

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

Dipartimento di Patologia Sperimentale
Sezione di Patologia Generale

Dottorato di Ricerca in

Oncologia e Patologia Sperimentale: Progetto 1 “Oncologia” Ciclo XIX

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Sandro Grilli

PERCORSI MOLECOLARI E BERSAGLI INNOVATIVI DI 4-HPR NEI TUMORI SOLIDI

Tesi di Dottorato di:

Dott.ssa

Daniela Baiocchi

Tutore:

Chiar.ma Prof.

Anna Gasperi-Campani

Settore Scientifico Disciplinare: MED/04

Anno Accademico 2005/2006

INDICE

<u>INTRODUZIONE</u>	<i>pag.</i>	4
1. 4-HPR (FENRETINIDE)	"	4
1.1 I retinoidi	"	4
1.2 Caratteristiche generali	"	6
1.3 Meccanismo molecolare d'azione	"	7
1.3.1 Citostasi	"	8
1.3.2 Apoptosi	"	9
1.3.3 Necrosi	"	14
1.3.4 Inibizione delle metastasi	"	15
1.4 Metabolismo e farmacocinetica	"	16
1.5 Studi clinici	"	18
2. CAVEOLAE E CAVEOLINA-1	"	25
2.1 Le caveolae	"	25
2.2 I geni delle Caveoline	"	26
2.3 Caveolina-1	"	27
2.4 Ruolo funzionale di Caveolae e Caveolina-1	"	28
2.4.1 Trasporto vescicolare	"	28
2.4.2 Omeostasi del colesterolo	"	29
2.4.3 Trasduzione dei segnali	"	32

2.5	Caveolina-1 nelle patologie umane	<i>pag.</i>	36
2.5.1	Diabete tipo II	"	36
2.5.2	Infiammazioni	"	37
2.5.3	Tumori	"	37
2.5.3.1	Regolatore negativo o promotore della crescita?	"	37
2.5.3.2	Metastasi	"	40
2.5.4	Aterosclerosi	"	42
2.5.5	Sindrome di Alzheimer	"	43
	<u>PARTE SPERIMENTALE</u>	"	45
3.	MATERIALI	"	45
4.	METODI	"	46
4.1	Colture cellulari	"	46
4.1.1	Trattamenti farmacologici	"	46
4.1.2	Incorporazione di ³ H-Timidina nel DNA	"	47
4.2	Analisi dei lipidi	"	47
4.2.1	Esterificazione del colesterolo	"	47
4.3	Analisi delle proteine	"	48
4.3.1	Estrazione delle proteine cellulari	"	48
4.3.2	Western Blotting	"	48
4.3.3	Analisi immunoenzimatica	"	49

4.4	Analisi dell'mRNA	<i>pag.</i>	49
4.4.1	Estrazione dell'RNA totale	"	49
4.4.2	Analisi qualitativa e quantitativa dell'RNA	"	50
4.4.3	RT-PCR (<i>reverse transcriptase-polimerase chain reaction</i>)	"	50
4.5	Analisi del DNA	"	52
4.5.1	Estrazione del DNA genomico totale	"	52
4.5.2	Analisi qualitativa e quantitativa del DNA	"	52
4.5.3	Valutazione dell'apoptosi	"	53
4.5.4	Analisi della metilazione	"	53
4.6	Analisi statistica	"	55
5.	RISULTATI	"	56
6.	DISCUSSIONE	"	60
7.	FIGURE E TABELLE	"	65
8.	BIBLIOGRAFIA	"	82

INTRODUZIONE

1. 4-HPR (FENRETINIDE)

1.1 I retinoidi

Il termine retinoidi si riferisce ad un gruppo di composti comprendente metaboliti e analoghi della vitamina A (retinolo) sia naturali che di sintesi. Essi sono componenti essenziali della dieta e regolatori fisiologici di numerosi processi biologici essenziali come lo sviluppo embrionale, la funzione visiva, la riproduzione, lo sviluppo delle ossa, il metabolismo, l'ematopoiesi; inoltre sono implicati nella regolazione della proliferazione cellulare, della differenziazione e della apoptosi. In virtù di tali effetti nel controllo della crescita cellulare negli ultimi decenni i retinoidi sono stati ampiamente investigati come potenziali agenti antitumorali. Studi derivanti da differenti aree di investigazione inclusa la sperimentazione cellulare e animale, la epidemiologia e i *trials* clinici supportano l'uso di tali composti come agenti farmacologici per la prevenzione e la terapia dei tumori (Fontana JA and Rishi AK, 2002).

Studi preclinici indicano che la somministrazione di retinoidi previene lo sviluppo tumorale in diversi modelli di cancerogenesi animale inclusi quelli della cute, della mammella, della cavità orale, del polmone, della vescica, del fegato, e del pancreas mentre la carenza di vitamina A causa aumento di incidenza di tumori in diversi tessuti ed aumentata sensibilità alla cancerogenesi chimica. Tali osservazioni sono supportate da studi epidemiologici riguardanti individui con un basso apporto dietetico di vitamina A (Sun SY and Lotan R, 2002). Clinicamente la maggior parte dei *trials* di chemioprevenzione è stata condotta in soggetti con un alto rischio di sviluppare tumori come quelli con lesioni premaligne o pazienti già trattati per un tumore ed a rischio di svilupparne un secondo. In tali studi i retinoidi si sono rivelati in grado di arrestare o revertare lesioni premaligne come la cheratosi attinica cutanea, la sindrome dei nevi displastici, la metaplasia bronchiale, la leucoplachia orale e la displasia cervicale (Abu J et al, 2005; Hail N et al, 2006); essi inoltre hanno mostrato effetto preventivo per lo sviluppo di recidive in pazienti con tumori testa-collo ed in quelli con xeroderma pigmentoso (Campbell RM and DiGiovanna JJ, 2006).

La possibilità di regolare la crescita e la differenziazione cellulare da parte dei retinoidi deriva dalla capacità di modulare direttamente e indirettamente l'espressione di specifici geni bersaglio. Tale attività è principalmente mediata

dall'interazione con i recettori dei retinoidi nucleari appartenenti alla famiglia dei recettori per gli ormoni steroidei. Esistono due tipi di recettori nucleari noti come *retinoic acid receptors* (RARs) e *retinoid X receptors* (RXRs) ciascuno con tre sottotipi recettoriali, codificati da differenti geni denominati α , β e γ , e diverse isoforme. I ligandi naturali per i RARs sono l'ATRA (*all-trans-retinoic acid*) ed il 9-*cis* RA (*9-cis retinoic acid*) mentre i RXRs legano solamente il 9-*cis* RA. In seguito ad attivazione, questi recettori formano eterodimeri RXR/RAR o omodimeri RXR/RXR che interagiscono con elementi di risposta del DNA noti come RAREs (*retinoic acid response elements*) ed RXREs (*retinoid X response elements*). In assenza del ligando, il recettore recluta proteine che agiscono da co-repressori prevenendo così la trascrizione genica mentre, in seguito al legame del ligando, il co-repressore si dissocia e viene rimpiazzato da co-attivatori che trasformano il recettore in fattore di trascrizione attivo in grado di regolare la transattivazione di geni bersaglio (Hail N et al, 2006).

Il potenziale effetto terapeutico dei retinoidi è però controbilanciato dalla loro tossicità. Infatti, poiché i derivati della vitamina A hanno funzioni fisiologiche pleiotripiche sia nell'embrione che nell'adulto tramite attivazione dei recettori RARs ed RXRs ubiquitariamente espressi, la somministrazione di retinoidi naturali o sintetici causa severi effetti collaterali con caratteristiche tipiche della ipervitaminosi A; queste includono teratogenicità a vari livelli a seconda della permeabilità della placenta allo specifico retinoide e del periodo di esposizione dell'embrione, citotossicità mucocutanea, difetti della vista, perdita di capelli, tossicità ossea, tossicità epatica ed effetti sistemici come iperlipidemia ed ipertrigliceridemia. Tali effetti tossici rappresentano il principale ostacolo all'utilizzo dei retinoidi per lunghi periodi a scopi chemiopreventivi limitandone l'utilizzo ed il dosaggio (Campbell RM and DiGiovanna JJ, 2006; Vivat-Hannan V and Zusi FC, 2005).

Un altro problema legato all'utilizzo dei retinoidi riguarda la difficoltà di raggiungere concentrazioni sufficienti ma non tossiche nei tessuti bersaglio; questa è dovuta principalmente alla loro affinità per i numerosi siti di legame che incontrano durante l'assorbimento e alla metabolizzazione che subiscono durante il raggiungimento della sede bersaglio.

Allo scopo di superare tali ostacoli sono state messe in atto diverse strategie la prima delle quali riguarda la identificazione o la sintesi di nuovi retinoidi con minori o assenti effetti collaterali e bassa tossicità generale. In particolare la scoperta dei RARs ed RXRs come maggiori mediatori dell'azione dei retinoidi ha rivolto l'interesse verso lo sviluppo di nuovi retinoidi che legano selettivamente ed attivano solo un sottotipo di recettore o che agiscono indipendentemente da essi; tali proprietà infatti dovrebbero aumentarne l'efficacia e parallelamente conferire minore tossicità aspecifica. Un'altra possibile strategia consiste nella combinazione dei retinoidi con altri agenti in

grado di aumentarne o almeno mantenerne l'efficacia riducendone però la tossicità (Sun SY and Lotan R, 2002).

Attualmente tre retinoidi sono utilizzati in oncologia clinica di cui due naturali ed uno di sintesi; essi sono: la tretinoina (ATRA) che viene somministrata per via orale a pazienti affetti da leucemia promielocitica acuta (APL), la alitretinoina (*9-cis RA*) utilizzata per il trattamento topico del Sarcoma di Kaposi e la targretina (*bexarotene*) prescritta come formulazione orale per il trattamento del linfoma a cellule T. Un ampio numero di retinoidi inoltre è ancora in fase di studio o di *trial* clinico per il trattamento o la prevenzione di tumori ematologici, solidi o di metastasi (Vivat-Hannan V and Zusi FC, 2005).

