	9		7	7	
$p^*=$	0,03	0,003		0,03	0,002	

Tabella 9

Valori mediiani d'espressione dei geni XTP1 e SDP35 in primari metastasi e sani. I valori di p^* si riferiscono al confronto con i sani; i valori di p si riferiscono al confronto tra il gruppo dei primari e quello delle metastasi.



Figura

Rappresentazione grafica della distribuzione dei valori di espressione dei geni XTP1 (A) e SDP35 (B). I valori di p contrassegnati con * si riferiscono al confronto con il gruppo dei sani; i valori di p indicati in rosso si riferiscono al confronto tra il gruppo dei primari e quello delle metastasi.

4.1.5 - Immunoistochimica

L'espressione di NG2 e COLL VI è stata indagata a livello proteico con tecnica immunohistochimica.

13 casi (93%) sono risultati positivi, con un'intensità che variava da debole a forte. [Fig. 31-A, C] Di questi 13 casi, 10 erano pazienti che avevano sviluppato metastasi e tutti presentavano una distribuzione di espressione più intensa e più omogenea rispetto a quelli liberi da malattia.

Le 14 metastasi sono risultate intensamente positive per NG2, con maggiore intensità e più omogenea distribuzione rispetto ai primari corrispondenti. [Fig. 31-B, D]

Nei tumori primari l'analisi immunohistochimica della catena $\alpha 3$ del COLL VI, effettuata su 38 tessuti, ha rivelato una positività in 6 campioni (33%), con un'intensità da debole a forte. Nelle altre sezioni analizzate l'espressione della catena $\alpha 3$ del COLL VI era debole o minima. Anche per le metastasi l'immunoreattività della catena $\alpha 3$ del COLL VI era debole e distribuita in modo non omogeneo. (dati non mostrati)

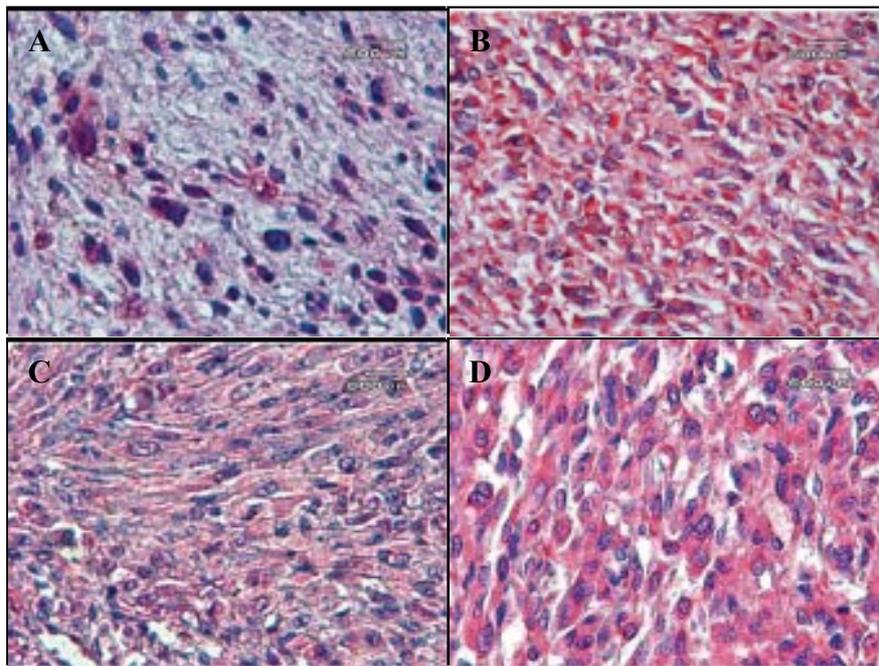


Figura 31
Immunopositività all'anticorpo anti-NG2: debole in una sezione di IFM primario (A), intensa in un LMS primario (C), molto intensa in sezioni di metastasi da IFM (B) e da LMS (D). (nuclei contrastati con ematossilina)

4.1.6 - Co-localizzazione proteica

Tramite immunofluorescenza si è proceduto alla localizzazione di NG2 (con anticorpo legato a rodamina) e COLL VI (con anticorpo legato a fluoresceina). L'osservazione al microscopio rivelava la sovrapposizione delle fluorescenze rossa (NG2) e verde (COLL VI) dimostrando la co-localizzazione delle due molecole. [Fig. 32]

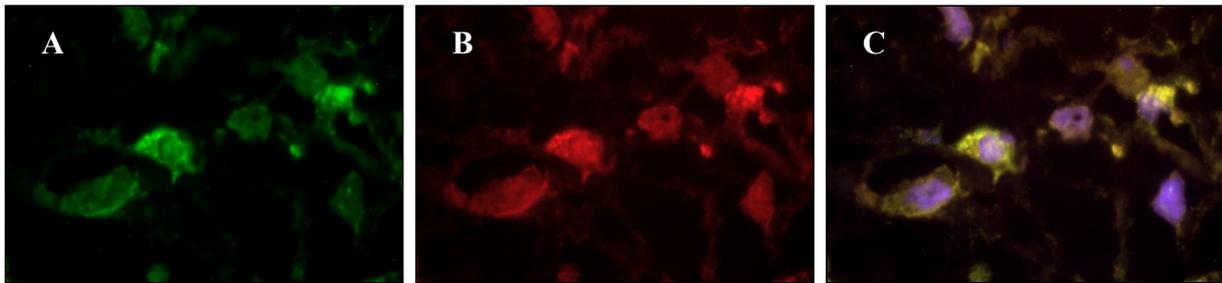


Figura 32

Immagini al microscopio a fluorescenza: COLL VI in verde (A), NG2 in rosso (B), visione di entrambe le fluorescenze contemporaneamente (C). In "C" le zone in giallo sono quelle in cui sono presenti entrambe le molecole; i nuclei sono contrastati con DAPI.

4.2 – Caratterizzazione di due popolazioni cellulari, derivate dalla stessa coltura primaria, a differente modalità di crescita (in adesione ed in sospensione)

4.2.1 - Microscopia elettronica a scansione (SEM)

L'analisi di microscopia elettronica a scansione è stata effettuata, grazie alla collaborazione con la Dottoressa Maltarello del Laboratorio di Biologia Cellulare dello IOR, sulle cellule di metastasi: le 98337/A e le 112634/A, a crescita aderente, e le 98337/B e le 112634/B, a crescita in sospensione.

Le 98337/A mostravano una popolazione omogenea per dimensioni e forma con cellule estremamente appiattite e pochi e corti prolungamenti citoplasmatici. [Fig. 33-A]

Le 112634/A mostravano anch'esse una popolazione pressoché omogenea per dimensione e forma. Si osservavano cellule fusiformi, molto allungate, ed alcune sporadiche cellule appiattite; tutte

presentavano margini cellulari irregolari per la presenza di numerosi prolungamenti citoplasmatici. [Fig. 33-B]

Le 98337/B evidenziavano polimorfismo cellulare per forma e volume (anisocitosi); si evinceva la presenza di 2-3 popolazioni cellulari differenti con membrana plasmatica regolare e poche estroflessioni citoplasmatiche. [Fig. 33-C]

All'osservazione, le 112634/B presentavano una popolazione non omogenea di cellule che, anche quando in adesione, mantenevano una forma tondeggianti con sporadiche cellule fusiformi. [Fig. 33-D]

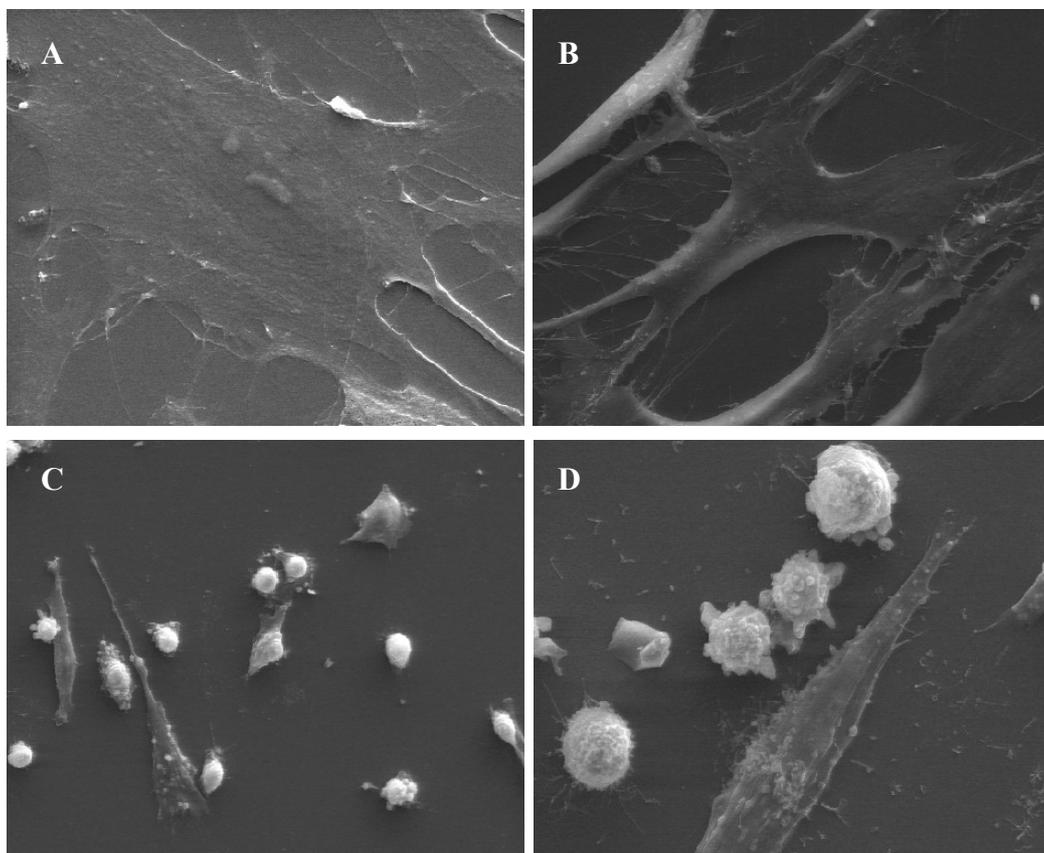


Figura 33
Immagini al microscopio elettronico a scansione di cellule 98337/A (A), 112634/A (B), 98337/B (C) e 112634/B (D).

4.2.2 - Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Sulle linee cellulari di metastasi è stata effettuata l'analisi di microscopia elettronica a trasmissione, grazie alla collaborazione con la Dottoressa Maltarello del Laboratorio di Biologia Cellulare dello IOR.

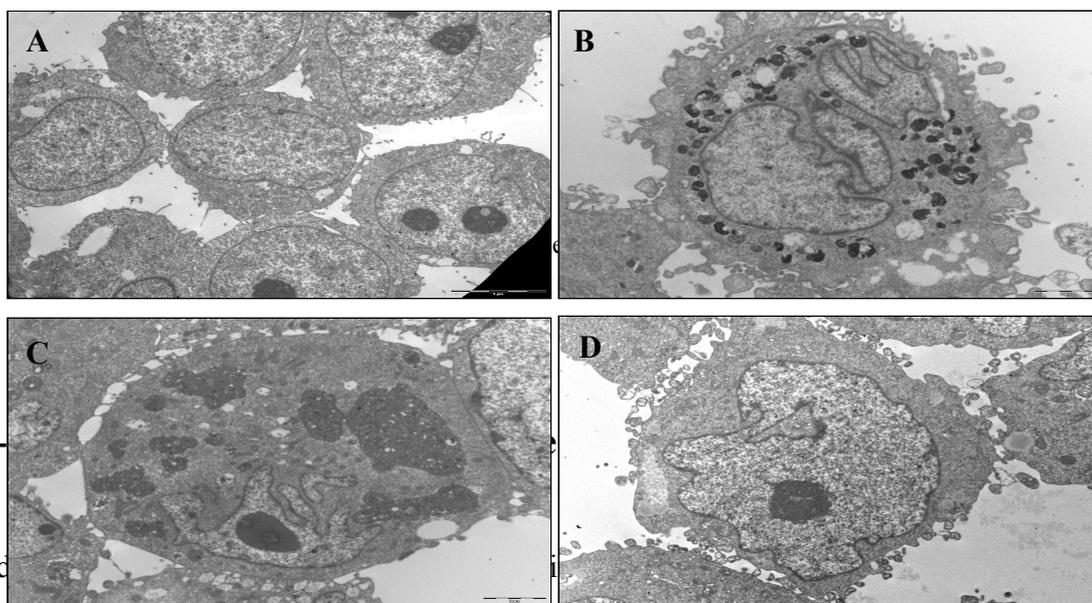
Nelle 98337/A il rapporto nucleo/citoplasma (N/C) era spesso a favore del nucleo con nuclei ovoidali a margini regolari. Si evidenziava una sottile rima di eterocromatina marginata lungo la membrana nucleare e cromatina grossolanamente dispersa nel nucleoplasma. Erano presenti 1-2 nucleoli anche prominenti con la parte fibrillare e granulare ben distinguibile. Le cellule presentavano differente densità citoplasmatica con abbondante reticolo endoplasmatico rugoso (RER) non dilatato. Si notava la presenza di cisterne, forse assimilabili alle “*paired cisternae*”, prive di membrana e la cui cavità luminare, di diametro variabile, aveva prevalentemente forma ovalare o falciforme. Queste forme erano probabilmente derivanti dalla frammentazione del rivestimento nucleare, nel corso della mitosi, e dal reticolo plasmatico; la loro presenza, in altre tipologie tumorali, è indice di alta attività proliferativa. [Fig. 34-A]

All'osservazione, le 112634/A mostravano un rapporto N/C a favore del citoplasma oppure 1/1, con nuclei pleomorfi lobati o indentati. La cromatina era grossolanamente dispersa nel nucleoplasma, generalmente distribuita a ridosso della membrana nucleare (segno di precoce degenerazione cellulare), con zolle di etero cromatina in posizione centrale (ipercromatismo). Erano inoltre presenti abbondante RER in fase di sintesi e spesso dilatato, mitocondri swellen (svuotati) e numerosi vacuoli autofagici (auto lisosomi o lisosomi secondari). [Fig. 34-B]

Nelle 98337/B il rapporto N/C era spesso a favore del nucleo, con nuclei pleomorfi a contorni regolari e profonde incisure. La cromatina era grossolanamente dispersa nel nucleoplasma con addensamenti di etero cromatina disseminati (ipercromatismo). I nucleoli si presentavano ipertrofici con nucleolemma ben sviluppato e erano spesso in posizione marginale, penetrando in profondità nel corpo cellulare. Le cellule presentavano differente densità citoplasmatica, un esiguo numero di organelli, un RER con cisterne lunghe ed appiattite e mitocondri piccoli e picnotici. Si potevano notare: la presenza di filamenti nel citoplasma che si addensavano formando fasci, di grossi vacuoli contenenti materiale amorfo e di vacuoli autofagici (auto lisosomi o lisosomi secondari). [Fig. 34-C]

Nelle cellule 112634/B il rapporto N/C era spesso a favore del nucleo con nuclei pleomorfi, spesso indentati. La cromatina si presentava grossolanamente dispersa nel nucleoplasma, distribuita generalmente a ridosso della membrana nucleare, con rare zolle di etero cromatina addensate alla membrana o nel nucleoplasma (ipercromatismo). I nucleoli erano presenti in numero di 1 o 2, ipertrofici e spesso in posizione marginale. Il citoplasma si mostrava scuro per la presenza di rosette di poliribosomi liberi. Il RER era abbondante ed in fase di sintesi ed i mitocondri erano integri e di grandi dimensioni. Si rilevava la presenza di: filamenti nel citoplasma che si addensavano a formare dei fasci (riconducibili alle così dette *placche dense*); aree più chiare e di differente densità rispetto

al citoplasma, di forma irregolare, riconducibili ad accumuli di glicogeno non colorati; accumuli lipidici. [Fig. 34-D]



4.2.3

Lo stud

fettuato

sulle linee cellulari di metastasi, grazie alla collaborazione con la Dottorssa Maltarello del Laboratorio di Biologia Cellulare dello IOR.