1.2 Caratteristiche generali

La 4-HPR [*N-(4-hydroxyphenyl)retinamide*] o Fenretinide è un analogo sintetico dell'ATRA prodotto per la prima volta dalla *W. Johnson Pharmaceutical (USA)* alla fine degli anni '60. Tale molecola deriva dalla sostituzione del gruppo carbossilico terminale dell'ATRA con un gruppo N-4-idrossifenilico. La struttura generale della 4-HPR è quindi caratterizzata dalla porzione idrofila del gruppo ammidico, dalla catena alifatica con quattro doppi legami coniugati e da una porzione lipofila costituita dall'esene ciclico. La presenza di doppi legami coniugati rende la 4-HPR sensibile alla luce, all'aria ed al calore e ne determina l'assorbimento nell'ultravioletto (Moon RC et al, 1979). Rispetto ai retinoidi naturali che si accumulano principalmente a livello epatico, la 4-HPR presenta una maggiore biodisponibilità nel tessuto mammario ed in quello adiposo, risultando in una sensibile riduzione della tossicità epatica. Inoltre è stato dimostrato che la 4-HPR non induce mutazioni puntiformi o aberrazioni cromosomiche ed è stata pertanto classificata come non genotossica (Paulson JD et al, 1985). Tali caratteristiche determinano un possibile impiego della 4-HPR compatibile con trattamenti chemiopreventivi a lungo termine. Essa possiede inoltre caratteristiche farmacocinetiche favorevoli, è ben tollerata e, grazie alla sua lipofilia, è in grado di attraversare la barriera emato-encefalica (Puduvalli VK et al, 2004).

In modelli animali la 4-HPR ha dimostrato di possedere proprietà chemiopreventiva nella cancerogenesi della prostata, del pancreas, della cute (McCormick DL et al, 1987) e della mammella (Abou-Issa H et al, 1995). In studi clinici il trattamento con 4-HPR rallenta la progressione di tumori prostatici diagnosticati precocemente (Chodak GW et al, 1993), protegge dallo sviluppo di carcinomi dell'ovario e di secondi tumori mammari in donne in premenopausa (Veronesi U et al, 1999) e previene la formazione di recidive e di secondi tumori in pazienti trattati chirurgicamente per la leucoplachia orale

(Chiesa F et al, 2005).

A differenza dei retinoidi naturali che agiscono soprattutto tramite induzione di differenziazione e blocco del ciclo cellulare, la 4-HPR regola la crescita cellulare soprattutto tramite induzione di apoptosi, sebbene siano stati riportati anche effetti citostatici (Jinno H et al, 1999) e capacità differenziante (Chen S et al, 2003). Tuttavia, è stato anche riportato che ad alte dosi essa induce necrosi piuttosto che morte cellulare programmata. Il meccanismo molecolare tramite cui la 4-HPR induce apoptosi è stato investigato in una grande varietà di linee cellulari e quello che si è evidenziato da tali studi è che esso possa essere diverso a seconda del tessuto analizzato e, talvolta, differenti meccanismi possono operare nell'ambito di specifici tessuti. E' interessante sottolineare comunque che la morte cellulare programmata indotta da 4-HPR *in vitro* sembra essere selettiva per le cellule trasformate mentre non riguarda la loro controparte normale come è stato dimostrato in fibroblasti normali (Ulukaya E et al, 2001), linfociti, epatociti, cellule epiteliali cervicali (Darwiche N et al, 2004) ed astrociti (Tiwari M et al, 2006).

Sebbene la 4-HPR sia principalmente considerata un agente chemiopreventivo, diversi studi *in vitro* ed *in vivo* in tumori quali neuroblastoma (Maurer B et al, 1999), leucemie (Faderl S et al, 2003) e linfomi (Gopal AK et al, 2003) suggeriscono che la azione pro-apoptotica di questo retinoide possa trovare applicazione anche nella terapia oncologia (Hail N et al, 2006).

1.3 Meccanismo molecolare d'azione

A differenza dei retinoidi naturali la cui attività è dipendente dalla interazione con i recettori **RARs** ed **RXRs**, il loro ruolo nel meccanismo molecolare di azione della 4-HPR è controverso. Inizialmente si pensava che la 4-HPR non fosse in grado di legare i RARs in quanto mancante del gruppo carbossilico terminale ritenuto necessario per questa funzione; tale caratteristica aveva fatto supporre che essa agisse solamente tramite meccanismi indipendenti dai recettori. A tale conferma, Delia D et al (1993) hanno dimostrato che la 4-HPR è in grado di inibire la proliferazione in linee cellulari ematopoietiche maligne resistenti all'acido retinoico a causa di una delezione nel dominio di legame dell'RAR. Sheikh MS et al (1995) sono giunti a conclusioni simili esaminando l'effetto della 4-HPR sulla crescita di diverse linee cellulari di carcinoma mammario con diversa sensibilità o resistenti alla inibizione della proliferazione indotta dall'acido retinico. Infatti essi hanno evidenziato che il trattamento con 4-HPR causa induzione di apoptosi sia nelle linee cellulari sensibili che in quelle resistenti all'acido retinico; il metabolita principale di 4-HPR, MPR, invece non ha mostrato effetti sulla proliferazione cellulare. In particolare tali ricercatori

hanno dimostrato che sia la 4-HPR che la MPR legano solo molto debolmente RAR α , β e γ *in vitro* e che attivano solo in maniera minima le RAREs e le RXREs; né la 4-HPR né la MPR inoltre vengono metabolizzate in retinoidi noti come attivatori di tali sequenze. Tuttavia, altri studi hanno supportato un potenziale ruolo dei RARs nella apoptosi indotta da 4-HPR. Infatti, studi di transattivazione e di transfezione con i RARs hanno dimostrato che la 4-HPR attiva fortemente RAR γ e più moderatamente RAR β mentre non è in grado di interagire con RAR α ; una significativa transattivazione di RAR γ è evidente a concentrazioni di 4-HPR comprese tra 5 e 20 μ M, dosi alle quali 4-HPR è in grado di indurre apoptosi (Fanjul AN et al, 1996). Sabichi AI et al (1998) hanno riportato che l'aumento di espressione di RAR β tramite transfezione stabile in linee cellulari di carcinoma dell'ovario determina un aumento della inibizione della proliferazione indotta da 4-HPR; questa ultima inoltre è risultata correlata positivamente con l'espressione di RAR β . Risultati simili sono stati riportati da Liu G et al (1998) in studi riguardanti l'effetto di 4-HPR in linee cellulari di adenocarcinomi polmonari e gastrici. Gli studi condotti fino ad ora comunque indicano che meccanismi molecolari differenti sono coinvolti nella inibizione della crescita indotta da 4-HPR alcuni dei quali possono coinvolgere RAR β o RAR γ ed altri essere indipendenti da essi. Tuttavia sebbene l'attivazione dei recettori possa in alcuni casi contribuire agli effetti di 4-HPR, la induzione di apoptosi sembra essere indipendente dai RARs nella maggior parte dei tipi cellulari esaminati (Hail N et al, 2006).

Oltre che indipendente dai RARs ed RXRs la attività della 4-HPR sembra essere indipendente dalla presenza di **p53** come dimostrato dal fatto che essa può esercitare la sua azione chemiopreventiva anche in topi mancanti di p53 o in animali a cui siano state inoculate cellule tumorali p53 *-/-*. Studi effettuati *in vitro* indicano assenza di alterazione dell'espressione di p53 in seguito ad induzione di morte cellulare programmata da parte di 4-HPR in numerose linee cellulari (Corazzari M et al, 2005); essa inoltre viene indotta indipendentemente dalla presenza di p53 *wild-type* in cellule di osteosarcoma (Gasperi-Campani A et al, 2002), di carcinoma del colon (Boya P et al, 2003) e di glioma (Tiwari M et al, 2006) umani.

1.3.1 Citostasi

Studi condotti *in vivo* su ratti affetti da tumori mammari indotti da N-metil-N-nitrosourea (MNU) indicano una associazione tra il trattamento con la 4-HPR e la riduzione della **attività telomerasica** oltre che con una significativa riduzione della proliferazione cellulare (Bednarek A et al, 1999). Risultati analoghi sono stati ottenuti dagli studi condotti da Soria JC et al (2001) nell'uomo; essi infatti hanno rilevato una riduzione della espressione della subunità catalitica della

trascrittasi inversa della telomerasi umana (hTERT) in biopsie bronchiali di soggetti fumatori a cui era stato somministrata 4-HPR rispetto a quelli che avevano assunto un placebo.

Alcuni studi hanno evidenziato che l'attività di inibizione della crescita indotta dalla 4-HPR in linee cellulari di neuroblastoma e linfoblastoma può derivare dall'arresto del ciclo cellulare (Springer LN and Stewart BW, 1998). In particolare è stato osservato che essa induce un aumento della percentuale di cellule in fase G1 in linee cellulari di carcinoma della prostata e mammario, suggerendo che il blocco avvenga a livello della transizione G1/S del ciclo cellulare (Jinno H et al, 1999). Questo sembra dipendere dalla capacità della 4-HPR di mantenere la proteina **pRb** in uno stato defosforilato tramite riduzione della espressione della Ciclina D1 e della chinasi ciclina-dipendente ad essa associata, Cdk4, come dimostrato in cellule di carcinoma mammario (Panigone S, et al 2000) e di linfoma di Burkitt (Hsieh T and Wu JM, 2000).

Analogamente a quanto dimostrato per altri retinoidi, la capacità di inibizione della proliferazione da parte della 4-HPR può derivare dalla sua capacità di inibizione della sintesi delle **prostaglandine** (PGs). Gli studi condotti da Merritt G et al (2001) nel carcinoma del colon suggeriscono che la 4-HPR inibisce selettivamente la forma inducibile della cicloossigenasi (COX-2) con conseguente calo della sintesi di PGE₂ nella linea cellulare HT-29. L'effetto inibitorio esercitato da 4-HPR sulla proliferazione di tale linea cellulare viene significativamente ridotto in seguito a somministrazione di PGs esogene; tuttavia tale effetto non è completo e, d'altro canto, anche la linea cellulare HCT-15 non esprime COX-2 risulta sensibile al trattamento. Tali osservazioni suggeriscono che l'effetto antiproliferativo di 4-HPR non deriva esclusivamente dalla sua capacità di modulazione delle PGs sebbene esso possa svolgere un ruolo importante. Altri studi supportano un coinvolgimento delle PGs nel meccanismo molecolare della 4-HPR anche in altri tumori: l'aumento di espressione di COX-2 tramite transfezione causa una riduzione della sensibilità alla 4-HPR nel carcinoma della mammella (Tari AM et al, 2005); essa inoltre agisce in maniera sinergica con l'inibitore selettivo della COX-2, celecoxib, nel carcinoma polmonare a piccole cellule (NSCLC) (Sun SY et al, 2005).

Alcuni studi suggeriscono che la inibizione della proliferazione cellulare ad opera di 4-HPR, analogamente a quanto dimostrato per altri retinoidi, deriva dalla riduzione di espressione di fattori stimolanti la crescita o dalla induzione di fattori che la inibiscono. Per esempio la inibizione della proliferazione di cellule di carcinoma mammario indotta da 4-HPR *in vitro* è risultata associata ad una diminuzione della secrezione del fattore di crescita simile all'insulina (IGF-I), un potente stimolatore della proliferazione epiteliale, e ad un aumento della secrezione di proteine che legano tale fattore (IGFBPs) (Favoni RE et al, 1998). Il fattore di crescita trasformante- β (TGF- β) è un potente inibitore della crescita

delle cellule di origine epiteliale. Il suo coinvolgimento nel meccanismo d'azione di 4-HPR nel carcinoma mammario è stato dimostrato tramite l'uso di anticorpi neutralizzanti. L'effetto della 4-HPR infatti viene inibito da anticorpi in grado di neutralizzare il TGF- β mentre cellule di carcinoma mammario con un segnale mediato da TGF- β difettivo sono resistenti ad essa. Tuttavia non è completamente noto se tali alterazioni nei segnali dei fattori di crescita rappresentano un meccanismo di azione del retinoide oppure semplicemente un marcatore della sua attività (Herbert BS et al, 1999).

1.3.2 Apoptosi

La caratteristica più comune della induzione di apoptosi da parte della 4-HPR è probabilmente il fatto di essere inibita dal trattamento con agenti antiossidanti (vitamina C, vitamina E, N-acetil-cisteina) suggerendo un ruolo essenziale svolto dai radicali dell'ossigeno (**ROS**) e dallo stress ossidativo in questo meccanismo. Una rapida produzione di ROS, in particolare perossidi di idrogeno e superossidi, è comunemente osservata in seguito all'esposizione alla 4-HPR di una varietà di linee cellulari tumorali, quali quelle derivanti da carcinomi mammari, della cervice e della prostata, da tumori della testa e del collo ed epatici, da sarcomi, da linfomi, da leucemie e da neuroblastomi (Barna G et al, 2005; Hail N et al, 2006). La produzione di ROS inevitabilmente diminuisce quando le cellule vengono mantenute in condizioni di ipossia. Tale meccanismo non sembra essere generale per i retinoidi in quanto non è stata osservata produzione di ROS in seguito a trattamento con altri retinoidi quali ATRA e 9-*cis* RA (Simeone AM and Tari AM, 2004; Barna G et al, 2005).

Studi condotti da Lovat PE et al (2003a) nel neuroblastoma umano indicano che la produzione di ROS deriva dalla capacità della 4-HPR di stimolare sia l'attività della fosfolipasi A2 (PLA-2) che della 12-lipoossigenasi (12-LOX); la induzione della apoptosi è perciò determinata dal rilascio di acido arachidonico dai lipidi di membrana ad opera della PLA-2 e dalla sua successiva ossidazione da parte della 12-LOX con conseguente formazione di radicali dell'ossigeno.

L'esposizione alla 4-HPR causa una rapida transizione della permeabilità della membrana mitocondriale (**MPT**), che consiste nella apertura dei canali mitocondriali con conseguente dissipazione del suo potenziale di membrana. Tale fenomeno, descritto nel carcinoma dell'ovario, della cervice, della mammella, nel meningioma e nei gliomi precede la attivazione delle caspasi (Boya P et al, 2003; Pudukkoti VK et al, 2005; Tiwari M et al, 2006). Tuttavia nel neuroblastoma e nel carcinoma cutaneo la attivazione delle caspasi e la induzione di apoptosi da parte di 4-HPR apparentemente avvengono senza una marcata MPT (Ulukaya E et al, 2003). I mitocondri svolgono un ruolo fondamentale nella induzione di apoptosi in quanto mediano il rilascio di varie

proteine e fattori coinvolti in tale processo. In particolare essi mediano il rilascio del citocromo c dallo spazio intermembrana che, a sua volta, determina l'attivazione delle Caspasi 6, 7 e 9 (Boya P et al, 2003); il fattore di induzione della apoptosi (AIF) è un'altra proteina che risiede nel mitocondrio ma che in seguito a stimolazione può traslocare nel nucleo dove induce apoptosi indipendentemente dalla attivazione delle caspasi. Gli studi condotti da Tiwari M et al (2006) suggeriscono che la alterazione della omeostasi del Ca^{2+} sia implicata nella induzione di apoptosi ad opera di 4-HPR nel glioma *in vitro*. Essi infatti hanno rilevato che il trattamento con 4-HPR causa un aumento della concentrazione di Ca^{2+} citoplasmatica in seguito al suo rilascio dal reticolo endoplasmatico; tale incremento determina la successiva traslocazione e accumulo di Ca^{2+} a livello mitocondriale con conseguente MPT ed induzione di apoptosi.

La apertura dei canali mitocondriali è regolata da due effettori endogeni, Bax e Bak, appartenenti alla famiglia di **Bcl-2** (Hail N et al, 2006). Il fattore pro-apoptotico Bax è normalmente presente nel citoplasma e promuove la morte cellulare inserendosi nella membrana mitocondriale dove assume caratteristiche di poro mitocondriale. In cellule di glioma, 4-HPR induce un aumento dei livelli di Bax insieme alla sua traslocazione a livello mitocondriale alla base dell'MPT (Tiwari M et al, 2006). Studi condotti in cellule di carcinoma della cervice indicano che la produzione di ROS indotta da 4-HPR è necessaria per la MPT e la induzione di apoptosi; tutti gli effetti pro-apoptotici di 4-HPR, inclusa la generazione di ROS, vengono soppressi in queste cellule in seguito alla over-espressione di Bcl-2. Analogamente, in fibroblasti embrionali trasformati non esprimenti Bax e Bak, gli effetti pro-ossidanti e pro-apoptotici di 4-HPR vengono diminuiti. Tali osservazioni suggeriscono un legame tra la produzione di ROS e la MPT; in particolare suggeriscono che i ROS determinano i cambiamenti conformazionali in Bax e Bak e la traslocazione mitocondriale di Bax (Boya P et al, 2003). In cellule di carcinoma della prostata la induzione di Bax ad opera di 4-HPR è risultata associata a soppressione della espressione di Bcl-2 (Shen JC et al, 1999). Una forte riduzione della espressione di Bcl-2 indotta da 4-HPR è stata riportata anche nel carcinoma mammario, della cervice e della vescica mentre in cellule tumorali epatiche è stato rilevato il coinvolgimento di Bcl-X_L (You KR et al, 2001).

L'espressione di **Bak** aumenta durante la apoptosi indotta da 4-HPR. La sua induzione è risultata essere dipendente dai ROS e sensibile agli antiossidanti. Cellule di neuroblastoma trasfettate con un costrutto antisenso di Bak sono risultate insensibili alla induzione di apoptosi da parte di 4-HPR rilevando il ruolo chiave svolto da tale membro pro-apoptotico; esso può indurre il rilascio del citocromo c dal mitocondrio indipendentemente dalla MPT (Lovat PE et al. 2003b).

La espressione di Bak è direttamente regolata da **Gadd153** (*Growth Arrest and DNA-Damage inducible transcription factor 153*), fattore di trascrizione indotto da diverse forme di stress cellulare (privazione di nutrienti, luce UV, agenti alchilanti, generazione dei ROS). La rapida induzione di Gadd153 ad opera di 4-HPR è stata osservata in cellule derivanti da neuroblastoma, da carcinoma mammario, del colon, del polmone e del rene; essa è risultata essere indipendente dallo stato funzionale di p53 ed una conseguenza della produzione di ROS. Tali studi suggeriscono che la sovraespressione di Gadd153 e la conseguente attivazione di Bak siano eventi dipendenti dalla produzione di ROS (Corazzari M et al, 2005).

Analogamente a Gadd153, la **JNK** (*c-Jun N-terminal kinase*) e la **p38^{MAPK}** (p38 mitogen-activated protein kinase) vengono attivate in seguito a stress cellulare. La produzione di ROS indotta da 4-HPR causa attivazione di JNK e di p38^{MAPK} in cellule di neuroblastoma; la attivazione di tali chinasi viene soppressa dal pre-trattamento con vitamina C (Osone S et al, 2004). Un fenomeno simile è stato rilevato in cellule di carcinoma della testa e del collo trattate con 4-HPR (Kim HJ et al, 2005). Tuttavia studi precedenti condotti da Chen YR et al (1999) nel carcinoma della prostata avevano riportato una attivazione di JNK indipendente dalla produzione di ROS.

Il segnale regolato da JKN e p38^{MAPK} termina con l'attivazione del fattore di trascrizione AP-1 (*Activator Protein-1*). AP-1 regola vari processi cellulari inclusa la proliferazione, la trasformazione e la morte cellulare tramite attivazione di geni bersaglio. Shimada K et al (2003) hanno dimostrato che la sensibilizzazione di cellule di carcinoma della prostata all'effetto di 4-HPR indotta dal testosterone richiede l'attività di AP-1 e l'induzione di c-Jun; infatti il trattamento con oligonucleotidi antisense diretti verso c-Jun blocca sia il processo di sensibilizzazione che l'apoptosi in queste cellule. Il bersaglio di AP-1, c-Fos, invece, è risultato coinvolto nella induzione di apoptosi da parte di 4-HPR in cellule di carcinoma dell'ovario; sia la fumonisina B1 che l'espressione di una forma di c-Fos dominante negativa, infatti, diminuiscono l'attivazione di AP-1 e l'apoptosi indotta da 4-HPR, suggerendo che AP-1 sia coinvolto nella risposta allo stress cellulare associata alla induzione di apoptosi (Appierto V et al, 2004).

Nel carcinoma mammario la inibizione della crescita ad opera della 4-HPR è risultata associata alla produzione di **ossido nitrico** (NO), radicale libero prodotto a partire dalla L-arginina ad opera della ossido nitrico sintetasi (NOS); sebbene tale molecola in generale possa avere sia un effetto proapoptotico che antiapoptotico, nel carcinoma mammario agisce principalmente come agente antiproliferativo ed induttore di apoptosi. Studi condotti da Simeone AM et al (2002) indicano che la 4-HPR induce la produzione di NO in maniera dipendente dalla dose in tutte le linee cellulari di carcinoma mammario saggiate.

Il grado di inibizione della crescita e la induzione di apoptosi, inoltre, sono risultate direttamente correlate alla produzione di NO. In particolare l'aumento di NO indotto da 4-HPR sembra essere mediato dall'aumento di espressione della isoforma inducibile dell'enzima NOS, la NOS II. La concomitante incubazione con un inibitore competitivo per NOS previene gli effetti inibitori della 4-HPR indicando la produzione di NO un evento essenziale nella azione della 4-HPR in questo tumore. Gli autori di tale studio inoltre hanno dimostrato che uno dei potenziali meccanismi tramite cui l'interferone- γ e tamoxifene potenziano l'effetto della 4-HPR è tramite aumento della produzione di NO. La linea cellulare di carcinoma mammario MCF-7 transfettata con l'oncogene HER2/neu (MCF-7/HER2), mostra una minore sensibilità agli effetti inibitori della 4-HPR rispetto a quella non transfettata; tale effetto sembra derivare dalla diminuzione di espressione di NOSII con conseguente riduzione della produzione di NO suggerendo che HER2 causa resistenza alla 4-HPR tramite soppressione della sintesi di NO. La combinazione della 4-HPR con un antagonista di HER2, Trastuzumab, infatti è risultata essenziale per indurre apoptosi nelle linee cellulari con elevata espressione di HER2 (Simeone AM et al, 2003).