L'immunoreattività alle sub-unità Alfa 1, Alfa 6A e Beta 1 risultava non rilevabile in tutte le linee cellulari. [Figg. 35, 40, 42] [Tab. 10]

Le cellule 98337/A ed 112634/A mostravano una positività maggiore per le sub-unità Alfa 2, Alfa 4 ed Alfa V, rispetto alle cellule di metastasi del corrispondente istotipo. (Figg. 36, 38, 41) [Tab. 10]

L'espressione della sub-unità integrinica Alfa 3A appariva maggiore in cellule di metastasi in sospensione che in cellule aderenti, per quanto concerne l'istotipo LMS; al contrario, si mostrava maggiore nella linea cellulare aderente rispetto a quella in sospensione, per il fenotipo IFM. [Fig. 37] [Tab. 10]

La sub-unità Alfa 5 integrinica risultava più espressa nelle 112634/A rispetto alle 112634/B, mentre mostrava lo stesso grado di positività nelle due linee cellulari di metastasi da IFM. [Fig. 39] [Tab. 10]

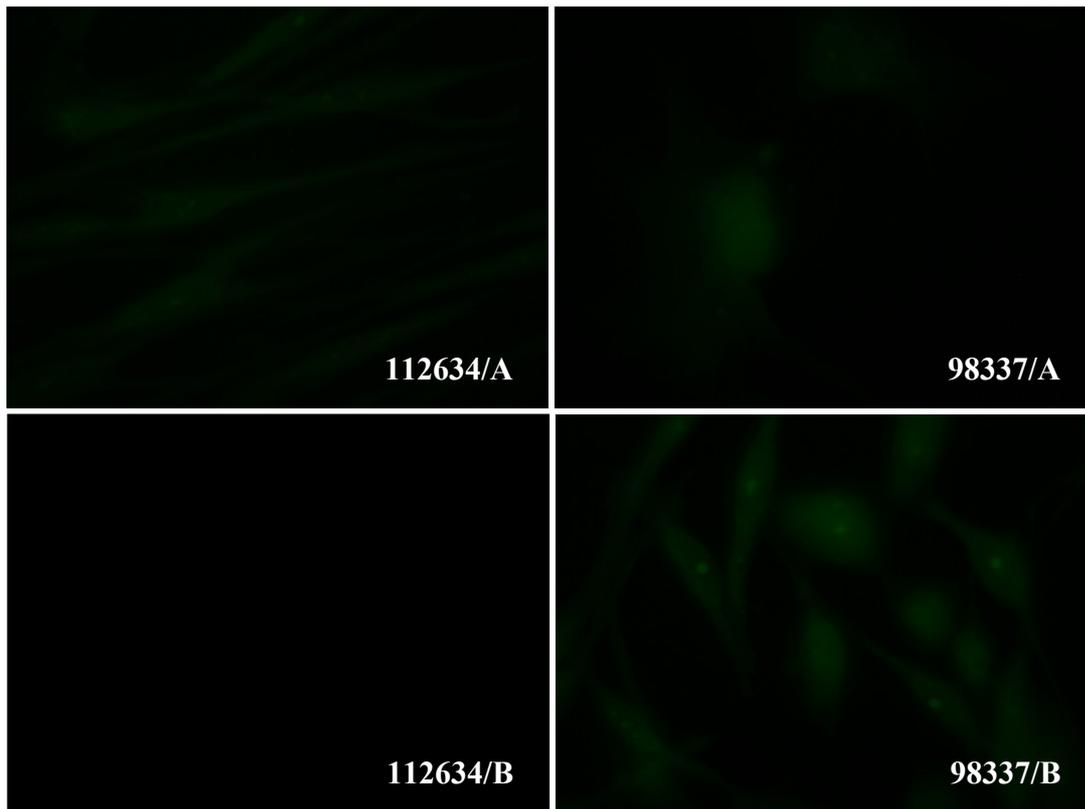


Figura 35
 Immagini al microscopio a fluorescenza: immunoreazione alla sub-unità integrinica Alfa1 nelle linee di metastasi.

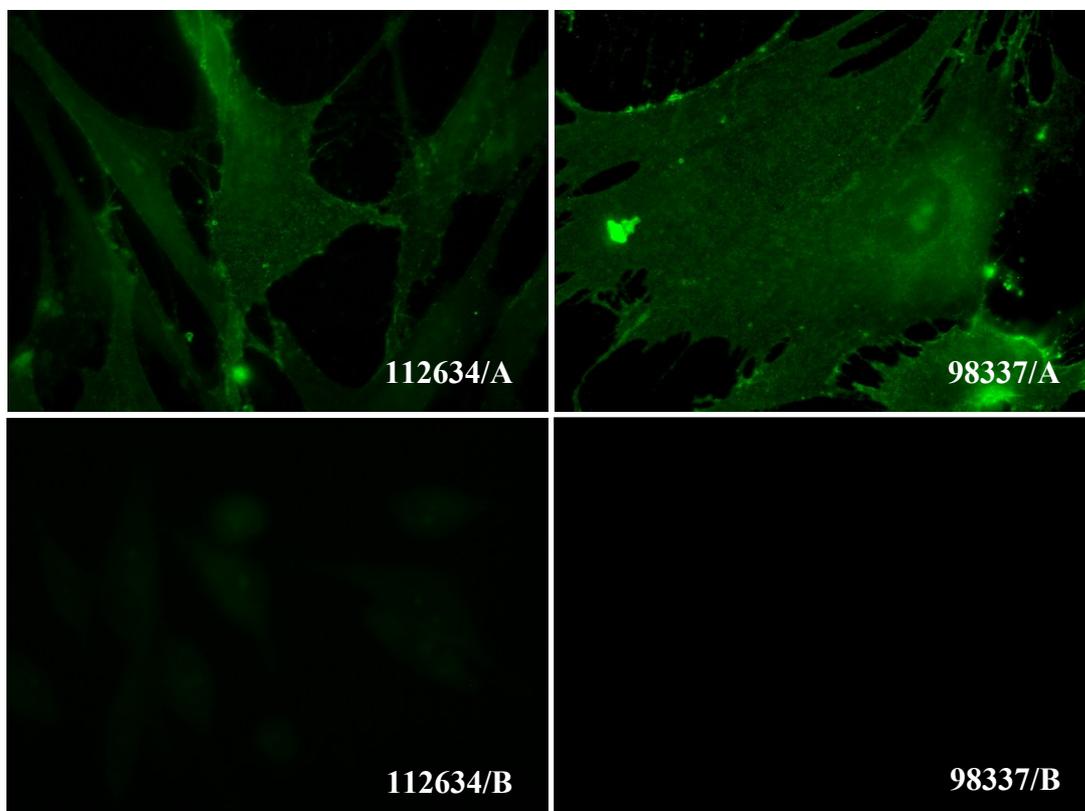


Figura 36
 Immagini al microscopio a fluorescenza: immunoreazione alla sub-unità integrinica Alfa2 nelle linee di metastasi.

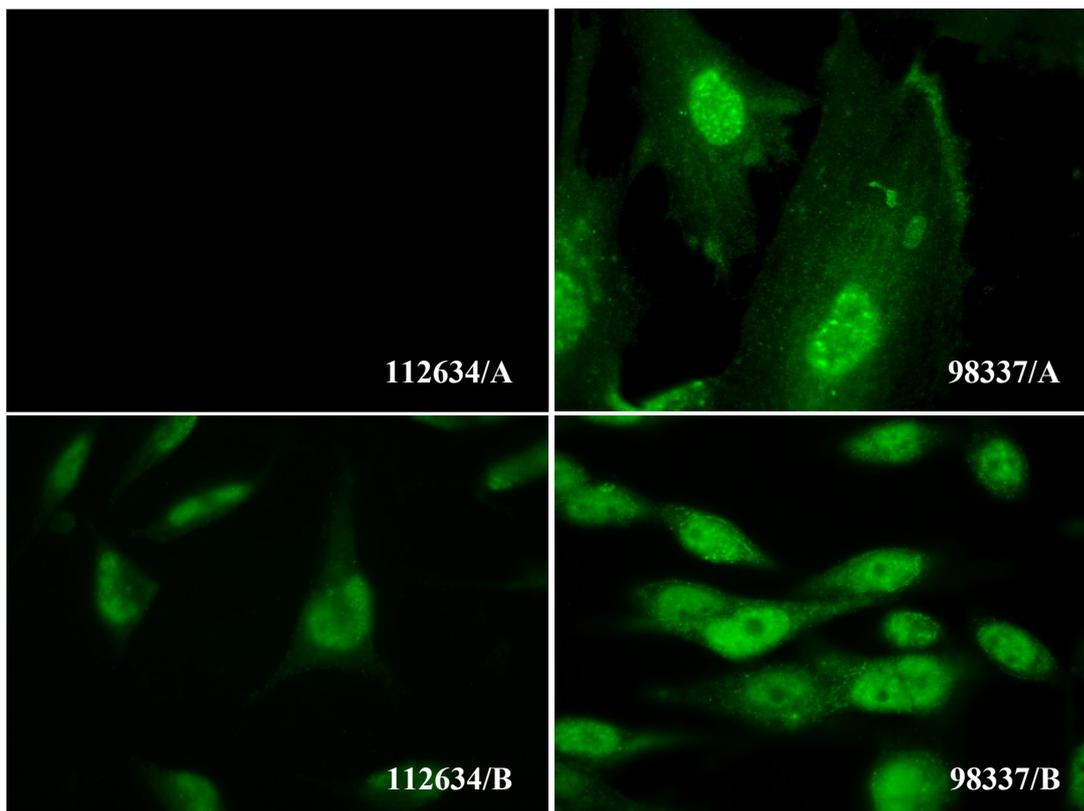


Figura 37
 Immagini al microscopio a fluorescenza: immunoreazione alla sub-unità integrinica Alfa3A nelle linee di metastasi. Presenza di reazioni aspecifiche a livello dei nuclei.

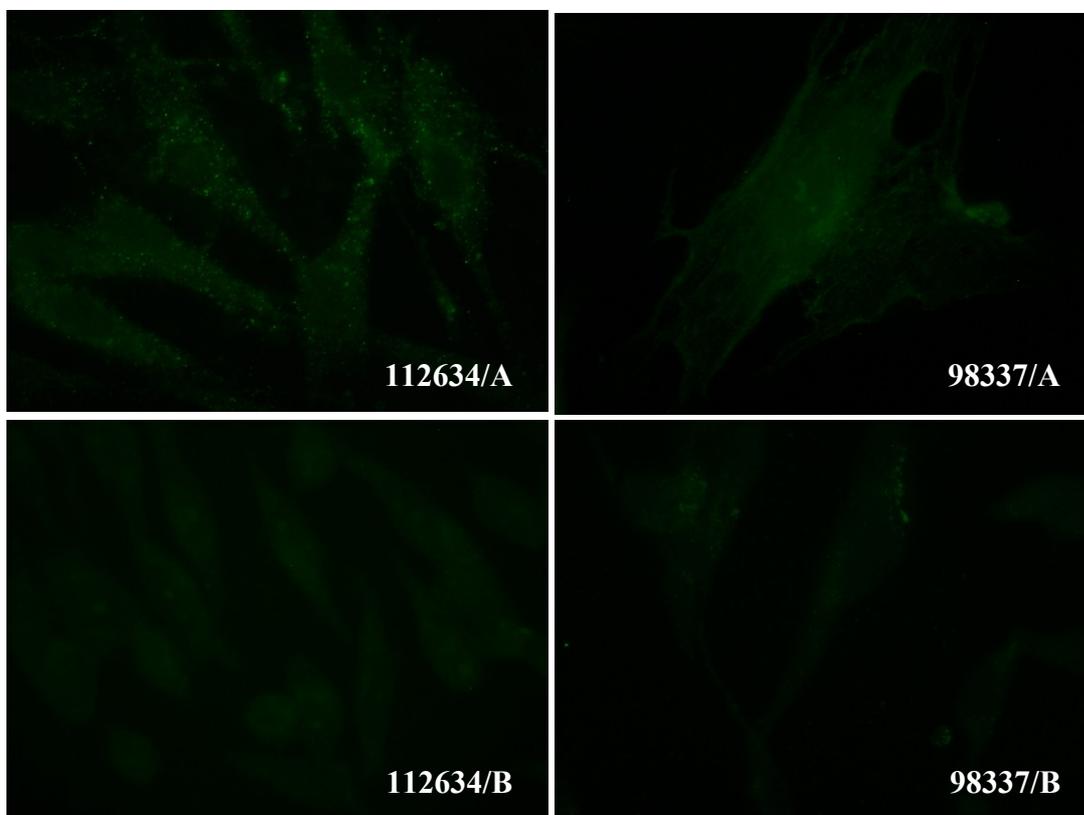


Figura 38
 Immagini al microscopio a fluorescenza: immunoreazione alla sub-unità integrinica Alfa4 nelle linee di metastasi.