Un altro mediatore importante della azione della 4-HPR è la **ceramide**, un secondo messaggero lipidico riconosciuto generalmente come induttore di apoptosi in risposta a citochine infiammatorie come Fas e TNF o in seguito a condizioni di stress ossidativo. L'esposizione alla 4-HPR aumenta i livelli di ceramide intracellulari approssimativamente dalle 5 alle 10 volte rispetto ai controlli in diverse linee cellulari derivanti da neuroblastomi, melanomi, leucemie, sarcomi, carcinomi della prostata, del pancreas, del colon, dell'ovario e della mammella (Simeone AM and Tari AM, 2004; Hail N et al, 2006). Studi effettuati tramite contemporaneo trattamento della 4-HPR con agenti in grado di bloccare la sintesi (Fumonisin B1) o il metabolismo della ceramide, hanno permesso di comprendere che la 4-HPR ne induce la produzione tramite diversi meccanismi. L'aumento di ceramide infatti deriva sia dalla induzione della biosintesi *de novo* sia dalla idrolisi della sfingomielinina di membrana in seguito ad attivazione dell'enzima sfingomielinasi. La ceramide a sua volta promuove la apoptosi attraverso meccanismi differenti: essa infatti può interagire direttamente con gli effettori del processo apoptotico oppure può essere metabolizzata a differenti mediatori lipidici, noti come gangliosidi. In particolare la ceramide può essere metabolizzata a ganglioside GD3, ad opera degli enzimi glucosilceramide sintetasi e GD3 sintetasi. Lovat PE et al (2004) hanno dimostrato un legame diretto tra il GD3 e l'attivazione della 12-LOX durante l'apoptosi indotta in cellule di neuroblastoma, in quanto l'inibitore specifico della 12-LOX, baicaleina, è in grado di inibire sia l'apoptosi indotta da 4-HPR che da GD3 esogeno in parallelo alla inibizione della produzione di ROS; tali

osservazioni fanno ipotizzare che il GD3 sia implicato nella attivazione della 12-LOX e nella conseguente produzione di ROS.

La via effettrice della apoptosi indotta da 4-HPR è rappresentata dalla attivazione della **cascata delle caspasi** che culmina con la attivazione della Caspasi-3. L'esposizione alla 4-HPR infatti promuove il taglio della forma zimogena della Caspasi-3 (pro-Caspasi-3) nella sua forma attiva in linee cellulari di tumori della testa e del collo, neuroblastomi, gliomi, leucemie, carcinomi epatici, della cervice, della mammella e dell'ovario (Puduvalli VK et al, 1999; Hail N et al, 2006). L'attivazione della Caspasi-3 a sua volta promuove il taglio del suo substrato specifico PARP (*poly ADP-ribose polymerase*) (Faderl S et al, 2003). In cellule leucemiche 4-HPR causa aumento della attività della Caspasi-3 apparentemente in seguito a stabilizzazione della forma zimogena piuttosto che al suo processamento. Questo processo sembra essere associato ad un meccanismo indipendente dalla produzione di ROS e dallo stress ossidativo (DiPietrantonio AM et al, 2000). In alcuni tipi cellulari, l'attivazione della Caspasi-3 è accompagnata o preceduta dalla attivazione della Caspasi-9, implicando che la morte cellulare indotta da 4-HPR sia mediata, almeno in parte, dalla via intrinseca di apoptosi (Ulukaya E et al, 2003). Tuttavia sebbene la attivazione dalle caspasi sia un meccanismo generale nella morte cellulare indotta da 4-HPR, sono stati descritti anche processi degradativi indipendenti da essa (Boya P et al, 2003). Per esempio, nella linea cellulare di linfoma non Hodgkin la apoptosi indotta da 4-HPR non viene influenzata dal trattamento con l'inibitore generale delle caspasi, z-VAD-fmk, probabilmente grazie al rilascio dal mitocondrio della Endonucleasi G, un induttore della frammentazione del DNA indipendente dalle caspasi (Barna G et al, 2005).

1.3.3 Necrosi

Gli studi *in vitro* sulla induzione di apoptosi ad opera della 4-HPR indicano che essa si limita ad un intervallo di concentrazioni che può essere diverso a seconda del tipo cellulare ma che in generale è compreso tra 1 e 10-15 μM . Se tale dose viene superata la morte cellulare può avvenire tramite necrosi. Springer LN e Stewart BW (1998) hanno osservato necrosi in linee cellulari linfoblastoidi trattate con 4-HPR ad alte dosi (10-20 μM). Clifford JL et al (1999) hanno evidenziato necrosi in linee cellulari di carcinoma embrionale a concentrazioni di 4-HPR comprese tra 10 e 20 μM . Nel carcinoma a cellule squamose l'analisi citofluorimetrica e dell'Annexina V ha rivelato induzione di apoptosi a concentrazioni di 4-HPR inferiori a 15 μM e necrosi a dosi superiori; tale effetto è risultato indipendente dal grado tumorale delle cellule (Bruno S et al, 2002). Oltre che da dosi elevate, la induzione di necrosi può essere determinata dall'instaurarsi di condizioni particolari. In linee cellulari di neuroblastoma

l'induzione di apoptosi da parte di 4-HPR viene inibita dall'ipossia e dalla presenza di inibitori delle caspasi. Tuttavia in tali situazioni essa è in grado di indurre morte cellulare tramite necrosi; tale risultato indica un possibile impiego della 4-HPR anche in cellule con alterato meccanismo di induzione della cascata delle caspasi o in situazioni di ipossia, come quelle riscontrate in alcuni tumori (Maurer B et al, 1999).

1.3.4 Inibizione delle metastasi

Le prime osservazioni riguardanti il potenziale antimetastatico di 4-HPR derivano dagli studi condotti da Pienta KJ et al (1993) che hanno dimostrato che 4-HPR è in grado di inibire la proliferazione di cellule endoteliali e l'angiogenesi *in vivo* tramite saggio su membrana corioallantoica embrionale (CEM) di pollo; la modulazione di tali fattori da parte di 4-HPR riduce la diffusione metastatica in topi con adenocarcinoma della prostata. Inoltre è stato dimostrato che la 4-HPR è in grado di inibire la invasività di cellule trasformate chimicamente BALB/c3T3 tramite soppressione della motilità chemiotattica ed alterazione della adesione cellulare alla matrice extracellulare (Vaccari M et al, 2000). La sua capacità di inibizione della invasività tumorale è stata dimostrata anche in altri tipi tumorali quali carcinoma dell'ovario (Um SJ et al, 2001), neuroblastoma (Ribatti D et al, 2003) e sarcoma di Kaposi (Ferrari N et al, 2003).

La 4-HPR è in grado di inibire la proliferazione di cellule endoteliali stimolata da VEGF (fattore di crescita vascolare endoteliale) e da FGF-2 (fattore di crescita dei fibroblasti-2); quando cellule derivanti da neuroblastoma vengono impiantate su CAM il trattamento con 4-HPR produce un numero significativamente minore di nuovi capillari rispetto al controllo. Tali effetti non sembrano essere mediati da alterazione della sintesi di citochine angiogeniche quali VEGF ed FGF-2 come dimostrato dalla assenza di alterazione della loro espressione; tuttavia il trattamento con 4-HPR causa una riduzione della espressione dei loro rispettivi recettori (VEGFR-2 e FGF-2R-2) nelle cellule endoteliali. Tali studi suggeriscono che le proprietà antiangiogenetiche di 4-HPR osservate nel neuroblastoma derivano sia da un effetto diretto sulla proliferazione delle cellule endoteliali sia dalla riduzione della loro capacità di risposta agli stimoli proliferativi mediati da citochine angiogeniche (Ribatti D et al, 2003).

Analogamente a quanto rilevato nel neuroblastoma, gli studi condotti da Ferrari N et al (2003) nel sarcoma di Kaposi indicano che la attività antiangiogenica di 4-HPR deriva dalla riduzione di espressione di VEGFR-2; tuttavia qui essa è risultata associata a diminuzione del rilascio di MMP-2 (metallo proteinasi della matrice-2) e di VEGF da parte delle cellule tumorali.

L'effetto della 4-HPR sulla invasività cellulare è stato valutato in due linee cellulari di carcinoma mammario con differente capacità metastatica: MDA-MB-231 parentale ed MDA-MB-231/F10 (F10) che mostra una elevata capacità di dare metastasi ossee. La 4-HPR è risultata in grado di diminuire la capacità invasiva di entrambe le linee cellulari tramite soppressione della attività della MMP-9; tale effetto sulla MMP-9 sembra essere specifico in quanto non osservato nella inibizione della invasività generata dal trattamento con il farmaco di-etilaminaNONOate/AM (NONO-AM), la cui attività è mediata esclusivamente dal rilascio di NO (Simeone AM et al, 2006).

Il uno studio pubblicato recentemente, gli autori suggeriscono che gli effetti esercitati da 4-HPR sulla sopravvivenza e proliferazione cellulare, sulla invasività, sulla angiogenesi e sulle metastasi siano tutti dovuti alla sua capacità di inibizione del fattore di trascrizione nucleare-kB (NF-kB), noto per essere implicato nella regolazione a monte di tali processi. La 4-HPR infatti è in grado di sopprimere la attivazione di NF-kB generata da agenti diversi quali cancerogeni, promotori tumorali e stimoli infiammatori. Il controllo di NF-kB ad opera di 4-HPR non sembra derivare dalla sua modulazione a livello trascrizionale ma dalla inibizione della attività di IKK a sua volta dovuta alla inibizione della chinasi Akt. A sua volta NF-kB è coinvolto nella regolazione della espressione di proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare (Ciclina D1, c-Myc), della apoptosi (Bcl2, cIAP, TRAF, Bfl1) della invasività e delle metastasi (MMP-9, VEGF, COX-2) (Shishodia S et al, 2005).

1.4 Metabolismo e farmacocinetica

Le 4-HPR differisce significativamente dagli altri retinoidi per quanto riguarda la distribuzione e la emivita plasmatica. La principale differenza riguarda la assenza di accumulo epatico con conseguente ridotta tossicità in questa sede. Uno studio *in vivo* su topi ha dimostrato che la somministrazione orale di questo farmaco non causa aumento dei livelli di retinoidi a livello epatico ma viene selettivamente accumulato nella ghiandola mammaria. Nello stesso studio la emivita plasmatica della 4-HPR è risultata essere di 12 ore, un tempo molto maggiore rispetto al suo analogo naturale ATRA (Swanson BN et al, 1980). Tale studio differisce da quanto rilevato da Hultin TA et al (1986) in uno studio condotto su ratti e topi; essi infatti hanno evidenziato accumulo della 4-HPR principalmente a livello della vescica, mentre il fegato e la mammella rappresentano rispettivamente la seconda e la terza sede di distribuzione. Tuttavia in uno studio clinico sulla 4-HPR condotto su pazienti operate di tumore mammario è stato rilevato aumento degli enzimi epatici solo in 7 su 101 senza evidenza di tossicità epatica significativa (Costa A et al, 1989).

La 4-HPR viene principalmente metabolizzata in un composto lipofilo, la N-(4-metossifenil)all-trans-retinamide (MPR), che è il suo principale metabolita circolante e in minore percentuale in retinamidi polari, inclusa la HPR-O-glucuronide. I metaboliti polari vengono escreti con le urine e la bile, mentre quello non polare, MPR, si accumula in diversi tessuti quali quello adiposo, la prostata, il muscolo scheletrico, il fegato e l'intestino. Uno studio condotto *in vivo* su femmine di topo ha evidenziato che dopo somministrazione orale di 10 mg/kg di 4-HPR i più alti livelli di MPR si rilevano nel fegato e nel tessuto mammario (Hultin TA et al, 1990).

Se la MPR sia un metabolita attivo oppure no è una questione controversa. La MPR è risultata equipotente a 4-HPR nel far regredire la cheratinizzazione della trachea murina dovuta a carenza di retinoidi. In altri studi la MPR ha mostrato di possedere solo una debole attività biologica e non è risultata in grado di inibire la proliferazione di linee cellulari di carcinoma mammario e di melanoma sensibili a 4-HPR (Mehta RR et al, 1998). Gli effetti della 4-HPR tuttavia sembrano essere principalmente mediati da essa stessa piuttosto che dal suo metabolismo in quanto è stata dimostrata una sua attività in cellule di neuroblastoma che non sono in grado di metabolizzarla apprezzabilmente (Pagnan G et al, 1998). E' stato suggerito che sebbene la MPR potrebbe non essere attiva, la sua determinazione nelle cellule maligne è un marcatore indiretto della risposta delle cellule alla 4-HPR in quanto presente solo in cellule ad essa sensibili.

In un recente studio condotto da Villani MG et al (2004) su pazienti affette da carcinoma dell'ovario è stata identificata la presenza nel plasma di un metabolita polare non precedente identificato che consiste in una forma ossidata della 4-HPR con modificazione nella posizione 4 dell'esene ciclico (4-oxo-4-HPR).

Diversi studi hanno dimostrato che la 4-HPR influenza il metabolismo epatico del retinolo. La sua elevata affinità di legame per le proteine leganti il retinolo, RBPs, deputate al trasporto del retinolo plasmatico dal fegato ai tessuti periferici, porta alla formazione di un complesso stabile che ostacola l'interazione con la transtiretina. Questo induce la secrezione di altre RBP con conseguente accumulo a livello renale. Altri studi indicano che la 4-HPR blocca la secrezione del complesso retinolo-RBP dal fegato agli altri tessuti così causando diminuzione della concentrazione plasmatica sia di vitamina A che di RBP. Tali osservazioni sembrano essere alla base della proporzionale riduzione dei livelli plasmatici di retinolo e della conseguente nictalopia osservata *in vivo* (Formelli F et al, 1989).

Da uno studio clinico per valutare la farmacocinetica di 4-HPR è risultato che la somministrazione cronica quotidiana di 200 mg/*die* di 4-HPR per 5 anni causa una concentrazione plasmatica media di 350/ml (approssimativamente 1 μ M) che rimane costante durante tutto il periodo di trattamento. In parallelo si è

osservata una riduzione di retinoidi del 65% che però torna a livelli basali dopo 1 mese dalla fine del trattamento. La concentrazione di MPR è risultata simile a quella del farmaco non metabolizzato. Dopo 6-12 mesi dalla fine del trattamento, la concentrazione plasmatica di 4-HPR è al limite della possibilità di determinazione sebbene quella di MPR sia approssimativamente 5 volte maggiore (Formelli F et al, 2003).

Gli studi condotti da Garaventa A et al (2003) su bambini affetti da neuroblastoma hanno evidenziato un aumento della concentrazione plasmatica di farmaco in proporzione alla dose utilizzata e della sua emivita in seguito a trattamenti cronici. Tali parametri sono stati valutati in cicli costituiti da 28 giorni di trattamento seguiti da 7 giorni di interruzione. In tale studio sono state raggiunte concentrazioni di farmaco doppie nella somministrazione del 28esimo giorno rispetto a quella del primo. Infatti le concentrazioni plasmatiche medie raggiunte dal farmaco vanno da 0.6 e 6 μM (con dosi di 100 e 4000 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{die}$, rispettivamente) dopo la prima somministrazione a 1.3 e 12.9 μM nell'ultima, consentendo quindi di raggiungere valori paragonabili a quelli risultati efficaci nella inibizione della crescita cellulare *in vitro* (Maurer B et al, 1999). La emivita plasmatica è risultata essere di 17 ore dopo la prima somministrazione e aumentare a 25 ore dopo quella del 28esimo giorno (Garaventa A et al, 2003).

1.5 Studi clinici

Studi clinici di chemioprevenzione indicano un possibile utilizzo della 4-HPR per la regressione di lesioni premaligne o per indurne l'arresto.

Le lesioni premaligne orali sono caratterizzate dalla comparsa di macchie bianche (leucoplachia) o rosse (eritroplachia) nella cavità orale o nell'orofaringe e progrediscono in lesioni maligne nel 6-20% dei casi. In uno studio clinico, la 4-HPR è stata utilizzata per trattare 8 pazienti con leucoplachia diffusa e non operabile tramite applicazione topica per due volte al giorno. Dopo 1 mese di terapia, 2 pazienti hanno mostrato remissione completa della lesione mentre negli altri 6 è stata osservata una regressione maggiore del 75%. In seguito a questo risultato è stato condotto un altro studio allo scopo di valutare l'efficacia della 4-HPR nella prevenzione di recidive, di nuove localizzazioni e nello sviluppo di tumori epiteliali in pazienti precedentemente operati per leucoplachia. In tale studio sono stati arruolati 137 pazienti che hanno assunto 200 mg/die di 4-HPR per 52 settimane oppure nessun trattamento; ad un anno dal trattamento è stata osservata la comparsa di 8 recidive, 12 nuove localizzazioni e 1 secondo tumore nel gruppo di controllo, mentre 7 recidive, 2 nuove localizzazione e nessun carcinoma nel gruppo che aveva ricevuto il trattamento con 4-HPR suggerendo un effetto preventivo durante il trattamento

(Costa A et al, 1994). I risultati preliminari di un successivo studio multicentrico teso a valutare gli effetti della somministrazione a lungo termine della 4-HPR hanno confermato l'efficacia di 4-HPR nel prevenire recidive e nuove localizzazioni in pazienti precedentemente operati per leucoplachia. Lo studio, interrotto prematuramente a causa del ristretto numero di partecipanti, ha comunque suggerito un effetto protettivo anche nel periodo successivo al trattamento. Inoltre il farmaco è risultato ben tollerato e solo nel 5% dei casi sono state rilevate dermatiti e secchezza cutanea; altri effetti riportati sono stati aumento dei livelli ematici di trigliceridi e di γ -glutamyltransferasi (Chiesa F et al, 2005). Successivamente, in un *trial* di fase II è stato rilevato l'effetto protettivo per lo sviluppo di leucoplachia anche in pazienti che avevano mostrato resistenza ai retinoidi naturali (Lippman SM et al, 2006).

In un *trial* clinico, a 18 pazienti con cheratosi attinica facciale, una lesione premaligna cutanea, è stata somministrata 4-HPR a livello topico due volte al giorno per tre mesi. I risultati di tale studio hanno evidenziato una regressione completa nel 56% dei casi e parziale nel 44% (Moglia D et al, 1996).

Le biopsie dell'epitelio bronchiale di forti fumatori sono spesso caratterizzate da comparsa di metaplasia squamosa. Kurie J et al (2000) hanno valutato la capacità di 4-HPR di far regredire tale lesione premaligna. A questo scopo ai 139 soggetti fumatori inclusi nello studio è stata prescritta una terapia orale di 200 mg/die di 4-HPR per 6 mesi. I risultati hanno indicato che a queste dosi e modalità di somministrazione la 4-HPR non è in grado di far regredire la metaplasia squamosa né la displasia né le anomalie fenotipiche dell'epitelio bronchiale di individui fumatori.

La elevata biodisponibilità della 4-HPR a livello della ghiandola mammaria ed i risultati promettenti ottenuti in modelli animali (Abou-Issa H et al, 1995), hanno suggerito un suo possibile impiego nella prevenzione e nella terapia dei tumori in questa sede. Uno studio di fase I ha indicato la dose efficace di 200 mg/die come quella maggiormente sicura (Costa A et al, 1989). Tale dose è stata selezionata per gli studi successivi ed in particolare è stata utilizzata in un *trial* clinico di fase III teso alla valutazione della efficacia della 4-HPR nella prevenzione di recidive o di tumori controlaterali del seno. Lo studio è stato condotto su 2972 pazienti di età compresa tra 30 e 70 anni, precedentemente operate per tumore mammario in fase I o per carcinoma mammario *in situ*. Alle pazienti è stata prescritta una dose orale di 200 mg/die o nessun trattamento (gruppo di controllo) per 5 anni. Allo scopo di minimizzare gli effetti collaterali, alla fine di ogni mese sono stati effettuati 3 giorni di interruzione del trattamento per permettere un aumento dei livelli plasmatici di retinolo e minimizzare i problemi di adattamento al buio (nictalopia). I risultati dello studio non hanno mostrato effetti significativi nella prevenzione delle recidive. Tuttavia, nelle pazienti in premenopausa, è stato osservato un minore rischio di sviluppare

tumori controlaterali o ipsilaterali della mammella; nessun effetto se non un leggero aumento del rischio è stato riportato nelle donne in postmenopausa (Veronesi U et al, 1999). Poiché l'analisi della relazione tra trattamento con 4-HPR e stato menopausale non era stata pianificata nello studio iniziale, i risultati sono generati da ipotesi successive e necessitano pertanto di essere confermati. Tuttavia, studi recenti indicano che l'effetto favorevole osservato in donne in premenopausa ha un effetto duraturo almeno fino a 15 anni ed è inversamente correlato con l'età delle pazienti mettendo le premesse ad un *trial* di fase III di prevenzione primaria per giovani donne a rischio di sviluppare un tumore mammario (Veronesi U et al, 2006; Zanardi S et al, 2006). Lo studio clinico condotto da Veronesi U et al (1999), basato sulla somministrazione di 4-HPR per 5 anni, ha fornito anche un'ampia gamma di informazioni riguardo la sicurezza e la tollerabilità nei trattamenti a lungo termine, sebbene una accurata valutazione della tossicità non sia stata possibile a causa della mancanza di un gruppo di controllo a cui sia stato somministrato placebo. La maggior parte degli effetti avversi riportati sono stati di lieve entità (in accordo con i Criteri della Tossicità della Organizzazione Mondiale per la Salute) e sono stati nictalopia nel 19% dei casi e problemi dermatologici (secchezza della cute e delle mucose, prurito, orticaria) nel 18.6%; con minore frequenza sono stati riportati problemi gastrointestinali ed alterazione della superficie oculare (Camerini T et al, 2001). In contrasto a quanto accade con altri retinoidi, la somministrazione prolungata di 4-HPR non ha causato alterazione della densità ossea (Decensi A et al, 1999). E' interessante notare che la maggior parte degli effetti collaterali è risultata diminuire nel tempo ed è stata riscontrata più frequente nelle donne in postmenopausa. Tutti i sintomi sono risultati reversibili in seguito a sospensione della terapia. Solo il 4.4% delle pazienti ha interrotto la terapia a causa della tossicità associata al farmaco (Camerini T et al, 2001).