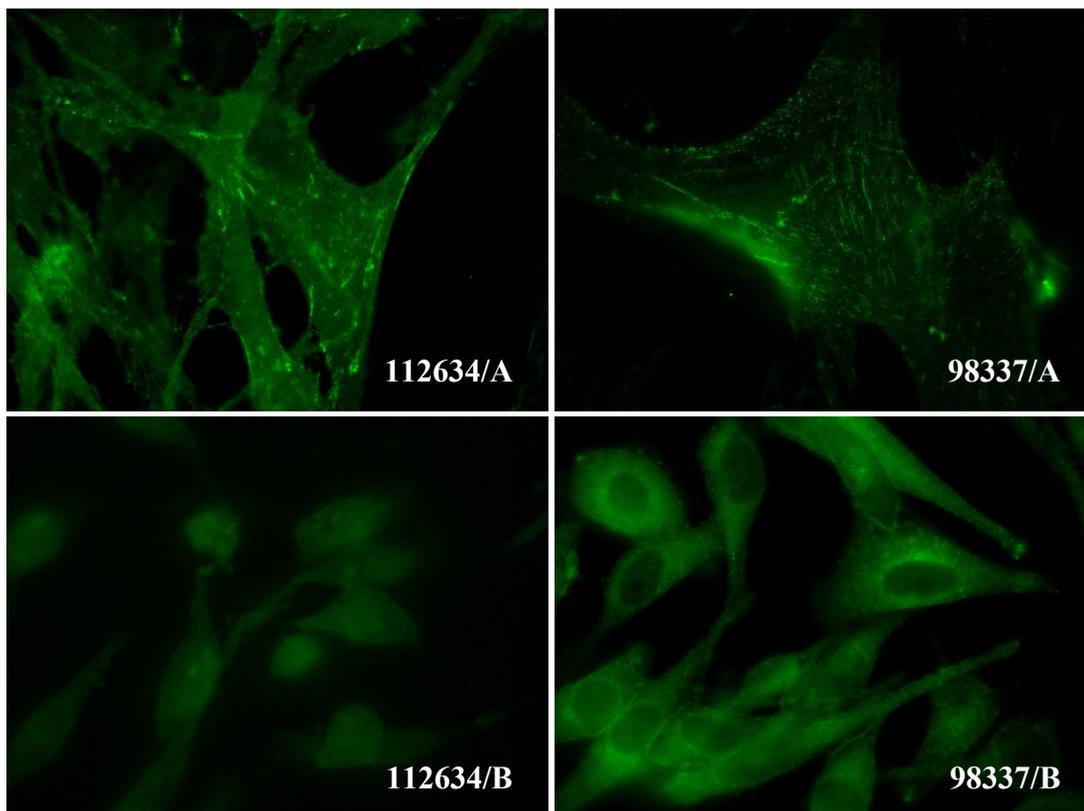


Figura 39
 Immagini al microscopio a fluorescenza: immunoreazione alla sub-unità integrinica Alfa5 nelle linee di metastasi.

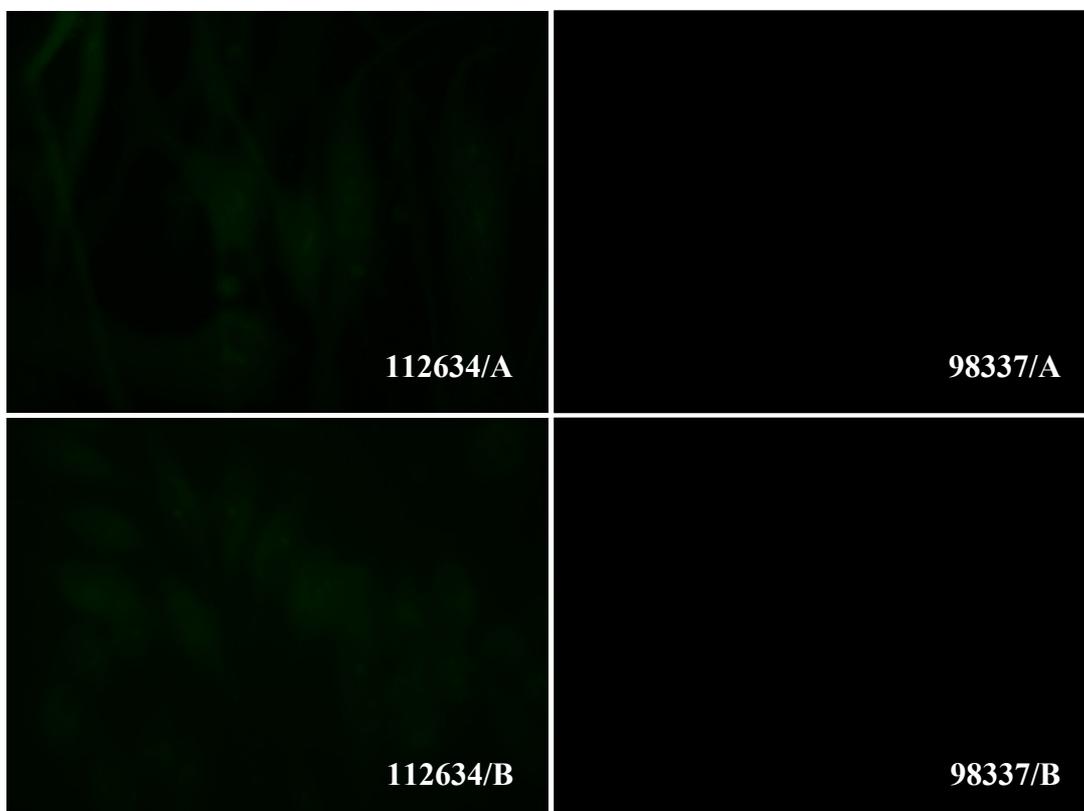


Figura 40
 Immagini al microscopio a fluorescenza: immunoreazione alla sub-unità integrinica Alfa6A nelle linee di metastasi.

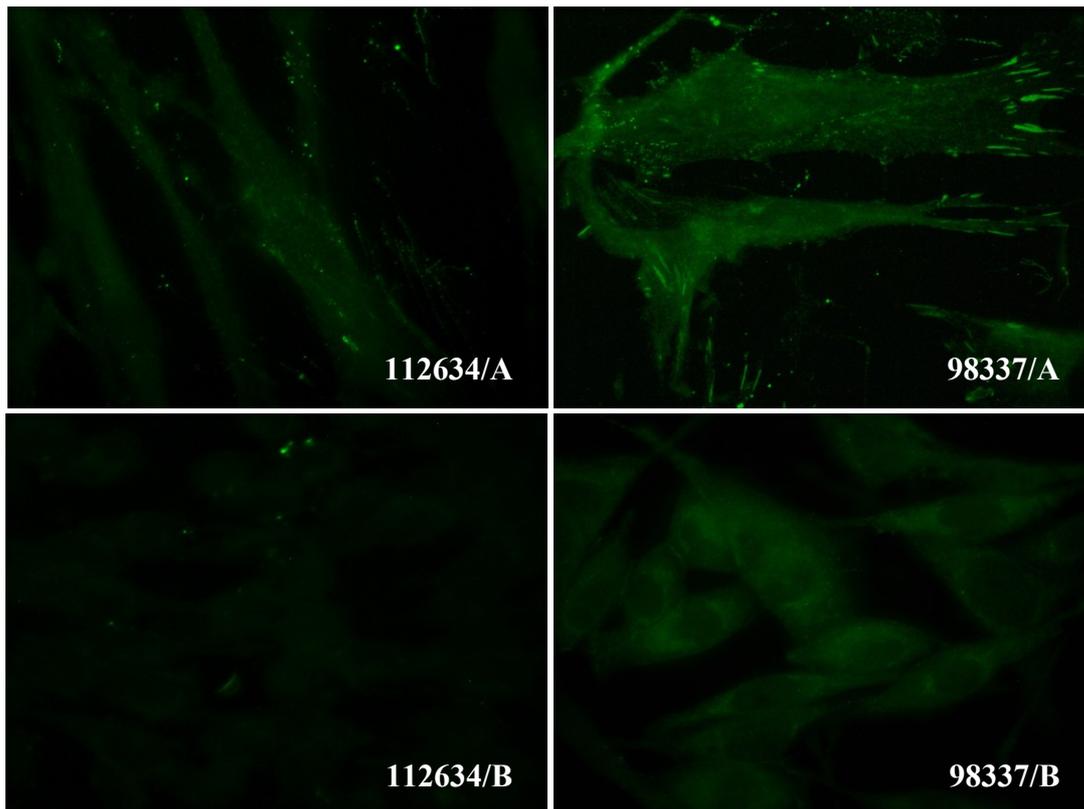


Figura 41
 Immagini al microscopio a fluorescenza: immunoreazione alla sub-unità integrinica AlfaV nelle linee di metastasi.

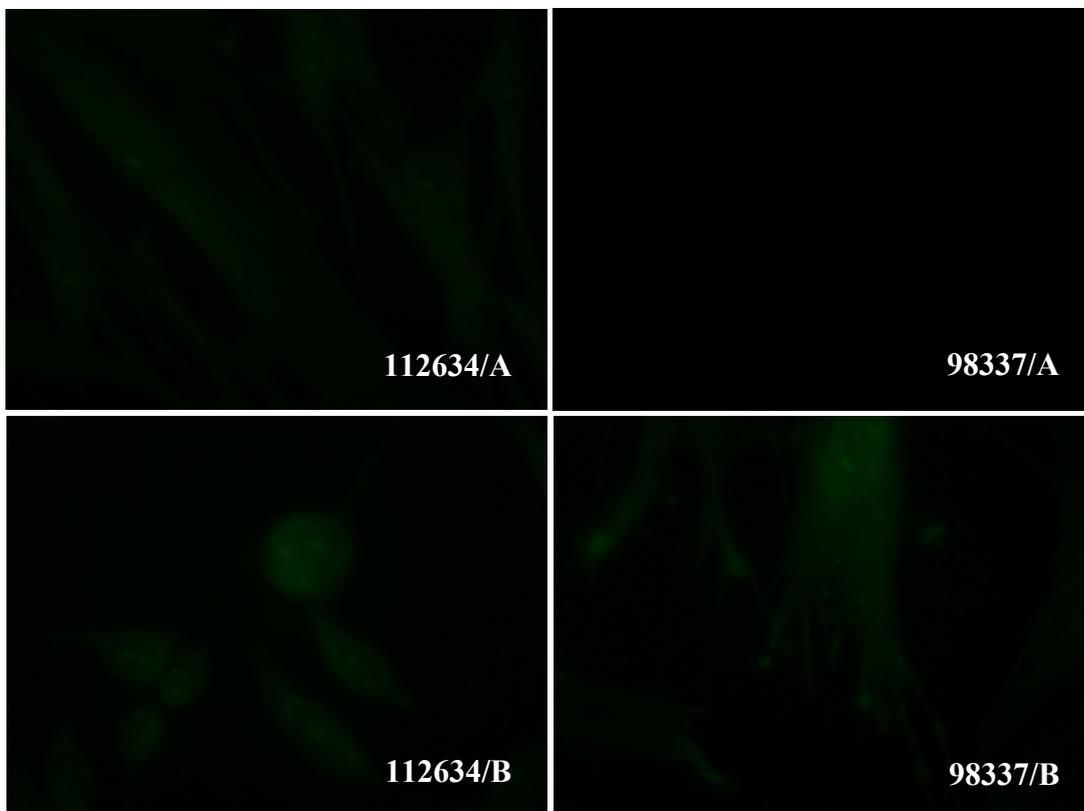


Figura 42
 Immagini al microscopio a fluorescenza: immunoreazione alla sub-unità integrinica Beta1 nelle linee di metastasi.

	112634/A	112634/B	98337/A	98337/B
Alfa 1	-	-	-	-
Alfa 2	++	-	++	-
Alfa 3 A	-	+	+++	++
Alfa 4	+	-	+	-
Alfa 5	+++	+	+++	+++
Alfa 6 A	-	-	-	-
Alfa V	+	-	++	+
Beta 1	-	-	-	-

Tabella 10

Risultati dell'analisi di immunofluorescenza per le sub-unità integriniche: l'intensità e la distribuzione della positività è indicata in una scala che va da “-” (negativo) a “+++” (positività molto intensa ed omogeneamente distribuita).

4.2.4 - Test di adesione cellulare

È stata testata la capacità cellulare di aderire ad alcune delle maggiori componenti molecolari della matrice extracellulare, in cellule 98337/A, 98337/B, 112634/A e 112634/B. I substrati di adesione utilizzati sono stati Fibronectina, Vitronectina, Laminina, Collagene I e Collagene VI.

Le cellule a crescita in sospensione risultavano avere minore affinità, rispetto alle cellule aderenti, per la fibronectina ed i collagene I e IV, mostrando nessuna adesione ai collagene ed una scarsa adesione sulla fibronectina.

Su substrati di vitronectina e laminina le quattro linee cellulari mostravano tutte un'adesione quasi o del tutto assente. [Fig. 43]

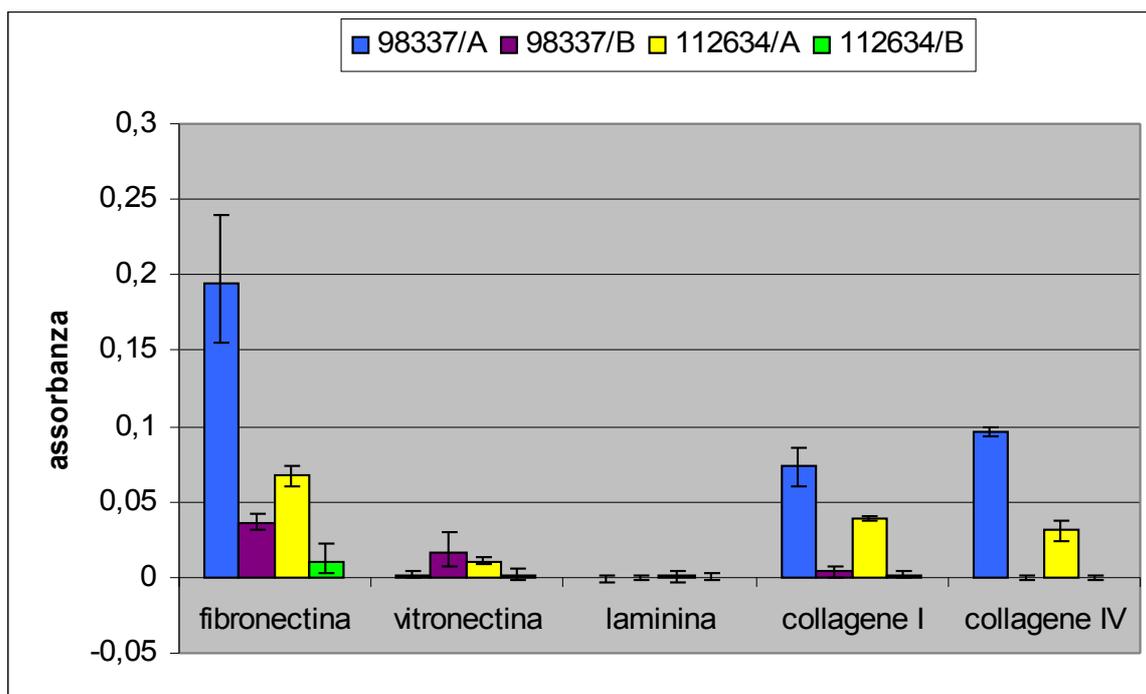


Figura 43
Rappresentazione grafica dei risultati del test di adesione cellulare. I valori di assorbanza sono direttamente proporzionali al numero di cellule aderenti al substrato.

4.2.5 - Test di invasività cellulare

Il test di invasività cellulare è stato condotto sulle quattro linee cellulari di metastasi, 98337/A, 98337/B, 112634/A e 112634/B. Il test saggia la capacità delle cellule di penetrare uno strato di MatriGel (un gel che mima la matrice extracellulare, essendo composto dalle stesse molecole di cui è composta quest'ultima) ed oltrepassarlo invadendo il comparto posto al di là di esso.