Da questo *trial* di prevenzione per i tumori del seno è emerso anche un effetto protettivo per lo sviluppo del carcinoma dell'ovario. Infatti l'incidenza di tumori in questa sede durante i 5 anni di osservazione è risultata essere significativamente più bassa nel gruppo di pazienti che avevano ricevuto il trattamento con 4-HPR (nessun caso) rispetto a quello di controllo (6 casi). Tuttavia nei 5 anni successivi al termine del trattamento si sono verificati 6 casi di tumore dell'ovario nel primo gruppo e 4 nel secondo suggerendo che l'effetto protettivo scompaia dopo la fine del trattamento. Nello stesso studio è stato suggerito un maggiore effetto protettivo in donne portatrici di mutazione in BRCA-1 (De Palo G et al, 2002).

Nello studio di chemioprevenzione per il tumore del seno è stato inoltre investigato l'effetto del trattamento con 4-HPR su IGF-I, fattore di crescita i cui livelli plasmatici sono associati ad aumento del rischio di sviluppare carcinoma mammario in donne in premenopausa. Da tale valutazione è emerso che il

trattamento con 4-HPR per un anno causa a una riduzione dei livelli plasmatici sia di IGF-1 che del rapporto molare IGF-1/IGFBP3 (IGF *binding protein 3*) nelle donne di età inferiore a 50 anni. Tale effetto viene apparentemente mantenuto per almeno 5 anni suggerendo che questo possa spiegare, almeno in parte, l'effetto protettivo osservato nelle donne in premenopausa (Decensi A et al, 2001). La capacità di 4-HPR di ridurre i livelli di IGF-1 plasmatici è stata osservata anche in studi di chemioprevenzione per altri tumori quali carcinoma della vescica e della prostata (Torrise R et al, 2000; Serrano D et al, 2005).

Sulla base dell'effetto sinergico osservato *in vitro* ed *in vivo* (Aoyama Y, 2002), è stato saggiato l'effetto della 4-HPR in associazione con Tamoxifene, antagonista dei recettori degli estrogeni. In uno studio pilota condotto da Conley B et al (2000) su donne ad alto rischio di sviluppare carcinoma mammario è stata valutata la sicurezza e la tollerabilità della associazione farmacologica. Alle pazienti sono stati somministrati 4 cicli di 4-HPR (200 mg/*die*) per 25 giorni seguiti da 3 giorni di interruzione in combinazione con Tamoxifene (20 mg/*die*) per 23 mesi oppure 4-HPR da sola. In seguito ai trattamenti l'effetto collaterale più frequente è stato la nictalopia la quale scompariva in seguito alla sospensione di 4-HPR; altri effetti reversibili comunemente riportati includevano secchezza oculare e della pelle, fatica e sbalzi dell'umore indicando una tollerabilità accettabile. Un *trial* di fase II sulla efficacia di tale combinazione in pazienti ad alto rischio di sviluppare un carcinoma mammario è stato iniziato presso l'Istituto Europeo di Oncologia. Alle pazienti randomizzate sono state somministrate 200 mg/*die* di 4-HPR o 5 mg/*die* di Tamoxifene o entrambi gli agenti o placebo per 2 anni. Gli studi sono stati interrotti a causa della evidenza di mancanza di influenza sui livelli plasmatici di IGF-1 e sulla insorgenza di tumori mammari nei diversi gruppi di trattamento; tuttavia è stata confermata la assenza di gravi effetti tossici (Guerrieri-Gonzaga A et al, 2006).

Gli studi clinici condotti da Chodak GW et al (1993) hanno mostrato che il trattamento con 4-HPR rallenta la progressione di tumori prostatici diagnosticati precocemente. Tuttavia la successiva valutazione di 4-HPR nella chemioprevenzione e nella modulazione di marcatori biologici nello sviluppo di tumori della prostata alle dosi *standard* di 200 mg/*die* non ha rivelato effetti protettivi (Urban D et al, 1999). Studi successivi condotti da Thaller C et al (2000) hanno riportato che la somministrazione di 4-HPR in pazienti affetti da tale tipo di tumore determina una concentrazione di farmaco nel tessuto tumorale significativamente superiore a quella plasmatica; tuttavia essa è risultata essere 10 volte inferiore a quella rilevata nel tessuto prostatico murino e a quella raggiunta nel carcinoma mammario umano. Tali osservazioni suggeriscono che la dose *standard* di 4-HPR determina solo un modesto livello di farmaco nel tessuto bersaglio e suggerisce la necessità di valutare dosi di farmaco superiori. Tale possibilità è incoraggiata dalla osservazione che la somministrazione di 4-

HPR a soggetti trattati chirurgicamente per carcinoma superficiale della vescica ed a rischio di sviluppare un carcinoma della prostata, determina un aumento dei livelli di PSA (*Prostate-Specific Antigen*) libero e del suo rapporto rispetto al PSA totale in soggetti di età inferiore a 60 anni. Questi risultati sono in linea con quanto rilevato nel carcinoma mammario e suggeriscono un effetto della 4-HPR dipendente dalla età; in particolare la 4-HPR sembra essere maggiormente efficace in soggetti più giovani rispetto agli anziani e cioè quando il sistema dell'IGF-1 sembra avere maggiore influenza sulla cancerogenesi (Serrano D et al, 2005).

Lo stesso protocollo di trattamento è stato utilizzato in uno studio clinico teso alla valutazione del potenziale effetto chemiopreventivo in pazienti con neoplasia intraepiteliale della cervice di stadio 2 e 3 (CIN 2 e CIN 3); dopo 6 mesi di trattamento la 4-HPR non è risultata essere più attiva del placebo. In tale studio è stata riportata l'insorgenza di effetti avversi come anemia, aumento dei livelli plasmatici di colesterolo e di trigliceridi, aumento degli enzimi epatici e riduzione della densità ossea (Follen M et al, 2001). Inoltre la valutazione dei parametri istopatologici e della polisomia del cromosoma 9, marcatore di instabilità genetica, a 12 mesi dal trattamento suggerisce che la 4-HPR può impedire la naturale regressione tumorale osservata in alcuni casi nel gruppo di pazienti a cui era stato somministrato solo placebo (Kim HG et al, 2005).

Dato il significativo numero di studi clinici che non ha evidenziato effetto preventivo della 4-HPR alle dosi *standard*, recentemente sono stati condotti diversi trial per valutare la dose massima tollerata e la tossicità di dosi farmacologiche superiori e/o prolungate.

Garaventa A et al (2003) hanno valutato tali parametri su pazienti in età pediatrica affetti da neuroblastoma non progressivo (4-HPR da 100 a 4000 mg/m²/die, 28 giorni di trattamento seguiti da 7 giorni di interruzione). Nel protocollo di trattamento utilizzato la 4-HPR è risultata ben tollerata e la tossicità accettabile. Nessuno dei pazienti ha interrotto la terapia a causa degli effetti avversi. Complessivamente non sono stati rilevati effetti avversi per concentrazioni plasmatiche di farmaco inferiori a 3 µM mentre la frequenza di effetti tossici passa da 31% in bambini con livelli plasmatici compresi tra 3 e 10 µM a 50% in quelli che raggiungono concentrazioni superiori a 10 µM. Il profilo di tossicità è risultato simile a quello osservato nei pazienti adulti essendo stati gli effetti avversi più comuni tossicità cutanea e nictalopia, osservata nel 23% dei pazienti. Tale effetto comunque diminuisce rapidamente durante i 7 giorni di sospensione della terapia e non sembra dipendente dalla dose utilizzata in quanto si osserva con la maggior parte delle dosi utilizzate e non aumenta in proporzione ad essa.

In un recente studio clinico condotto su bambini ad alto rischio di sviluppare un tumore solido (neuroblastoma, sarcoma di Ewing, melanoma) è stata determinata

la dose massima tollerata in età pediatrica corrispondente a $2475 \text{ mg/m}^2/\text{die}$ che permette di ottenere concentrazioni plasmatiche medie di circa $10 \text{ }\mu\text{M}$ dopo 7 giorni di trattamento. In tale studio il trattamento con 4-HPR ha determinato una risposta completa in 1 paziente affetto da neuroblastoma su 30 e stabilizzazione della patologia in 13 di essi; inoltre è stata osservata stabilizzazione della patologia con risoluzione graduale in 1 caso di sarcoma di Ewing su 5 (Villablanca JG et al 2006).

Nel *trial* di fase II condotto da Puduvalli VK et al (2004) è stata valutata l'efficacia della 4-HPR in pazienti adulti affetti da glioma maligno ricorrente; nello studio clinico sono stati inclusi 22 pazienti con glioma anaplastico (AG) e 23 con glioblastoma (GBM) a cui sono state somministrate dosi di 600 o 900 mg/m^2 per cicli di 6 settimane con trattamenti quotidiani effettuati nei giorni da 1 a 7 e da 22 a 28. In tale schema di trattamento il farmaco non ha dimostrato efficacia clinica contro l'AG e il GBM. Comunque di interesse è l'osservazione che un paziente con AG che aveva ricevuto 13 cicli di terapia con la dose maggiore ha mostrato una risposta radiologica duratura e aumento significativo della sopravvivenza libera da malattia, senza sostanziale tossicità; tale osservazione suggerisce la possibilità che la 4-HPR ad alte concentrazioni potrebbe essere attiva in particolari gruppi di pazienti. Un'altra osservazione importante derivante da tale studio è il rilevamento di moderate concentrazioni di 4-HPR e del suo metabolita MPR nel tessuto tumorale asportato chirurgicamente da un paziente dopo 2 settimane dalla ultima assunzione del farmaco; tale ritrovamento non solo conferma che 4-HPR e MPR sono in grado di attraversare la barriera emato-encefalica ma indica anche che qui hanno un'emivita relativamente lunga. In questo studio, inoltre, è stata confermata la buona tollerabilità del farmaco e la modestia degli effetti avversi suggerendo la possibilità di ripetere lo studio con dosi superiori di farmaco o con diversi schemi di trattamento.

La necessità di adeguamento delle dosi farmacologiche è suggerita anche dal recente studio di fase II condotto su pazienti affetti da carcinoma renale in quanto la dose saggiata di 900 mg/m^2 due volte al giorno per un ciclo di 21 giorni non ha dato risultati significativi. Anche in questo caso tuttavia è stata rilevata la bassa tossicità del farmaco e l'insorgenza di un solo caso di trombosi su 19 pazienti ed altri effetti più modesti quali anemia, stanchezza, disturbi gastrointestinali e nictalopia (Vaishampayan U et al, 2005).

In un successivo studio clinico è stato valutato l'effetto di differenti dosi di 4-HPR (0, 400, 600, 800 mg/die) somministrate da 1 a 4 settimane prima della asportazione chirurgica in pazienti affette da carcinoma ascitico dell'ovario. I risultati hanno mostrato una buona tollerabilità anche dalla dose maggiore saggiata senza insorgenza di problemi dermatologici né oftalmici significativi. Tuttavia in tale schema di trattamento la 4-HPR non ha mostrato attività né

modulazione della percentuale di cellule in proliferazione come misurata dal Ki67, marcatore prognostico significativo in questo tumore. Come suggerito dagli autori la spiegazione della mancanza di effetti terapeutici potrebbe essere dovuta alla bassa concentrazione raggiunta nel tessuto tumorale. Infatti la concentrazione plasmatica e nel fluido ascitico di 4-HPR e del metabolita 4-oxo-4-HPR è risultata essere circa di 1 μ M mentre quella di MPR leggermente più alta nel fluido ascitico rispetto al farmaco di origine, probabilmente grazie alla maggiore lipofilia (Colombo N et al, 2006); tuttavia tali concentrazioni sono inferiori a quelle risultate attive *in vitro* (Supino R et al, 1996). Un'altra possibile spiegazione suggerita dagli autori è il tempo di trattamento troppo corto (circa 14 giorni) (Colombo N et al, 2006).

2. CAVEOLAE E CAVEOLINA-1

2.1 Le caveolae

Le caveolae sono invaginazioni vescicolari della membrana plasmatica del diametro di 50-100 nm; esse sono state identificate per la prima volta nel 1953 tramite microscopia elettronica e descritte come strutture simili a "piccole caverne" a causa del loro aspetto (Palade GE, 1953).

Per molti anni dopo la loro scoperta, esse rimasero di interesse principalmente per i microscopisti elettronici in assenza di marcatori molecolari che ne permettessero una migliore caratterizzazione a livello molecolare. L'interesse per le caveolae è aumentato enormemente quando due gruppi, impegnati in aree di ricerca completamente differenti, ne identificarono la Caveolina come maggior componente proteico e marcatore molecolare. Infatti la Caveolina fu caratterizzata come bersaglio di fosforilazione tirosinica in cellule trasformate dal virus del Sarcoma di Rous e componente proteico delle membrane caveolari (Glenney JR Jr, 1989; Rothberg KG et al, 1992); dall'altro lato, essa fu descritta come una proteina integrale di membrana di 21 kDa (VIP 21) e principale componente dei complessi insolubili ai detergenti che localizzano nelle fossette non rivestite di clatrina dei tessuti e delle cellule in cultura (Kurzchalia TV et al, 1992). Successivamente fu evidente che le sequenze delle due proteine (caveolina e VIP21) erano identiche.

Le caveolae sono presenti nelle cellule derivanti dalla maggior parte dei tessuti ma sono particolarmente abbondanti nelle cellule endoteliali, nei pneumoniti di tipo I, negli adipociti, nei fibroblasti, nelle cellule del muscolo liscio e striato; al contrario, cellule come i globuli rossi, le piastrine, i linfociti, le cellule neuronali tipicamente mancano di caveolae (Fra AM et al, 1995). La morfologia delle caveolae sembra essere dinamica (forma a fiaschetto, vescicolare) e dipendente dal tipo cellulare oltre che dalle condizioni sperimentali in cui si osservano; esse possono essere aperte o chiuse sulla superficie cellulare in modo da formare compartimenti endocitotici o esocitotici. Esse inoltre si possono trovare sia singole che in gruppi simili a grappoli (rosette) o in lunghe strutture tubulari che si pensa originino dalla fusione di caveolae singole (Shaul PW and Anderson RGW, 1998).

Le caveolae rappresentano una sottoclasse di microdomini lipidici da cui si differenziano per la presenza della proteina Caveolina come marcatore molecolare. Tali regioni lipidiche altamente ordinate della membrana plasmatica sono molto ricche di colesterolo e sfingolipidi (glico-sfingolipidi e sfingomielina) in contrasto con il circostante doppio strato fosfo-lipico. Le particolari

proprietà biochimiche delle caveolae vengono conferite dalla loro particolare composizione: la abbondante presenza di lipidi causa resistenza alla solubilizzazione con detergenti non ionici a +4°C e ridotta densità che permettono di purificare le caveolae da cellule e tessuti tramite ultracentrifugazione su gradiente di saccarosio (Lisanti MP et al, 1999).

Le principali funzioni attribuite alle caveolae riguardano il trasporto del colesterolo, il trasporto vescicolare e la trasduzione del segnale.

2.2 I geni delle Caveoline

Nelle cellule di mammifero la famiglia di geni delle caveoline è costituita da tre membri: CAV-1, CAV-2, CAV-3. Il gene CAV-1 è stato il primo ad essere scoperto ed è costituito da tre esoni altamente conservati in varie specie sia nella sequenza che nella struttura. Il gene della Caveolina-2 fu identificato quando il micro-sequenziamento di domini di membrane caveolari di adipociti purificati rivelò la presenza di una sequenza peptidica molto simile a quella di Caveolina-1, differente però in alcuni residui chiave fortemente conservati. La sovrapposizione di questa nuova sequenza con EST (sequenze espresse che fungono da etichetta) note, rivelò che essa codificava per una proteina di 162 amminoacidi simile a Caveolina-1, successivamente denominata Caveolina-2 (Scherer PE et al, 1996). Il gene della Caveolina-3 fu clonato da una libreria di cDNA cercando sequenze simili a Caveolina-1 (Tang ZL et al, 1996).

La proteina Caveolina-1 esiste in due isoforme, denominate α e β ; la isoforma α è costituita dai residui 1-178 e quella β dai residui 32-178, risultando così in una proteina più piccola di 3 kDa rispetto alla α . La traduzione della isoforma β ha inizio da un sito di iniziazione alternativo a livello della metionina 32. Entrambe le isoforme di Caveolina-1 sono capaci di guidare la formazione delle caveolae se espresse in cellule di insetto Sf21, mancanti di caveolae endogene e l'osservazione di caveolae ricombinati isolate rivela che generano caveolae morfologicamente simili (Li S et al, 1996). Sebbene l'esatto significato funzionale di queste distinte isoforme è ancora non chiaro, alcuni studi suggeriscono che Caveolina-1 α è localizzata in maniera predominante nelle caveolae invaginate profondamente e può guidare la formazione delle caveolae più efficientemente della isoforma β .

La proteina Caveolina-2 ha tre isoforme di cui quelle β e γ rappresentano forme troncate rispetto alla α ; fino ad oggi poco è noto riguardo al significato funzionale delle isoforme β e γ .

Nell'uomo, i geni della Caveolina e le proteine hanno in comune una significativa omologia; la Caveolina-2 è identica al 38% e simile al 58% alla Caveolina-1 mentre la Caveolina-3 ne è identica al 65% e simile all'85%. Queste

proteine sono altamente conservate nell'evoluzione suggerendo che almeno alcune funzioni siano anch'esse conservate (Tang Z et al, 1997). Inoltre nel dominio N-terminale è stata identificata una corta sequenza di otto aminoacidi (Phe-Glu-Asp-Val-Ile-Ala-Glu-Pro) che consiste nella “*caveolin signature sequenze*” o CSS, un motivo identico in tutte tre le proteine Caveoline.

E' interessante notare che i geni CAV-1 e CAV-2 localizzano sullo stesso cromosoma (7q31.1) molto vicino l'uno all'altro (19kb di distanza), mentre CAV-3 mappa in un cromosoma differente (3p25).

Le proteine Caveolina-1 e Caveolina-2 hanno una distribuzione relativamente ubiquitaria, essendo coespresse nella maggior parte dei tipi cellulari differenziati, con la importante eccezione delle fibre muscolari scheletriche ed i miociti cardiaci. La distribuzione della Caveolina-3 sembra essere limitata essenzialmente alle cellule del muscolo scheletrico, al diaframma e al cuore (Okamoto T et al, 1998).

Sebbene le Caveoline siano piccole proteine di 18-24 kDa, esse interagiscono tra di loro per formare strutture omo ed etero-oligomeriche di 14-16 monomeri essenziali per una corretta biogenesi delle caveolae. La espressione di Caveolina-1 oltre ad essere sufficiente e necessaria per guidare la formazione delle caveolae è necessaria per una stabile espressione e localizzazione di Caveolina-2; infatti la Caveolina-2 da sola non è in grado di indurre biogenesi delle caveolae. L'espressione di Caveolina-3, in modo simile alla Caveolina-1, è sufficiente per una corretta formazione delle caveolae (Galbiati F et al, 2001a).

2.3 Caveolina-1

Come prototipo della famiglia delle Caveoline, la Caveolina-1 è stata il centro di interesse di molti studi biochimici mettendo le basi alle principali conoscenze riguardo alle relazioni di queste proteine con gli altri compartimenti subcellulari. La Caveolina-1 è una proteina integrale di membrana costituita da 178 aminoacidi di cui i maggiori livelli di espressione sono stati trovati negli adipociti, nelle cellule endoteliali, nei fibroblasti e nei pneumociti tipo 1.