Le linee 98337/B e 112634/B, capaci di crescere in sospensione, dimostrano una maggiore capacità invasiva rispetto alle linee cellulari a crescita aderente. Particolarmente significativo il dato per le 112634/B, che risultano quasi 4 volte più invasive della linea di metastasi aderente corrispettiva (112634/A). [Fig. 44]

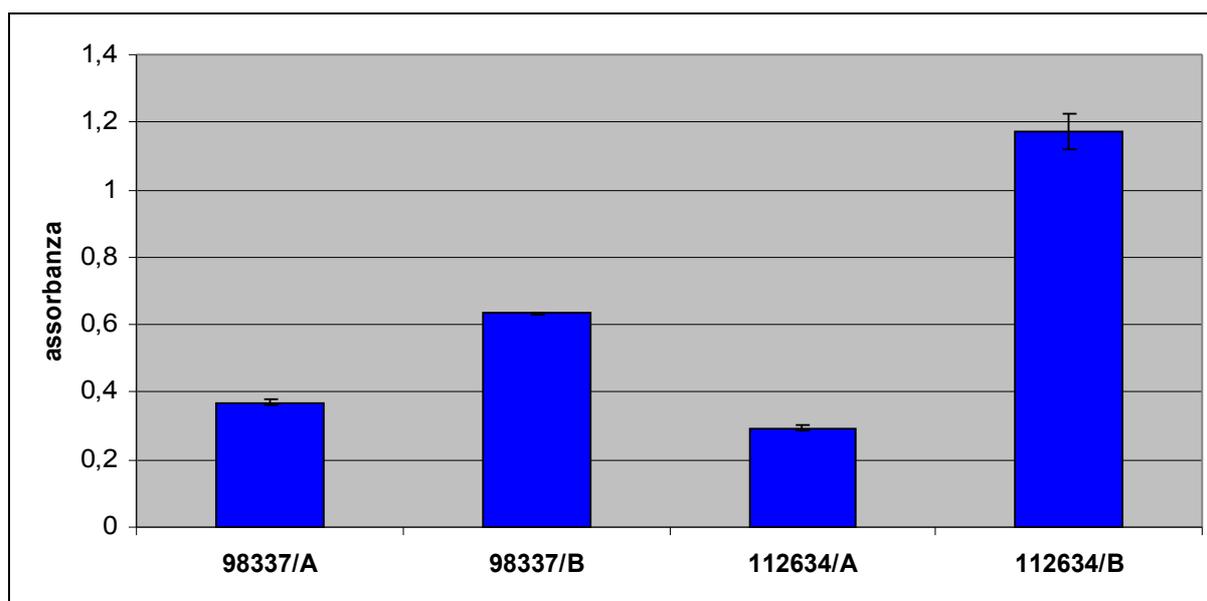


Figura 44

Rappresentazione grafica dei risultati del test di invasività cellulare. I valori di assorbanza sono direttamente proporzionali al numero di cellule che hanno penetrato ed oltrepassato lo strato di MatriGel.

4.2.6 - Immunocitochimica

L'immunocitochimica è stata utilizzata per studiare l'espressione di Ki67 e di TrkB nelle quattro linee cellulari di metastasi (98337/A, 98337/B, 112634/A e 112634/B).

Ki67 risultava essere positivo in tutte le quattro linee cellulari con intensità e distribuzione variabili: si osservava una positività molto intensa nel 100% delle 98337/B e delle 112634/B [Fig. 45-B, D], una positività moderata e focale nelle 98337/A [Fig. 45-A] ed una immunocolorazione diffusa ma aspecifica nelle 112634/A. [Fig. 45-C]

Le 98337/B e le 112634/B mostravano un'intensa positività per TrkB, mentre le 98337/A e le 112634/A risultavano avere solo una debole positività alla proteina. [Fig. 46]

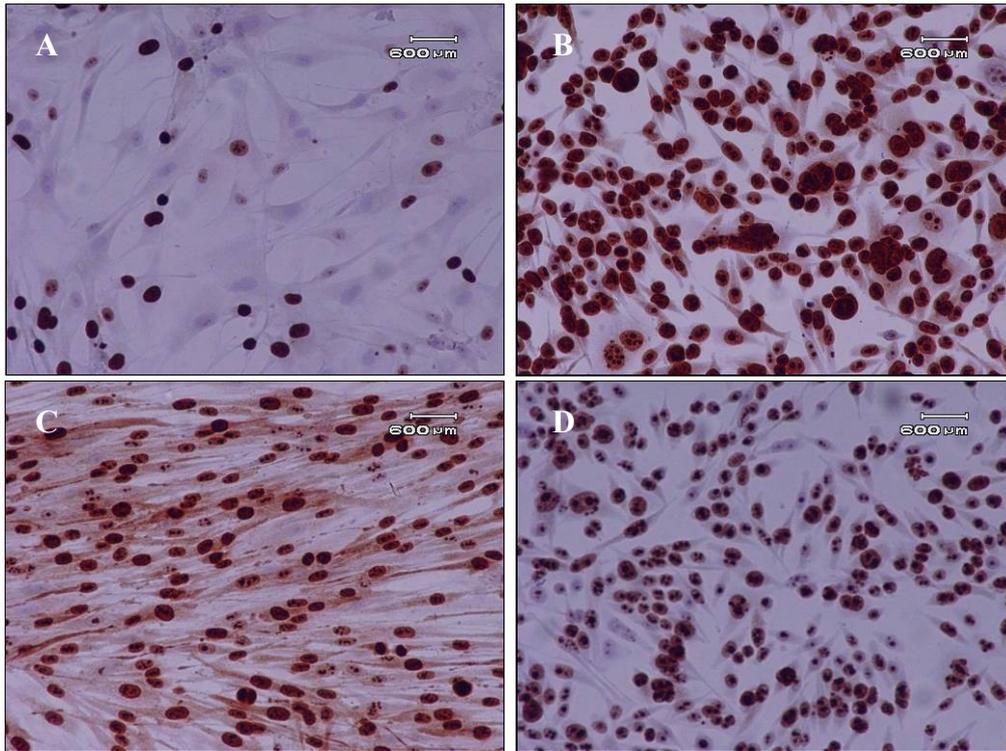
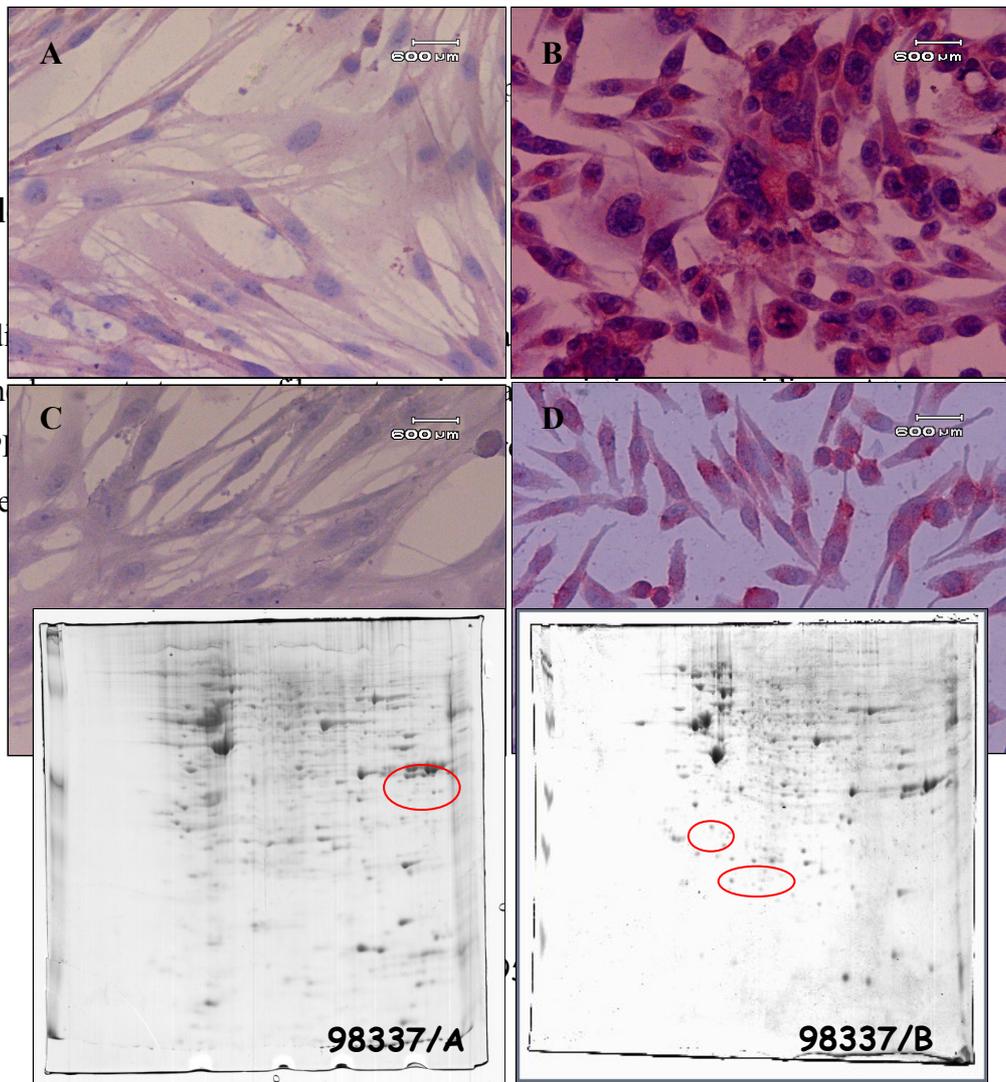


Figura 45
 Immagini al microscopio ottico: espressione proteica di Ki67 in 98337/A (A), 98337/B (B), 112634/A (C) e 112634/B (D). Presenza di reazioni aspecifiche a livello del citoplasma nelle 112634/A (C).

4.2.7 - ELISA

L'analisi di
 suspension
 software P
 differente e



esione ed in
 analisi del
 proteici con

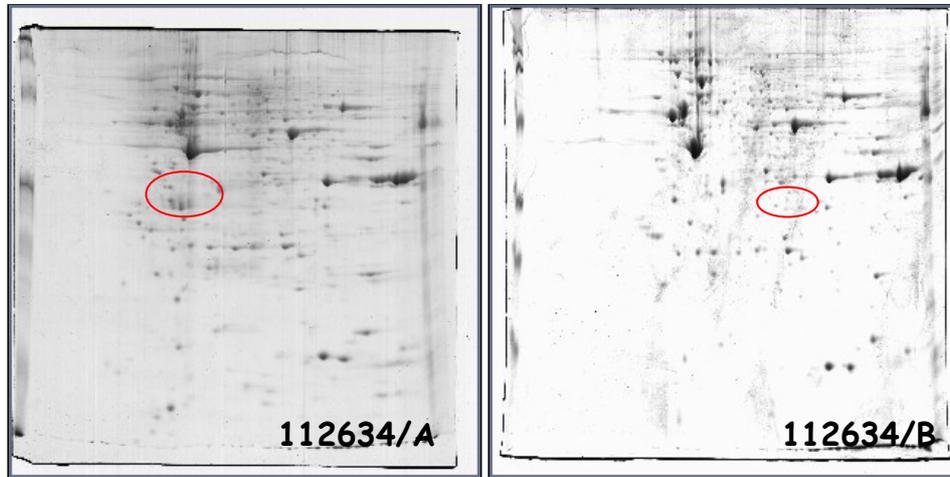


Figura 47

Scansione dei gels di elettroforesi bidimensionale per le due colture primarie di metastasi di IFM. Le ellissi rosse evidenziano alcune aree in cui sono visibili spots proteici differenzialmente espressi nei due campioni (come rilevato dal software d'analisi PDQuest).

5 - DISCUSSIONE

La ricerca in campo oncologico fa ormai un larghissimo utilizzo delle colture cellulari come modello del funzionamento della cellula tumorale *in vivo*; sebbene, i risultati non possano essere astratti *sic et simpliciter* all'organismo vivente senza una reale conferma con esperimenti *in vivo* o *ex vivo*. In molti casi, inoltre, l'utilizzo di colture cellulari primarie, derivate da prelievi chirurgici di tessuto tumorale, consente di studiare un assetto biomolecolare cellulare verosimilmente più vicino e paragonabile a quello della cellula neoplastica *in vivo*, rispetto alle colture cellulari stabilizzate commerciali, e di ridurre gli errori dovuti ai polimorfismi nelle analisi genetiche.

In questo studio, ho caratterizzato, per diversi aspetti, sei colture primarie da sarcomi delle parti molli. Si trattava di due gruppi distinti per istotipo, Istiocitoma Fibroso Maligno e Leiomiomasarcoma, ognuno costituito da tre colture cellulari: una da tumore primario (118485 negli IFM, 121397 nei LMS) e due da metastasi polmonari, delle quali una cresceva in adesione (98337/A negli IFM, 112634/A nei LMS) e l'altra cresceva in sospensione (98337/B negli IFM, 112634/B nei LMS).

Tutte le linee cellulari si mostravano attivamente proliferanti; tuttavia, la risposta alla stimolazione con fattori di crescita specifici (EGF e PDGF) risultava spesso scarsa e controversa.

Per altro, ho accertato il tasso di apoptosi nelle linee cellulari in studio: in nessuna delle sei colture cellulari la percentuale di apoptosi precoce e/o di necrosi sono risultate rilevanti, fugando così ogni dubbio anche sulla possibile natura apoptotica delle cellule in sospensione. Questo ha suggerito un'indagine più approfondita dello stato dei geni principalmente coinvolti nei processi apoptotici attraverso uno screening di espressione di mRNA. Tuttavia l'analisi non ha fornito un'indicazione precisa del meccanismo di resistenza alla morte cellulare programmata adottato da queste cellule, mostrando piuttosto una deregolazione su più livelli che coinvolgeva tutte le vie di segnalazione apoptotica.

Come riportato in letteratura, lo stimolo alla proliferazione mediato da EGFR è in grado di interferire nel meccanismo di morte cellulare programmata attraverso due chinasi chiave, ERK ed Akt. Queste due molecole possono mediare un segnale anti-apoptotico agendo direttamente o indirettamente sulle caspasi e sulle proteine della famiglia di Bcl2. [137, 178, 179] Partendo da queste evidenze, l'analisi dell'espressione proteica delle due molecole nelle sei linee cellulari in studio ha rivelato che in condizioni di base, ossia in colture non addizionate con fattori di crescita, il recettore per EGF era fosforilato e, quindi, stabilmente attivato e che le due chinasi a valle di

questo, ERK ed Akt, erano anch'esse nello stato fosforilato attivo. La somma di questi risultati conduceva verosimilmente all'idea che le cellule in studio, fossero esse di tumore primario o di metastasi, possedessero tutte molteplici alterazioni nei principali pathway molecolari tali da direzionarle stabilmente alla proliferazione proteggendole dalla minaccia apoptotica. In particolare, le due linee cellulari di metastasi che mostravano crescita in sospensione dovevano in qualche modo possedere resistenza all'anoikis, la morte cellulare programmata generata dalla mancanza di segnali di adesione. Negli ultimi anni ha destato molto interesse un recettore neurotrofico, TrkB, che mostra capacità di protezione delle cellule dall'anoikis e che sembra conferire anche proprietà invasive e metastatiche. [201, 202] Coerentemente con questi dati, le cellule 98337/B e 112634/B, che crescevano in sospensione, mostravano un'intensa espressione di TrkB; inoltre, nelle stesse cellule il marker proliferativo Ki67 risultava molto espresso, confermando anche in questi sistemi cellulari la relazione tra l'espressione del recettore neurotrofico e l'attiva proliferazione cellulare. Allo stesso modo, l'osservazione al microscopio elettronico aveva evidenziato, nelle cellule di metastasi, nucleoli grandi e prominenti e reticolo endoplasmatico rugoso molto sviluppato, entrambi chiari indici di un'attiva proliferazione cellulare.

Nella letteratura è riportato che, in alcuni tipi cellulari, EGFR ed integrine formano dei complessi cross-attivandosi, suggerendo che segnalazioni disaccoppiate provenienti da fattori di crescita e recettori della matrice potrebbero deregolare la sopravvivenza cellulare attraverso la dissociazione del segnale dei fattori di crescita dalle alterazioni del citoscheletro. [160, 161, 162, 163] Nel mio studio, le cellule di metastasi che crescevano in sospensione, sottoposte ad un saggio specifico, dimostravano una chiara incapacità di adesione alle molecole di cui è composta la matrice extracellulare, se si faceva eccezione per l'adesione modesta alla fibronectina. Inoltre, a conferma di ciò, si evidenziava un'espressione spesso assente delle sub-unità integriniche analizzate. Questi dati risultano altresì interessanti se si considera che in transfettanti stabili CHO (Chinese Hamster Ovary), esprimenti l'integrina $\alpha 5\beta 1$, l'adesione alla fibronectina, ma non quella alla vitronectina, conferisce protezione dall'apoptosi, come riportato da uno studio del 2001 [171]. Questa protezione correla con i livelli di espressione di Bcl2, che risulta regolato da FAK, Shc ed Akt, le quali potrebbero rispondere a specifiche integrine.

Curiosamente, le linee 98337/B e 112634/B, che crescevano in sospensione, presentavano popolazioni cellulari non omogenee, con cellule di forma comunque globosa, prolungamenti citoplasmatici quasi assenti e filamenti all'interno del citoplasma che si addensavano a formare dei fasci, le "placche dense". Queste stesse cellule dimostravano una notevole capacità invasiva attraverso un gel di molecole di matrice extracellulare, testata con un saggio specifico *in vitro*, confermando ancora una volta il loro alto potenziale maligno.

Due molecole individuate recentemente e poi caratterizzate nei laboratori dell'Università di Parma dalla Dottoressa Volpi (stimata collaboratrice) hanno destato il mio interesse per la loro capacità di provocare perdita dell'ancoraggio in cellule in cui ne era indotta l'overespressione. Si tratta di SDP35 e XTP1, due proteine RhoGAP che, però, contengono anche un dominio DEP. XTP1 è stato correlato alla cattiva prognosi ed al rischio di sviluppare metastasi nel tumore della mammella [130, 131], mentre SDP35 avrebbe questo stesso significato nel cancro della vescica [132]. L'analisi d'espressione dei due geni nelle linee cellulari utilizzate nel mio studio evidenziava una maggiore espressione (dell'ordine di migliaia di volte superiore) nelle 98337/B e 112634/B, le cellule di metastasi capaci di crescere in sospensione. L'overespressione di SDP35 e XTP1, negli esperimenti della Dottoressa Volpi, era capace di produrre la perdita delle fibre da stress e l'arrotondamento cellulare prima del distacco dal substrato; questo riarrangiamento del citoscheletro sembrava coincidere con quello presentato dalle cellule 98337/B e 112634/B (come riportato precedentemente in questo capitolo).

I tessuti di tumori primari e metastasi di Istiocitoma Fibroso Maligno e Leiomioma sarcoma collezionati nella Banca dei Tessuti del Laboratorio di Ricerca Oncologica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli mi hanno permesso di analizzare l'espressione dei due geni *ex vivo*, utilizzando come controllo un gruppo di tessuti sani (tessuto sano adiacente al tumore). Per quanto SDP35 e XTP1 risultassero overespressi sia nei primari che nelle metastasi rispetto al gruppo dei sani, il dato maggiormente rilevante era che le metastasi mostravano un aumento di espressione dei due geni estremamente significativo rispetto al gruppo dei tumori primari. Questi risultati forniscono una forte indicazione che le due molecole possano intervenire realisticamente *in vivo* nel conferimento delle caratteristiche di aggressività ed invasività delle cellule tumorali. Tuttavia, non esistono ad oggi evidenze negli studi di inoculazione in animali che possano confermare questa teoria. È, però, sorprendente ed incoraggiante che le cellule in sospensione di metastasi (98337/B e 112634/B), che esprimono una grandissima quantità di queste due molecole, mostrino un fenotipo del tutto simile a quelle cellule in cui l'espressione viene indotta forzatamente, indicando una stretta dipendenza tra questo fenotipo e l'espressione di SDP35 e XTP1. In ogni caso, SDP35 e XTP1 potrebbero essere i responsabili dei riarrangiamenti citoscheletrici e della perdita di adesione al substrato nelle cellule neoplastiche, ma non essere sufficienti di per se stessi a conferire nella sua totalità il fenotipo " metastatico" necessitando della coesistenza di altri fattori non ancora noti.

I sarcomi dei tessuti molli sono tumori le cui eziopatogenesi e diagnosi sono estremamente complesse; inoltre, la mortalità associata ai sarcomi delle parti molli è circa del 50%. Fino ad oggi sono stati identificati pochi determinanti affidabili dell'outcome clinico di questi tumori. E' quindi evidente la necessità di trovare dei marcatori molecolari che possano avere sia valore diagnostico

che prognostico; queste molecole dovrebbero essere in grado di facilitare la diagnosi differenziale, di predire con un certo grado di sicurezza il comportamento clinico ed in particolare la propensione dei tumori primari a sviluppare metastasi. Questi marcatori molecolari sarebbero di grande utilità clinica in quanto, permettendo di identificare i pazienti a maggiore rischio di malattia metastatica, aiuterebbero a selezionare strategie terapeutiche mirate.

In questa prospettiva si inquadrano gli studi di molecole più o meno note in campo oncologico, per identificare un loro possibile ruolo in queste neoplasie. Tra questi si colloca il sistema dell'attivatore urochinasi del plasminogeno (uPA) che sembra essere correlato alla progressione metastatica nelle neoplasie. Un recente studio effettuato dal gruppo in cui lavoro ha analizzato l'espressione genica di uPA ed uPAR (il recettore) in tessuti tumorali di IFM e LMS. [203] I risultati hanno mostrato soprattutto una maggiore espressione di uPA nei tumori rispetto ai sani ed una scarsa espressione di uPAR, sebbene di poco maggiore di quella dei sani. L'analisi immunohistochimica, nello studio, confermava i dati di espressione genica, mostrando solo pochissimi casi positivi per uPAR e con un'intensità debole. Allo stesso modo, le sei linee cellulari del mio studio mostravano overespressione di uPA ed un'espressione non differenziale di uPAR rispetto al pool di linfociti sani. Questo tentativo, insieme ad altri esperimenti all'interno del mio studio, mostrava che queste colture primarie, per le loro caratteristiche di similarità del sistema cellulare *in vivo*, possono rappresentare un valido modello per lo studio di queste neoplasie. Tuttavia, la difficoltà di maneggiamento e di mantenimento in coltura di queste linee, come per tutte le colture primarie, ne limita per certi aspetti l'utilizzo.

Un vasto campo d'indagine nella ricerca oncologica è quello dei rapporti del tumore con la matrice extracellulare e lo stroma del tessuto ospite. L'interazione tra le molecole di superficie della cellula neoplastica e le componenti della matrice o l'epitelio basale dei vasi costituisce un nodo cruciale nel processo di metastatizzazione. In questo senso, una molecola che si sta rivelando interessante è il proteoglicano di membrana NG2, il quale è in grado di interagire con il citoscheletro e la matrice extracellulare. [50] In particolare NG2 sembra prendere contatto con il collagene VI e la sua distribuzione appare correlata allo stato dinamico della cellula. Il proteoglicano potrebbe funzionare come un vero e proprio recettore per il collagene VI poiché dimostra di instaurare legami proteina-proteina con esso. La co-localizzazione delle due molecole è, infatti, stata dimostrata anche nel presente studio. Elevati livelli di espressione di NG2 sono stati osservati in alcuni tipi cellulari di tumori come melanomi, glioblastomi e condrosarcomi, suggerendo che il proteoglicano non è inibito da fenomeni di sotto-regolazione, come normalmente avviene in cellule sane, ma espresso abbondantemente in cellule tumorali, possa essere almeno in parte coinvolto in processi patologici e possa stimolare la proliferazione e metastatizzazione. [49] Coerentemente, nelle sei linee cellulari

utilizzate nel presente studio, l'espressione dei geni codificanti per NG2 e collagene VI risultavano overespressi rispetto ad un pool di linfociti sani. Questi dati suggerivano un possibile ruolo di queste molecole nella malignità di Istiocitoma Fibroso Maligno e Leiomiosarcoma. Anche in questa analisi l'espressione dei geni era significativamente più elevata nel tessuto tumorale rispetto al sano. Ma il dato più interessante era che le metastasi mostravano un'espressione di NG2 e CollageneVI maggiore rispetto a quella dei tumori primari. Questa differenza risultava significativa al test di Wilcoxon (per le mediane) e si manteneva significativa anche quando si analizzavano i gruppi tumorali suddividendoli per istotipo. L'espressione tissutale della proteina NG2 risultava anch'essa maggiore nelle metastasi rispetto ai tumori primari, suggerendo un possibile ruolo di questa molecola nella metastasi per se oltre che nella sua insorgenza. Inoltre, l'espressione di NG2 era strettamente correlata alla sopravvivenza ed i casi in cui il proteoglicano risultava più espresso mostravano una maggiore probabilità di sviluppare metastasi. NG2 potrebbe, dunque, assumere un ruolo nella pratica clinica come fattore prognostico indipendente (non risulta infatti correlato con altri parametri clinici) per individuare un gruppo di pazienti a maggior rischio che potrebbero beneficiare di un trattamento differenziato.

Un apporto significativo alla clinica di questi tumori potrebbe sicuramente derivare dall'approccio proteomico. In questa ottica, ho effettuato esperimenti di elettroforesi bidimensionale nelle 98337/A, 98337/B, 112634/A e 112634/B. I profili proteomici si mostravano differenti tra linee cellulari ed era possibile identificare nelle mappe particolari aree con spot proteici differenzialmente espressi. A questo punto l'analisi di spettrometria di massa di questi spot potrebbe rivelare molecole interessanti per la biologia di Istiocitoma Fibroso Maligno e Leiomiosarcoma; inoltre potrebbe svelare nuovi pattern molecolari coinvolti nel distacco dal substrato e nella sopravvivenza della cellula in mancanza di adesione. Sarà, ancora, interessante sviluppare questo approccio al fine di identificare la possibile via di segnalazione di SDP35 e XTP1 nelle cellule in sospensione e molecole coinvolte nell'acquisizione del fenotipo metastatico.

In conclusione, questo studio mostra l'importanza di poter disporre di modelli cellulari il più possibile vicini all'assetto molecolare della cellula tumorale *in vivo* ed apre una finestra su nuove molecole che potrebbero rappresentare il futuro nell'approccio clinico dei sarcomi delle parti molli. La prosecuzione di questi studi attraverso ulteriori approfondimenti e nuovi approcci sperimentali potrà sicuramente chiarire meglio il ruolo di molecole come SDP35 e XTP1 nelle dinamiche cellulari e, verosimilmente, rafforzare il potenziale prognostico di NG2 nei sarcomi. Tutto questo assume una particolare rilevanza nel campo dei sarcomi delle parti molli, che da sempre si vedono orfani di fattori diagnostici e prognostici specifici e di terapie cliniche mirate ed efficaci.

11 - BIBLIOGRAFIA

1. Cormier JN, Pollock RE, Soft Tissue Sarcomas; *CA Cancer J Clin* (2004), 54: 94-109
2. Campanacci M, "Soft Tissue Tumors"; *Piccin Nuova Libreria Editore Padova* (1999), 909-1199
3. Lee YF, John M *et al.*, A Gene Expression signature Associated With Metastatic Outcome in Human Leiomyosarcomas; *Cancer Res* (2004), 64: 7201-7204
4. Gibbs JF, Huang PP *et al.*, Malignant fibrous histiocytoma: an institutional review; *Cancer Invest* (2001), 19(1)
5. Fidler IJ, The Pathogenesis of Cancer Metastasis: the "Seed and Soil" Hypothesis Revisited; *Nature Rev Cancer* (2003), 3: 453-458
6. Price JP, Bonovich MT *et al.*, The biochemistry of cancer dissemination; *Crit Rev Biochem Mol Biol* (1997), 32:175-253
7. Duffy P, Proteases as a prognostic markers in cancer; *Clin Cancer Res* (1998), 2: 613-618;
8. Conese M, Blasi F, The urokinase/urokinase-receptor system and cancer invasion; *Baillieres Clin Haematol* (1995), 8: 365-389
9. Andreasen PA, Kjoller L *et al.*, The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis; *Int J Cancer* (1997), 72: 1-22
10. Choong PFM, Anne PW, Urokinase Plasminogen Activator System: A multifunction role in tumor progression and metastasis; *Clin Orthop Rel Res* (2003), 415: 46-58
11. Duffy MJ, Duggan C, The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer; *Clin Bioch* (2004), 37: 541-548
12. Duffy MJ, The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy; *Curr Pharm Des* (2004), 10: 39-49
13. Carmeliet P, Moons L *et al.*, Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinase during aneurysm formation; *Nat Gen* (1997), 17: 439-444
14. Rifkin DB, Cross-talk among proteases and matrix in the control of growth factor action; *Fibrinolysis Proteolysis* (1997), 11: 3-9
15. Blasi F, Carmeliet P *et al.*, uPAR : a versatile signalling orchestrator; *Nat Rev Mol Cell Biol* (2002), 3: 932-943

16. Ellis V, Behrendt N *et al.*, Plasminogen activation by receptor-bound urokinase: a kinetic study with both cell associated and isolated receptor; *J Biol Chem* (1991), 266: 12752-8
17. Sidenius N, Andolfo A *et al.*, Urokinase regulates vitronectin binding in vitro and in vivo by controlling receptor oligomerization; *J Biol Chem* (2002), 277: 27982-90
18. Andreasen PA, Georg B *et al.*, Plasminogen activator inhibitors: Hormonally regulated serpins; *Mol Cell Endocrinol* (1990), 68: 1-19
19. Silverman GA *et al.*, The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins; *J Biol Chem* (2001), 276: 33293-6
20. Schmitt M *et al.*, Clinical impact of plasminogen activator system in tumour invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy; *Thromb Haemost* (1997), 78: 285-296
21. Nykjaer A, Petersen CM, *et al.*, Purified alpha2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein binds plasminogen activator inhibitor type-1 complex. Evidence that the alpha2-macroglobulin receptor mediates cellular degradation of urokinase receptor-bound complexes; *J Biol Chem* (1992), 267: 14543-6
22. Fisher JL, Field CL *et al.*, Urokinase plasminogen activator system gene expression is increased in human breast carcinoma and its bone metastases: A comparison of normal breast tissue, non invasive and invasive carcinoma and osseous metastases; *Breast Cancer Res Treat* (2000), 61: 1-12
23. Foekens JA, Schmitt M *et al.*, Prognostic value of urokinase type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients; *Cancer Res* (1992), 7: 6101-6105
24. Kobayashi H, Fujiishiro S *et al.*, Impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type1 on prognosis in cervical cancer of the uterus; *Cancer Res* (1994), 54: 6539-6548
25. Buo L, Meling GI *et al.*, Antigen levels of urokinase plasminogen activator and its receptor at the tumor-host interface of colorectal adenocarcinomas are related to tumor aggressiveness; *Hum Pathol* (1995), 26: 1133-1138
26. Pedersen H, Brunner N *et al.*, Prognostic impact of urokinase, urokinase receptor, and type 1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue; *Cancer Res* (1994), 54: 4671-4675
27. Hofmann R, Lehmer A *et al.*, Prognostic value of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in renal cell cancer; *J Urol* (1996), 155: 858-862
28. Hasui Y, Marutsuka K *et al.*, The content of urokinase-type plasminogen activator antigen as a prognostic factor in urinary bladder cancer; *Int J Cancer* (2001), 50: 871-873

29. Choong PF, Fermo M *et al.*, Urokinase-plasminogen activator levels and prognosis in 69 soft-tissue sarcomas; *Int J Cancer* (1996), 69: 268-272
30. Duffy MJ, Maguire TM *et al.*, Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple type of cancer; *J Surg Oncol* (1999), 71: 130-135
31. Duffy MJ, Urokinase plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies; *Clin Chem* (2002), 48: 1194-1197
32. Janicke F *et al.*, For the German Chemo N_o Study Group. Randomized adjuvant Chemotherapy trial in high-risk node negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1; *J Natl Cancer Inst* (2001), 93: 913-20
33. Look MP, van Putten WLJ *et al.*, Pooled analysis of prognostic impact of tumor biological factor uPA and PAI-1 in 8377 breast cancer patients; *J Natl Cancer Inst* (2002), 94:116-28
34. Meijer-van Gelder ME, Peters HA *et al.*, Urokinase-type plasminogen activator (uPA) system in advanced breast cancer: associations with response to tamoxifen therapy; *Proc Am Assoc Cancer Res* (2003), 44: 751 [abstract no. 5377]
35. Harbeck N, Kates RE *et al.*, Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (N = 3424); *Cancer Res* (2002), 62: 4617-22
36. Guo Y, Higazi AA *et al.*, A peptide derived from the nonreceptor binding region of urokinase plasminogen activator (uPA) inhibits tumor progression and angiogenesis and induces tumor cell death in vivo; *FASES J* (2000), 14: 1400-1410
37. Mohan PM, Chintala SK *et al.*, Adenovirus-mediated delivery of antisense gene to urokinase-type plasminogen activator receptor suppresses glioma invasion and tumor growth; *Cancer Res* (1999), 59: 3369-3373
38. Kobayashi H, Gotoh J *et al.*, Inhibition of the metastasis of Lewis lung carcinoma by antibody against urokinase-type plasminogen activator in the experimental and spontaneous metastasis model; *Thromb Haemost* (1994), 71: 474-480
39. Jean D, Bar-Eli M, Targeting the ATF-1/CREB transcription factors by single chain Fv fragment in human melanoma: Potential modality for cancer therapy; *Crit Rev Immunol* (2001), 21: 275-286
40. Burgle M, Koppitz M *et al.*, Inhibition of the interaction of urokinase-type plasminogen activator (uPA) with its receptor (uPAR) by synthetic peptides; *Biol Chem* (1997), 378: 231-237

41. Hay, Cell biology of extracellular matrix; *New York: Plenum Press* (1981)
42. Bissell MJ, Hall HG *et al.*, How does the extracellular matrix direct gene expression?; *J Theor Biol* (1982), 99: 31-68
43. Specks U, Mayer U *et al.*, Structure of recombinant N-terminal globule of type VI collagen alpha 3 chain and its binding to heparin and hyaluronan; *EMBO J* (1992), 11: 4281-4290
44. Farinelli M, Matrice extracellulare: spunti di riflessione in oncologia; *Convegno dell'8 – 9 maggio 2004, Bologna. Divisione di Medicina Riabilitativa La Colletta ASL 3 Genovese, Centro di Bioingegneria, Università di Genova, Unità Operativa di Diagnostica Biomeccanica*;
45. Stallcup WB, The NG2 antigen, a putative lineage marker: immunofluorescent localisation in primary cultures of rat brain; *Dev Biol* (1981), 83: 154-165
46. Nishiyama A, Dahlin KJ *et al.*, The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan; *J Cell Biol* (1991), 114: 359-371
47. Levine JM, Nishiyama A, The NG2 chondroitin sulphate proteoglycan: a multifunctional proteoglycan associated with immature cells; *Perspect Dev Neurobiol* (1996), 3: 245-259
48. Plusche G, Vanek M *et al.*, Molecular cloning of a human melanoma-associated chondroitin sulphate proteoglycan; *Prot Natl Acad Sci USA* (1996), 93: 9710-9715
49. The journal of biological chemistry, vol 272, num.16 pp.10769-10776 (issue of april 18, 1997)
50. Stallcup WB, Dahlin K *et al.*, Interaction of the NG2 Chondroitin Sulphate Proteoglycan with Type VI Collagen; *J Cell Biol* (1990), 111: 3177-3188
51. Liotta LA, Cancer cell invasion e metastasis; *Sci Am* (1992), 266: 54-59
52. Price JP, Bonovich MT *et al.*, The biochemistry of cancer dissemination; *Crit Rev Biochem Mol Biol* (1997), 32: 175-253
53. Robbins, Le basi patologiche delle malattie; *Piccin* (2000), vol. 1, cap.7, 275-317
54. Nishiyama A, Stallcup WB, Expression of the NG2 Proteoglycan Causes Retention of Type VI Collagen on the Cell Surface; *Mol Biol Cell* (1997), 4: 1097-1108
55. Lin XH, Dahlin K *et al.*, Interaction of the NG2 proteoglycan with the actin cytoskeleton; *J Cell Biochem* (1996), 63: 463-477
56. Bernards A, GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila; *Biochim Biophys Acta* (2003), 1603: 47-82
57. Peck J, Douglas GT *et al.*, Human RhoGAP domain-containing proteins: structure, function and evolutionary relationships; *FEBS Lett* (2002), 528: 27-34

58. Kandpal RP, Rho GTPase activating proteins in cancer phenotypes; *Curr Protein Pept Sci* (2006), 7: 355-365
59. Moon SY, Zheng Y, Rho GTPase-activating proteins in cell regulation; *Trends Cell Biol* (2003), 13: 13-22
60. Rittinger K, Taylor WR, Support for shared ancestry of GAPs; *Nature* (1998), 392: 448-449
61. Tcherkezian J, Lamarche-Vane N, Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins; *Biol Cell* (2007), 99: 67-86
62. Aspenstrom P, Fransson A *et al.*, Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system; *Biochem J* (2004), 377: 327-337
63. Li G, Zhang XC, GTP hydrolysis mechanism of Ras-like GTPases; *J Mol Biol* (2004), 340: 921-932
64. Brandao MM, Silva-Brandao KL *et al.*, Phylogenetic analysis of RhoGAP domain-containing proteins; *Genomics Proteomics Bioinformatics* (2006), 4: 182-188
65. Schmidt A, Hall A, Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch; *Genes Dev* (2002), 16: 1587-1609
66. Vincent S, Settleman J, Inhibition of RhoGAP activity is sufficient for the induction of Rho-mediated actin reorganization; *Eur J Cell Biol* (1999), 78: 539-548
67. Cismowski MJ, Ma C *et al.*, Activation of heterotrimeric G-protein signaling by a ras-related protein. Implications for signal integration; *J Biol Chem* (2000), 275: 23421-23424
68. Fenwick C, Na SY *et al.*, A subclass of Ras proteins that regulate the degradation of IkkappaB; *Science* (2000), 287: 869-873
69. Allen KM, Gleeson JG *et al.*, PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation; *Nat Genet* (1998), 20: 25-30
70. Billuart P, Bienvenu T *et al.*, Oligophrenin 1 encodes a rho-GAP protein involved in X-linked mental retardation; *Pathol Biol (Paris)* (1998), 46: 678
71. Eerola I, Boon LM *et al.*, Capillary malformation-arteriovenous malformation, a new clinical and genetic disorder caused by RASA1 mutations; *Am J Hum Genet* (2003), 73: 1240-1249
72. Faucherre A, Desbois P *et al.*, Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with Rac GTPase in the trans-Golgi network; *Hum Mol Genet* (2003), 12: 2449-2456
73. Henkemeyer M, Rossi DJ *et al.*, Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein; *Nature* (1995), 377: 695-701
74. Barbacid M, ras genes; *Annu Rev Biochem* (1987), 56: 779-827

75. Bos JL, ras oncogenes in human cancer: a review; *Cancer Res* (1989), 49: 4682-4689
76. Lyons J, Landis CA *et al.*, Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science* (1990), 249: 655-659
77. Kobayashi H, Suzuki M *et al.*, Genetic down-regulation of phosphoinositide 3-kinase by bikunin correlates with suppression of invasion and metastasis in human ovarian cancer HRA cells; *J Biol Chem* (2004), 279: 6371-6379
78. Borkhardt A, Bojesen S *et al.*, The human GRAF gene is fused to MLL in a unique t(5;11) (q31;q23) and both alleles are disrupted in three cases of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia with a deletion 5q; *Proc Natl Acad Sci USA* (2000), 97: 9168-9173
79. Yang C, Liu Y *et al.*, Rac-GAP-dependent inhibition of breast cancer cell proliferation by {beta}2-chimerin; *J Biol Chem* (2005), 280: 24363-24370
80. Goodison S, Yuan J *et al.*, The RhoGAP protein DLC-1 functions as a metastasis suppressor in breast cancer cells; *Cancer Res* (2005), 65: 6042-6053
81. Carles A, Millon R *et al.*, Head and neck squamous cell carcinoma transcriptome analysis by comprehensive validated differential display; *Oncogene* (2006), 25: 1821-1831
82. Wang DZ, Nur EKMS *et al.*, The GTPase and Rho GAP domains of p190, a tumor suppressor protein that binds the M(r) 120,000 Ras GAP, independently function as anti-Ras tumor suppressors; *Cancer Res* (1997), 57: 2478-2484
83. Wang L, Yang L *et al.*, A novel strategy for specifically down-regulating individual Rho GTPase activity in tumor cells; *J Biol Chem* (2003), 278: 44617-44625
84. Lu KH, Patterson AP *et al.*, Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis; *Clin Cancer Res* (2004), 10: 3291-3300
85. Zarubin T, Jing Q *et al.*, Identification of eight genes that are potentially involved in tamoxifen sensitivity in breast cancer cells; *Cell Res* (2005), 15: 439-446
86. Nagaraja GM, Kandpal RP, Chromosome 13q12 encoded Rho GTPase activating protein suppresses growth of breast carcinoma cells, and yeast two-hybrid screen shows its interaction with several proteins; *Biochem Biophys Res Commun* (2004), 313: 654-665
87. Leung TH, Ching YP *et al.*, Deleted in liver cancer 2 (DLC2) suppresses cell transformation by means of inhibition of RhoA activity; *Proc Natl Acad Sci USA* (2005), 102: 15207-15212
88. Chakravarty G, Roy D *et al.*, P190-B, a Rho-GTPase-activating protein, is differentially expressed in terminal end buds and breast cancer; *Cell Growth Differ* (2000), 11: 343-354

89. Lim KH, Baines AT *et al.*, Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells; *Cancer Cell* (2005), 7: 533-545
90. Fujii N, Hiraki A *et al.*, Expression of minor histocompatibility antigen, HA-1, in solid tumor cells; *Transplantation* (2002), 73: 1137-1141
91. Hjortland GO, Lillehammer T *et al.*, Plasminogen activator inhibitor-1 increases the expression of VEGF in human glioma cells; *Exp Cell Res* (2004), 294: 130-139
92. Ponting CP, Bork P, Pleckstrin's repeat performance: a novel domain in G-protein signaling?; *Trends Biochem Sci* (1996), 21: 245-246
93. Ponting CP, Schultz J *et al.*, SMART: identification and annotation of domains from signaling and extracellular protein sequences; *Nucleic Acids Res* (1999), 27: 229-232
94. Burchett SA, Flanary P *et al.*, Regulation of stress response signaling by the N-terminal dishevelled/EGL-10/pleckstrin domain of Sst2, a regulator of G protein signaling in *Saccharomyces cerevisiae*; *J Biol Chem* (2002), 277: 22156-22167
95. Schultz J, Milpetz F *et al.*, SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains; *Proc Natl Acad Sci USA* (1998), 95: 5857-5864
96. Welch HC, Coadwell WJ *et al.*, P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P₃- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac; *Cell* (2002), 108: 809-821
97. Civera C, Simon B *et al.*, Structure and dynamics of the human pleckstrin DEP domain: distinct molecular features of a novel DEP domain subfamily; *Proteins* (2005), 58: 354-366
98. Axelrod JD, Miller JR *et al.*, Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wntless signaling pathways; *Genes Dev* (1998), 12: 2610-2622
99. Boutros M, Paricio N *et al.*, Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signalling; *Cell* (1998), 94: 109-118
100. Li L, Yuan H *et al.*, Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells; *J Biol Chem* (1999), 274: 129-134
101. Moriguchi T, Kawachi K *et al.*, Distinct domains of mouse dishevelled are responsible for the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation and the axis formation in vertebrates; *J Biol Chem* (1999), 274: 30957-30962
102. Wharton KA Jr. Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction; *Dev Biol* (2003), 253: 1-17

103. Pan WJ, Pang SZ *et al.*, Characterization of function of three domains in dishevelled-1: DEP domain is responsible for membrane translocation of dishevelled-1; *Cell Res* (2004), 14: 324-330
104. Cong F, Schweizer L *et al.*, Casein kinase Iepsilon modulates the signaling specificities of dishevelled; *Mol Cell Biol* (2004), 24: 2000-2011
105. Wallingford JB, Habas R, The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity; *Development* (2005), 132: 4421-4436
106. Wong HC, Mao J *et al.*, Structural basis of the recognition of the dishevelled DEP domain in the Wnt signaling pathway; *Nat Struct Biol* (2000), 7: 1178-1184
107. Hu G, Wensel TG, R9AP, a membrane anchor for the photoreceptor GTPase accelerating protein, RGS9-1; *Proc Natl Acad Sci USA* (2002), 99: 9755-9760
108. Hu G, Wensel TG, R9AP, a membrane anchor for the photoreceptor GTPase accelerating protein, RGS9-1; *Proc Natl Acad Sci USA* (2003), 99: 9755-9760
109. Martemyanov KA, Lishko PV *et al.*, The DEP domain determines subcellular targeting of the GTPase activating protein RGS9 in vivo; *J Neurosci* (2003), 23: 10175-10181
110. Martemyanov KA, Yoo PJ *et al.*, R7BP, a novel neuronal protein interacting with RGS proteins of the R7 family; *J Biol Chem* (2005), 280: 5133-5136
111. Hunt RA, Edris W *et al.*, Snapin interacts with the N-terminus of regulator of G protein signaling 7; *Biochem Biophys Res Commun* (2003), 303: 594-599
112. de Rooij J, Rehmann H *et al.*, Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs; *J Biol Chem* (2000), 275: 20829-20836
113. Qiao J, Mei FC *et al.*, Cell cycle-dependent subcellular localization of exchange factor directly activated by cAMP; *J Biol Chem* (2002), 277: 26581-26586
114. Kooor A, Seyffarth P *et al.*, D2 dopamine receptors colocalize regulator of G-protein signaling 9-2 (RGS9-2) via the RGS9 DEP domain, and RGS9 knock-out mice develop dyskinesias associated with dopamine pathways; *J Neurosci* (2005), 25: 2157-2165
115. Chatterjee TK, Fisher RA, Mild heat and proteotoxic stress promote unique subcellular trafficking and nucleolar accumulation of RGS6 and other RGS proteins. Role of the RGS domain in stress-induced trafficking of RGS proteins; *J Biol Chem* (2003), 278: 30272-30282
116. Hill K, Krugmann S *et al.*, Regulation of P-Rex1 by phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate and Gbetagamma subunits; *J Biol Chem* (2005), 280: 4166-4173
117. Ballon DR, Flanary PL *et al.*, DEP-domain-mediated regulation of GPCR signaling responses; *Cell* (2006), 126: 1079-1093

118. Chen S, Hamm HE, DEP domains: More than just membrane anchors; *Dev Cell* (2006), 11: 436-438
119. Aepfelbacher M, Vauti F *et al.*, Spreading of differentiating human monocytes is associated with a major increase in membrane-bound CDC42; *Proc Natl Acad Sci USA* (1994), 91: 4263-4267
120. Gutjahr MC, Rossy J *et al.*, Role of Rho, Rac, and Rho-kinase in phosphorylation of myosin light chain, development of polarity, and spontaneous migration of Walker 256 carcinosarcoma cells; *Exp Cell Res* (2005), 308: 422-438
121. Seasholtz TM, Radeff-Huang J *et al.*, Rho-mediated cytoskeletal rearrangement in response to LPA is functionally antagonized by Rac1 and PIP2; *J Neurochem* (2004), 91: 501-512
122. Tkach V, Bock E *et al.*, The role of RhoA in the regulation of cell morphology and motility; *Cell Motil Cytoskeleton* (2005), 61: 21-33
123. Guo F, Debidda M *et al.*, Genetic deletion of Rac1 GTPase reveals its critical role in actin stress fiber formation and focal adhesion complex assembly; *J Biol Chem* (2006), 281: 18652-18659
124. Olivo C, Vanni C *et al.*, Distinct involvement of cdc42 and RhoA GTPases in actin organization and cell shape in untransformed and Dbl oncogene transformed NIH3T3 cells; *Oncogene* (2000), 19: 1428-1436
125. Chamberlain MD, Berry TR *et al.*, The p85alpha subunit of phosphatidylinositol 3'-kinase binds to and stimulates the GTPase activity of Rab proteins; *J Biol Chem* (2004), 279: 48607-48614
126. Low BC, Seow KT *et al.*, Evidence for a novel Cdc42GAP domain at the carboxyl terminus of BNIP-2; *J Biol Chem* (2000), 275: 14415-14422
127. Daumke O, Weyand M *et al.*, The GTPase-activating protein Rap1GAP uses a catalytic asparagine; *Nature* (2004), 429: 197-201
128. Goldberg J, Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatamer in GTP hydrolysis; *Cell* (1999), 96: 893-902
129. Seewald MJ, Korner C *et al.*, RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger; *Nature* (2002), 415: 662-666
130. Boudreau HE, Broustas CG *et al.*, Expression of BRCC3, a novel cell cycle regulated molecule, is associated with increased phospho-ERK and cell proliferation; *Int J Mol Med* (2007), 19: 29-39

131. Nicassio F, Bianchi F *et al.*, A cancer-specific transcriptional signature in human neoplasia; *J Clin Invest* (2005), 115: 3015-3025
132. Kanehira M, Harada Y *et al.*, Involvement of upregulation of DEPDC1 (DEP domain containing 1) in bladder carcinogenesis; *Oncogene* (2007), 26: 6448-6455
133. Kimball J, Kimball's Biology Pages, cap. "Apoptosis", "Cancer"; online <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/>
134. Zakeri Z, Lockshin RA, Cell death during development; *J Immunol Met* (2002), 265: 3-20
135. *Nature Cell Biology*, issue 2002 June
136. *Biochem Biophys Res*, issue 2003 May
137. Frisch SM, Screaton RA, Anoikis mechanisms; *Curr Opin Cell Biol* (2001), 13: 555-562
138. Frisch SM, Francis H, Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis; *J Cell Biol* (1994), 124: 619-626
139. Meredith J Jr, Fazeli B *et al.*, The extracellular matrix as a serviva factor; *Mol Biol Cell* (1993), 4: 953-961
140. Yawata A, Adachi M *et al.*, Prolonged cell serviva enhances peritoneal dissemination of gastric cancer cells; *Oncogene* (1999), 16: 2681-2686
141. Streuli CH, Gilmore AP, Adhesion-mediated signaling in the regulation of mammary epithelial cell survival; *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (1999), 4: 183-191
142. Shanmugathan M, Jothy S, Apoptosis, anoikis and their relevance to the pathobiology of colon cancer; *Pathol Int* (2000), 50: 273-279
143. Cao L, Yao Y *et al.*, Epidermal growth factor induces cell cycle arrest and apoptosis of squamous carcinoma cells through reduction of cell adhesion; *J Cell Biochem* (2000), 77: 569-583
144. Kottke T, Blajeski A *et al.*, Comparison of paclitaxel, 5FU- and EGF-induced apoptosis: evidence for EGF-induced anoikis; *J Biol Chem* (1999), 274:15927-15936
145. Petieler E, Stromblad S *et al.*, Integrin $\alpha\beta3$ promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor growth survival; *Cancer Res* (1999), 59: 2724-2730
146. Hu Z, Sanchez-Sweetman O *et al.*, Anoikis and metastatic potential of cloudman S91 melanoma cells; *Cancer Res* (2001), 61: 1707-1716
147. Bofonco E, Chen W *et al.*, $\beta1$ integrin antagonism on adherent, differentiated human neuroblastoma cells triggers an apoptotic signaling pathway; *Neuroscience* (2000), 101: 1145-1152
148. Giancotti F, Ruoslanti E, Integrin signaling; *Science* (1999), 285: 1028-1035

149. Aplin AE, Howe AK *et al.*, Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth; *Curr Opin Cell Biol* (1999), 11: 737-744
150. Dedhar S, Cell-substrate interactions and signaling through ILK; *Curr Opin Cell Biol* (2000), 12: 250-256
151. Persad S, Attwell S *et al.*, Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells; *Proc Natl Acad Sci USA* (2000), 97: 3207-3212
152. Persad S, Attwell S *et al.*, Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343; *J Biol Chem* (2001), 276: 27462-27469
153. Attwell S, Roskelle C *et al.*, The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis; *Oncogene* (2000), 19: 3811-3815
154. Kiyokawa E, Hashimoto Y *et al.*, Evidence that DOCK 180 up-regulates signals from the CrkII-p130(Cas) complex; *J Biol Chem* (1998), 273: 24479-24484
155. Sonoda Y, Matsumoto Y *et al.*, Anti-apoptotic role of FAK: induction of inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis suppression by the overexpression of FAK in a human leukemic cell line, HL60; *J Biol Chem* (2000), 273: 16309-16315
156. Gu H, Maeda H *et al.*, New role for Shc in activation of the PI3K/Akt pathway; *Mol Cell Biol* (2000), 20: 7109-7120
157. Valentinis B, Morrione A *et al.*, Anti-apoptotic signaling of the IGF-I receptor in fibroblasts following loss of matrix adhesion; *Oncogene* (2000), 18: 1827-1836
158. Yu J, Foster R *et al.*, Transcriptional repression by Rb-E2F and regulation of anchorage-independent survival; *Mol Cell Biol* (2001), 21: 3325-3335
159. Farrelly N, Lee Y *et al.*, ECM regulates apoptosis in mammary epithelium through a control on insulin signaling; *J Cell Biol* (1999), 144: 1337-1348
160. Moro L, Venturino M *et al.*, Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival; *EMBO J* (1998), 17: 6622-6632
161. Sieg DJ, Hauck CR *et al.*, FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration; *Nat Cell Biol* (2000), 2: 249-256
162. Agochiya M, Brunton VG *et al.*, Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells; *Oncogene* (1999), 18: 5646-5653
163. Frisch S, Vuori K *et al.*, Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase; *J Cell Biol* (1998), 134: 793-799

164. Borges E, Jan Y *et al.*, Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain; *J Biol Chem* (2000), 275: 39867-39873
165. Bachelder RE, Ribick MJ *et al.*, p53 inhibits $\alpha 6\beta 4$ integrin survival signaling by promoting the caspase3-dependent cleavage of AKT/PKB; *J Cell Biol* (1999), 147: 1063-1072
166. Datta SR, Brunet A *et al.*, Cellular survival: a play in three Akts; *Genes Dev* (1999), 13: 2905-2927
167. Tang Y, Zhou H *et al.*, The Akt proto-oncogene links ras to Pak and cell survival signals; *J Biol Chem* (2000), 275: 9106-9109
168. Schurmann A, Mooney AF *et al.*, p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protect cells from apoptosis; *Mol Cell Biol* (2000), 20: 453-461
169. Gnesutta N, Qu J *et al.*, The serine/threonine kinase PAK4 prevents caspase activation and protects cells from apoptosis; *J Biol Chem* (2001), 276: 14414-14419
170. Brunet A, Park J *et al.*, Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the Forkhead transcription factor FKHRL1; *Mol Cell Biol* (2001), 21: 952-965
171. Matter M, Ruoslahti E, A signaling pathway from the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 3\beta 3$ integrins that elevates bcl-2 transcription; *J Biol Chem* (2001), 276: 27757-27763
172. Tran S, Holmstrom T *et al.*, MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from FAS, TNF and TRAIL receptors; *J Biol Chem* (2001), 276: 16484-16490
173. Wang HG, Rapp UR *et al.*, Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria; *Cell* (1996), 87: 629-638
174. Matsuzawa S, Takayama S *et al.*, p53-inducible human homologue of Drosophila Siah inhibits cell growth: suppression by BAG-1; *EMBO J* (1998), 17: 2736-2747
175. Chaudhary A, King WG *et al.*, Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338; *Curr Biol* (2000), 10: 551-554
176. Yoshii S, Tanaka M *et al.*, alphaPIX nucleotide exchange factor is activated by interaction with phosphatidylinositol 3-kinase; *Oncogene* (1999), 18: 5680-5690
177. Schulze A, Lehmann K *et al.*, Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells; *Genes Dev* (2001), 15: 981-994
178. Jost M, Huggett TM *et al.*, Matrix-independent survival of human keratinocytes through an EGF receptor/MAPK-kinase-dependent pathway; *Mol Biol Cell* (2001), 12: 1519-1527
179. Aplin AE, Stewart SA *et al.*, Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1; *J Cell Biol* (2001), 153: 273-282

180. McFall A, Ülkü A *et al.*, Oncogenic Ras blocks anoikis by activation of a novel effector pathway independent of Phosphatidylinositol 3-kinase; *Mol Cell Biol* (2001), 21: 5488-5499
181. Frisch SM, Vuori K *et al.*, A role for Jun-N-terminal kinase in anoikis; suppression by bcl-2 and crmA; *J Cell Biol* (1996), 135:1377-1382
182. Tournier C, Hess P *et al.*, Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway; *Science* (2000), 288: 870-874
183. Rytömaa M, Lehmann K *et al.*, Matrix detachment induce caspase-dependent cytochrome c release from mitochondria: inhibition by PKB/Akt but not Raf signaling; *Oncogene* (2000), 19: 4461-4468
184. Almeida EA, Ilic D *et al.*, Matrix survival signaling : from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase ; *J Cell Biol* (2000), 149: 741-754
185. Oktay M, Wary KK *et al.*, Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH2-terminal kinase and progression through G1 phase of the cell cycle; *J Cell Biol* (1999), 145: 1461-1469
186. Marti A, Luo Z *et al.*, Actin-binding protein-280 binds the stress-activated protein kinase (SAPK) activator SEK-1 and is required for tumor necrosis factor-alpha activation of SAPK in melanoma cells; *J Biol Chem* (1997), 272: 2620-2628
187. Browne KA, Johnstone RW *et al.*, Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis; *J Biol Chem* (2000), 275: 39262-39266
188. Otto I, Raabe T *et al.*, The p150-Spir proteins provides a link between JNK function and actin reorganization; *Curr Biol* (1999), 10: 345-348
189. Nagat K, Puls A *et al.*, The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubuls and associates with the kinesin superfamily motor KIF3; *EMBO J* (1998), 17: 149-158
190. Strasser A, Puthalakath H *et al.*, The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control; *Ann New York Acad Sci* (2000), 917: 541-548
191. Puthalakath H, Huang DC *et al.*, The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex; *Mol Cell* (1999), 3: 287-296
192. Puthalakath H, Villunger A *et al.*, Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis.; *Science* (2001), 293: 1829-1832

193. Caulin C, Ware C *et al.*, Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis; *J Cell Biol* (2000), 149: 17-22
194. Stegh A, Herrmann H *et al.*, Identification of the cytolinker protein plectin as a major early *in vivo* substrate for caspase 8 during CD95- and TNF-mediated apoptosis; *Mol Cell Biol* (2000), 20: 5665-5679
195. Conoglio S, Jou T *et al.*, Rac1 protects epithelial cells against anoikis; *J Biol Chem* (2001), 276: 28113-28120
196. Howe A, Juliano R, Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase; *Nat Cell Biol* (2000), 2: 593-600
197. Dransfield DT, Bradford AJ *et al.*, Ezrin is a cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring protein; *EMBO J* (1997), 16: 35-43
198. Frisch S, Evidence for a function of death receptor-related, death-domain-containing proteins in anoikis; *Curr Biol* (1999), 9: 1047-1049
199. Rytomaa M, Martins LM *et al.*, Involvement of FADD and caspase-8 signalling in detachment-induced apoptosis; *Curr Biol* (1999), 9: 1043-1046
200. Aoudjit F, Vuori K, Matrix attachment regulates FAS-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-FLIP and implications for anoikis; *J Cell Biol* (2001), 152: 633-643
201. Geiger TS, Peeper DS, The neurotrophic receptor TrkB in anoikis resistance and metastasis: a perspective; *Cancer Res* (2005), 65: 7033-7036
202. Geiger TS, Peeper DS, Critical role for TrkB kinase function in anoikis suppression, tumorigenesis, and metastasis; *Cancer Res* (2007), 67: 6221-6229
203. Benassi MS, Ponticelli F *et al.*, Altered expression of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in high-risk soft tissue sarcomas; *Histol Histopathol* (2007), 22: 1017-1024

APPENDICE

Risultati dell'analisi di espressione genica, nelle colture primarie da sarcomi, effettuata in Real Time PCR utilizzando i SuperArray (Bioscience Corporation) contenenti ognuno una gamma di 96 primers che permettono la valutazione dell'espressione di 84 geni specifici appartenenti al pathway apoptotico, 5 geni housekeeping e 3 controlli necessari per verificare la qualità dell'RNA e della PCR, e come riferimento è stato utilizzato un pool di linfociti sani.

I valori sono espressi in $2^{-\Delta\Delta CT}$; in rosso sono i casi in cui l'espressione è maggiore rispetto al calibratore, in blu quelli in cui è minore ed in nero quelli con espressione uguale rispetto al calibratore.

GENI	DESCRIZIONE	118485	98337/A	98337/B	121397	112634/A	112634/B
ABL1	V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	9212.20±0.04	1063.81±0.83	15505,27±1.05	10,79± 0,2	27377,86± 1,43	5261,92± 0,24
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	27.38±0.14	8.01±0.45	102,2±0.98	2030,01± 0,98	23,9± 0,65	170,7± 1,03
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor	2.20±0.09	57.76±0.97	4,06±0.21	1106,32± 0,74	28,56± 0,22	724,71± 1,14
BAD	BCL2-antagonist of cell death	7.56±0.18	42.8±0.55	47,51±0.65	4,02± 0,13	11,02± 0,1	1705,89± 1,4
BAG1	BCL2-associated athanogene	3.19±0.15	1.16±0.03	3,62±0.65	716,13± 0,87	9,04± 0,3	101,4± 0,25
BAG3	BCL2-associated athanogene 3	70.29±0.26	2696.28±0.98	3761,81±1.24	33209,33± 1,42	613,09± 1,03	20702,18± 0,76
BAG4	BCL2-associated athanogene 4	199.25±0.07	551.57±0.23	391,06±1.14	61913,09± 0,45	0,4± 0,06	11092,67± 0,66
BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	3.64 ± 0.23	1.53±0.04	26,39±1.06	0,02± 0,00	0,26± 0,01	13,25± 0,08
BAX	BCL2-associated X protein	0.61 ± 0.28	1.02±0.03	1±0.00	36,42± 0,4	1,89± 0,02	18,19± 0,13
BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10	6.56 ± 0.16	1.09±0.12	3,35±0.04	0± 0,00	0,77± 0,00	185,81± 0,99
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	0.78 ± 0.02	0.04±0.00	3,62±0.00	0,01± 0,00	0,01± 0,00	0,22± 0,00
BCL2A1	BCL2-related protein A1	0.00 ± 0.00	0.00±0.00	4,29±0.54	3.85± 0,05	0± 0,00	0± 0,00
BCL2L1	BCL2-like 1	0.12 ± 0.05	0.82±0.07	8,8±0.27	0,47± 0,03	2,26± 0,07	10,43± 0,09
BCL2L10	BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)	11.08 ± 0.22	72463±0.96	449,36±1.14	89,98± 1,02	1,1± 0,00	127,03± 1,38
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	5.01 ± 0.31	3.01±0.44	183,41±0.74	430,02± 1,13	5,31± 0,02	37,89± 0,14
BCL2L2	BCL2-like 2	4219.82 ± 0.20	4458.45±0.84	9297,88±0.85	13321,12± 1,27	7273,25± 1,31	3246,21± 0,97
BCLAF1	BCL2-associated transcription factor 1	39.74 ± 0.34	0.96±0.13	0,37±0.01	0,17± 0,00	0,04± 0,00	0± 0,00
BFAR	Bifunctional apoptosis regulator	7.08± 0.04	41.82±0.88	19,79±0.23	1421,24± 1,08	1,38± 0.01	314,79± 0,65
BID	BH3 interacting domain death agonist	0.29± 0.01	0.52±0.31	2,03±0.04	0± 0,00	0,02± 0,00	0,59± 0,00

BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	0.00±0.00	0.00±0.00	0±0.00	211,47± 0,4	0,28± 0,00	110± 0,73
BIRC1	Baculoviral IAP repeat-containing 1	0.00± 0.00	0.00±0.00	0,25±0.02	0,75± 0,02	0,02± 0,00	2,02±0,00
BIRC2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	0.02± 0.01	1.97±0.19	16,22±0.52	0.14± 0,00	1,47± 0,03	38,73± 0,44
BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	0.24± 0.09	0.14±0.04	4,45±0.36	13127,13± 1,48	342,74± 1,22	16,14± 0,65
BIRC4	Baculoviral IAP repeat-containing 4	5.87± 0.82	0.93±0.16	33,35±0.84	9,36± 0,07	0,07± 0,00	27,76± 0,16
BIRC6	Baculoviral IAP repeat-containing 6 (apollon)	0.78± 0.05	0.42±0.05	2,28±0.14	0± 0,00	0,04± 0,00	0± 0,00
BIRC8	Baculoviral IAP repeat-containing 8	0.00± 0.00	0.06±0.00	0±0.00	46,57± 0,62	0,18± 0,01	0± 0,00
BNIP1	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1	103.11± 0.25	24.82±0.69	19641,16±1.36	1224,99± 1,19	0,17± 0,00	0.02± 0,00
BNIP2	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2	376.70 ±0.72	4516.67±0.81	16256,69±1.28	18170,27± 1,39	154,81± 0,29	152,63± 0,53
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	16.84± 0.10	28.49±0.54	211,49±0.98	111,59± 0,14	2,59± 0,03	0± 0,00
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	384.44 ± 0.75	174.32±0.79	192,06±0.25	36504,48± 1,57	1,87± 0,11	516,33± 0,31
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	0.01± 0.00	0.00±0.00	0±0.00	194,7± 0,79	0,07± 0,00	0± 0,00
CARD4	Caspase recruitment domain family, member 4	1.77± 0.07	0.11±0.00	0,67±0.25	0,02± 0,00	578,43± 0,58	8012,81± 0,94
CARD6	Caspase recruitment domain family, member 6	12.62±0.27	3.48±0.17	77,83±1.02	664720,8± 1,77	0,33± 0,01	203,69± 0,25
CARD8	Caspase recruitment domain family, member 8	0.03±0.01	0.04±0.00	2,76±0.21	0± 0,00	0± 0,00	0,52± 0,02
CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	1.69±0.20	0.25±0.05	0,02±0.00	3,9± 0,05	0,02± 0,00	36,32± 0,08
CASP10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	1.29±0.02	1.36±0.31	0,52±0.23	1,47± 0,02	0± 0,00	2806,88± 1,27
CASP14	Caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase	0.05±0.01	293.44±0.73	64,91±0.94	1165,59± 1,38	144,61± 1,01	32,27± 0,21
CASP10	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 2)	0.34±0.09	0.07±0.00	1,46±0.05	740,24± 0,86	0,28± 0,02	124,29± 0,88
CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	1076.46±0.80	16.62±0.43	1341,44±1.24	52,91± 0,32	0± 0,00	54,64± 0,51
CASP4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	16.57±0.17	178.46±0.62	2,12±0.14	0,07± 0,00	36,15± 0,37	627,28± 0,78
CASP5	Caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase	122.62± 0.14	14.96±0.34	54,57±1.28	5.53± 0,07	1405,37± 0,92	1.23± 0,03
CASP6	Caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase	0.03± 0.00	2.4±0.27	2,63±0.01	57,65± 0,26	6,11± 0,03	0,02± 0,00
CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase	221.53± 0.19	108.84±0.55	394,68±0.98	14089,69± 1,47	1,12± 0,02	0,35± 0,00
CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	0.34± 0.10	0.13±0.06	44,7±0.25	1,27± 0,00	0,89± 0,00	7462,79± 0,93
CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	0.89±0.03	0.2±0.01	7,03±0.87	197,24± 0,35	0,59± 0,00	2,46± 0,4
CD40	CD40 antigen (TNF receptor superfamily member 5)	25.96± 0.18	1.69±0.04	75,11±0.98	224,07± 0,85	0,61± 0,03	794,07± 1,02

CD40LG	CD40 ligand (TNF superfamily, member 5, hyper-IgM syndrome)	0.09±0.02	0.02±0.00	0,03±0.01	0,77± 0,01	0± 0,00	0,29± 0,00
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	0.23±0.08	0.32±0.01	0,8±0.54	3,58± 0,07	0± 0,00	0,09± 0,00
CIDEA	Cell death-inducing DFFA-like effector a	27.51±0.88	46.71±0.36	0,31±0.01	21,48± 0,24	2,89± 0,05	1,01± 0,03
CIDEB	Cell death-inducing DFFA-like effector b	0.39±0.01	0.15±0.08	0,01±0.00	10,24± 0,06	1,65± 0,02	9,77± 0,00
CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	14.68±0.51	2.34±0.14	7,78±0.85	46,88± 0,55	6,99± 0,18	5,69± 0,2
DAPK1	Death-associated protein kinase 1	30.10± 0.16	476.4±0.49	5,05±0.32	19804,19± 1,69	2,26± 0,01	0,19± 0,00
DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	494.27± 0.96	251.01±0.25	9294,86±1.23	64262,3± 1,05	319,41± 1,21	40558,55± 0,87
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	33.37±0.24	12.04±0.19	22,46±0.96	85542,63± 1,58	11625,1± 1,61	0.01± 0,00
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	327.33±0.78	50.28±0.24	57,62±0.85	0.01± 0,00	0,54± 0,00	1540,7± 0,13
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	6.40± 0.27	0.19±0.07	0,27±0.01	6,91± 0,11	16,67± 0,06	11,99± 0,15
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	3.72±0.12	0.84±0.05	0,03±0.00	0,01± 0,00	6,62± 0,08	4,85± 0,12
HRK	Harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)	25.82±0.15	0.6±0.01	0±0.00	5781,08± 1,09	0.03± 0,00	554,05± 0,77
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	25.92±0.65	1.62±0.04	0,27±0.12	1,88± 0,00	2,46± 0,03	20,77± 0,36
LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	0.01±0.00	0.44±0.01	64,91±0.65	2183,43± 1,43	2,26± 0,15	3,87± 0,07
LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	18.87±0.29	467.03±0.84	4,44±0.24	0,15± 0,00	0,62± 0,01	0,18± 0,00
MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	0.54±0.12	0.13±0.02	2,69±0.25	2,11± 0,03	0,46± 0,00	0,35± 0,00
NOL3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	1.11±0.33	142.17±0.93	10,73±0.86	2218,93± 1,02	275,28± 1,03	0,01± 0,00
PYCARD	PYD and CARD domain containing	0.43±0.10	5.08±0.17	0,67±0.06	18,99± 0,31	0,44± 0,02	0,34± 0,01
RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	58.19±0.46	14.92±0.23	40±0.94	0.35± 0,00	1,38± 0,00	583,37± 0,62
TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	0.00±0.00	0.03±0.00	0,24±0.07	0± 0,00	0,07± 0,00	15,22± 0,04
TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	8.98±0.29	15.61±0.52	4192,55±1.12	434,69± 0,74	0,93± 0,03	10,44± 0,02
TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	28.42±0.92	4.2±0.18	275,4±0.78	0,02± 0,00	3,3± 0,02	1882,34± 0,26
TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	748.02±0.74	1314.64±0.76	15,32±0.84	2331,18± 1,45	89,61± 1,05	0,04± 0,00
TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	12.66±0.59	0.65±0.06	64,81±0.44	53120,27± 1,77	0± 0,00	439,94± 0,94
TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	69.52±0.63	2072.79±0.48	893,29±1.58	581,4± 0,53	4,31± 0,23	2881,33± 0,79

TNFRSF25	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	0.26±0.01	1.65±0.15	28,42±0.98	43405,76± 1,96	0,13± 0,00	1865,45± 1,38
TNFRSF7	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7	0.18±0.02	40.07±0.62	6,27±0.52	426,57± 0,37	0,9± 0,01	0,07± 0,00
TNFRSF9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	0.03±0.01	10.83±0.65	9,88±0.97	3883,19± 1,09	8,08± 0,03	57,7± 0,21
TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	0.04±0.01	0±00	0±0.00	50,68± 0,55	0± 0,00	2,4± 0,03
TNFSF7	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7	0.01±0.00	0.39±0.02	0,55±0.24	151,56± 0,43	0,59± 0,04	3,08± 0,02
TNFSF8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8	0.72±0.12	35.37±0.06	1,06±0.08	1,24± 0,03	4,2± 0,03	24,07± 0,12
TP53	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	27.55±0.51	4.13±0.22	106,52±1.27	0,8± 0,00	2,57± 0,13	2080,97± 1,38
TP53BP2	Tumor protein p53 binding protein, 2	23±0.65	23.71±0.13	2,81±0.21	122,82± 0,65	474,8± 0,59	21,47± 0,27
TP73	Tumor protein p73	0.22±0.02	11.19±0.10	0,09±0.00	0,17± 0,00	1,04± 0,03	238,68± 0,71
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain	2.40±0.63	2.57±0.05	6,89±0.68	0,97± 0,03	0,06± 0,00	0,79± 0,00
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	2.35±0.03	1.51±0.78	2,05±0.24	5933,5± 1,46	4,52± 0,12	1032,66± 1,83
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	0.99±0.01	0.3±0.00	14,25±0.89	13,23± 0,31	0,5± 0,00	7,54± 0,11
TRAF4	TNF receptor-associated factor 4	2.80±0.22	1.67±0.13	286,67±1.24	10723,18± 1,77	512,36± 0,83	114,63± 0,87

RINGRAZIO

Il mio tutor, Prof. Mario Mercuri, per la gentile disponibilità accordatami per lo svolgimento di questa tesi.

Il Dott. Piero Picci per avermi dato la possibilità di svolgere questa tesi nel Laboratorio di Ricerca Oncologica da lui diretto presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli.

La Dott.ssa Maria Serena Benassi, responsabile della Sezione di Biologia Molecolare del Laboratorio di Ricerca Oncologica, e le mie colleghe Laura, Amalia, Chiara, Cristina e Giovanna per la costante disponibilità e l'assistenza nel lavoro sperimentale.

Il Prof. Ferris e la Dott. Volpi, dell'Università di Parma, la Dott. Maltarello e la Dott. Pellegrini, del Laboratorio di Biologia Cellulare dello IOR, e la Dott. Zanella, del Servizio di Anatomia Patologica dello IOR, per la gentile collaborazione.

La mia famiglia per essermi stata vicino ed i miei nipoti, Alessia e Federico, per riaccendere ogni volta la luce.

I miei amici vecchi e nuovi, ovunque siano adesso, perché, ogni giorno o una volta all'anno, è bello raccontarsi insieme.

Chi ha vissuto con me questo e tanto altro, nel mio mondo a colori, sopportando le mie ansie, perché una vita è poca e "magari" adesso ha un altro suono.

Antonella