Essa presenta una struttura simile ad una forcina con i domini amino-terminale e carbossi-terminale entrambi citosolici ed un interposto dominio idrofobico (residui 103-134) inserito nella membrana plasmatica. L'estremità carbossi-terminale della Caveolina-1 è palmitoilata in residui di cisteina mentre quella amino-terminale è fosforilata in tirosina, modificazioni post-traduzionali necessarie affinché entrambe le estremità rimangano citoplasmatiche (Dietzen DJ et al, 1995). Analisi mutazionali hanno dimostrato l'importanza delle due regioni fiancheggianti il dominio centrale idrofobico per l'inserimento della Caveolina-1 in membrana; tali regioni sono state denominate rispettivamente N-

MAD (*NH₂-terminal membrane attachment domain*, residui 82-101) e C-MAD (*COOH-terminal membrane attachment domain*, residui 135-150). La porzione di Caveolina-1 compresa tra i residui 61-101, dominio di oligomerizzazione, permette l'interazione tra i diversi monomeri per formare strutture oligomeriche mentre l'interazione con altre proteine è mediata dal CSD (*Caveolin-1 Scaffolding Domain*), individuato tra i residui 82-101 (Schlegel A and Lisanti MP, 2000).

La Caveolina-1 contemporaneamente alla sua traduzione a livello del reticolo endoplasmatico viene inserita nelle membrane di quest'ultimo con le estremità amino- e carbossi-terminale entrambe rivolte verso il citoplasma; qui subisce un primo processo di oligomerizzazione. Dal reticolo endoplasmatico essa viene trasportata all'apparato di Golgi dove subisce un secondo processo di oligomerizzazione e viene inclusa in domini di membrana ricchi di colesterolo e sfingolipidi, divenendo così insolubile ai detergenti. Una volta raggiunta la superficie cellulare gli oligomeri di Caveolina-1 formati da 14-16 molecole si uniscono a formare le caratteristiche strutture di più alto ordine visibili a livello della membrana plasmatica che sono responsabili dell'aspetto striato che si osserva al microscopio elettronico. Dalla membrana plasmatica, le caveolae possono poi tornare indietro verso il reticolo endoplasmatico (Schlegel A and Lisanti MP, 2001).

E' interessante notare che sebbene sia una proteina integrale di membrana, la Caveolina-1 è stata trovata nel lume del reticolo endoplasmatico di cellule trattate con colesterolo ossidasi-1 mentre nei fibroblasti una piccola frazione è presente come proteina citoplasmatica solubile inglobata in un complesso lipidico implicato nel trasporto intracellulare dei lipidi (Uittenbogaard A et al, 1998). Essa inoltre è stata identificata in numerose altre localizzazioni cellulari, inclusi mitocondri (cellule epiteliali delle vie aeree ed epatociti), lume delle vescicole secretorie (cellule sierose del pancreas e ghiandole salivari), citoplasma (cellule muscolari scheletriche e cheratinociti). La sua distribuzione tra le varie localizzazioni cellulari, quindi, sembra essere dipendente soprattutto dal tipo cellulare investigato. Non sono noti i meccanismi che determinano lo spostamento intracellulare di Caveolina-1 tra i vari compartimenti e i suoi ruoli nelle differenti localizzazioni (Quest A et al, 2004).

2.4 Ruolo funzionale di Caveolae e Caveolina-1

2.4.1 Trasporto vescicolare

Le caveolae sembrano mediare il legame selettivo ed il trasporto di numerose molecole tramite differenti processi (transcitisi, endocitosi, potocitosi).

Il termine **transcitosi** è stato inizialmente utilizzato da Simionescu N et al (1975) per descrivere il movimento di macromolecole dal lato luminale delle cellule endoteliali dei capillari al compartimento interstiziale per la successiva cattura da parte dei tessuti sottostanti.

Successivamente fu evidente che le caveolae sono implicate nel trasporto selettivo di molecole e ioni tramite un processo di **endocitosi** distinto da quello mediato dalle fossette rivestite di clatrina. Le prime evidenze di questa selettività derivarono dall'osservazione che le tossine del colera e del tetano erano preferenzialmente legate ed internalizzate tramite le caveolae e che il trattamento delle cellule con agenti in grado di legare il colesterolo (nistatina o filipina) era in grado di abrogare l'internalizzazione di alcune macromolecole (albumina) senza influenzare l'endocitosi dipendente dalla clatrina (Schnitzer JE et al, 1994). Studi successivi hanno dimostrato che tale selettività è dovuta alla localizzazione dei recettori specifici per le varie molecole endocitate. In seguito al legame del ligando con lo specifico recettore si ha l'invaginazione dalla membrana plasmatica a formare un compartimento chiuso (caveosoma) mediante un processo che richiede l'idrolisi del GTP ed i classici componenti molecolari coinvolti nella formazione delle vescicole (proteine SNARE, VAMP, SNAP-25, dinamina); successivamente le molecole endocitate vengono trasportate nel reticolo endoplasmatico o in altri compartimenti intracellulari (Cohen AW et al, 2004).

Una crescente lista di patogeni, inclusi virus, batteri e loro tossine, funghi e anche prioni può interagire con i domini di membrana delle caveolae; il traffico intracellulare di questi agenti tramite le caveolae differisce notevolmente dalla classica internalizzazione dei ligandi tramite endocitosi mediata da clatrina in quanto tale via permette loro di evitare la degradazione lisosomiale (Norkin LC, 2001).

Le caveolae inoltre sono implicate nella cattura e trasporto di soluti all'interno della cellula di piccole molecole (< 1kDa) senza la formazione di vescicole endocitotiche ma rimanendo associate con la membrana plasmatica tramite in processo denominato **potocitosi** o "cellula che beve" (Cohen AW et al, 2004).

2.4.2 Omeostasi del colesterolo

Numerosi studi hanno dimostrato che il colesterolo ha un ruolo fondamentale sia nella struttura che nella funzionalità delle caveolae. Le proteine legate al lato extracellulare della membrana plasmatica tramite il glicosil-fosfatidil-inositolo si associano alle caveolae in maniera dipendente dal colesterolo. La superficie intracellulare delle caveolae, invece, è caratterizzata da un rivestimento striato che viene distrutto dal trattamento con agenti in grado di legare il colesterolo, come filippina e nistatina (Rothberg KG et al, 1992). La diretta connessione tra

caveoline e colesterolo è derivata da studi *in vitro*, che hanno dimostrato che la Caveolina-1 purificata è in grado di ricostituirsi solo all'interno di vescicole contenenti colesterolo in cui essa si complessa con il colesterolo in un rapporto 1:1 (Murata M et al, 1995).

L'ossidazione del colesterolo in colestrolone da parte della colesterolo-ossidasi oltre a causare perdita dell'equilibrio intracellulare del colesterolo causa la traslocazione della Caveolina-1 dalla membrana plasmatica al reticolo endoplasmatico/Golgi ed una riduzione del numero di caveolae; la rimozione della colesterolo-ossidasi tuttavia permette il ritorno della Caveolina-1 e del colesterolo libero alle caveolae (Conrad PA et al, 1996). L'incubazione di fibroblasti con lipoproteine a bassa densità (LDL), che rappresenta un modo per rifornire le cellule di colesterolo libero, causa aumento dei livelli di mRNA di Caveolina-1 (Fielding CJ et al, 1997).

Tali risultati indicano che l'espressione di Caveolina-1 e la sua distribuzione intracellulare sono dipendenti dai livelli intracellulari di colesterolo. Studi di mutazione/delezione della regione 1-kb a monte del promotore di Cav-1, infatti, hanno rivelato la presenza di due elementi di risposta agli steroli (SREs) necessari per una robusta attivazione trascrizionale da parte del colesterolo libero tramite il fattore di trascrizione SREBR-1; questa regolazione causa una diminuzione dei livelli di mRNA di Caveolina-1 nei periodi di scarsità di colesterolo, mentre un suo aumento ha un effetto opposto. Oltre a questo ruolo positivo nella regolazione della trascrizione, il colesterolo sembra modularne direttamente l'espressione tramite stabilizzazione della proteina stessa (Bist A et al, 1997).

La relazione trascrizionale tra Caveolina-1 e colesterolo sembra essere dovuta all'osservazione che caveolae/caveoline sono implicate nel trasporto e nella regolazione dei livelli intracellulari di colesterolo.

La sintesi *de novo* del colesterolo avviene a livello del reticolo endoplasmatico da dove viene trasportato ai vari compartimenti di membrana di cui quella plasmatica rappresenta il sito principale contenendo fino al 90% del colesterolo cellulare. Tale processo è finemente controllato dalla regolazione dell'enzima che catalizza la prima fase di biosintesi, la 3-idrossi-3-metilglutaril-coenzima A Reduttasi o HMGCoAR, a partire da monomeri di acetato (Fielding CJ and Fielding PE, 2001). Il meccanismo tramite cui poi il colesterolo è trasportato alla membrana non è esattamente noto ma sembra avvenire tramite un meccanismo indipendente dal Golgi. Tramite utilizzo di acetato marcato radioattivamente tuttavia è stato dimostrato che il colesterolo di nuova sintesi raggiunge la membrana plasmatica solo dopo un iniziale trasporto alle membrane caveolari; tale trasporto sembra essere mediato da un complesso proteico non vescicolare che include la Caveolina-1 citosolica ed una serie di proteine chaperonine delle famiglie ciclofiline e hsp (*heat shock protein*) (Uittenbogaard A et al, 1998). I tre

siti di palmitoilazione di Caveolina-1 sono necessari per il legame e la cessione del colesterolo alle caveolae sebbene essi non siano risultati implicati nel legame di Caveolina-1 alla membrana né nella sua localizzazione caveolare.

Oltre che da nuova sintesi il colesterolo cellulare può derivare dalla endocitosi di LDL tramite gli specifici recettori (LDL-R); in seguito al legame con le LDL i recettori vengono internalizzati negli endosomi e trasportati ai lisosomi. Dopo aver lasciato i lisosomi, il colesterolo è trasportato al reticolo endoplasmatico e poi alla membrana plasmatica tramite l'apparato di Golgi (Razani B et al, 2002). Il colesterolo libero può essere esterificato ad opera di Acat (Acil-coenzimaA colesterolo aciltransferasi) un enzima localizzato nel reticolo endoplasmatico la cui attività è determinata dalla presenza di colesterolo libero. La esterificazione rappresenta una tappa molto importante nel mantenimento della omeostasi del colesterolo in quanto permette di trasformare gli eccessi di colesterolo libero, dannosi per la cellula, in piccole gocce lipidiche non tossiche. Acat inoltre fornisce esteri per la costituzione di lipoproteine che rappresentano la forma in cui il colesterolo viene trasportato (Fielding CJ and Fielding PE, 2001). Nei mammiferi sono stati identificati due geni codificanti per Acat: ACAT-1 che ha una espressione ubiquitaria ed ACAT-2 che ha una espressione più limitata essendo stato individuato negli epatociti, nelle cellule dell'intestino e nei macrofagi maturi (Chang C et al, 2006).

Per mantenere livelli costanti di colesterolo intracellulare, le cellule periferiche possono rilasciare il colesterolo libero dal versante extracellulare della membrana plasmatica alle lipoproteine ad alta densità (HDL) che poi lo trasportano al fegato (trasporto inverso del colesterolo). La Caveolina-1 è implicata nella regolazione di questo processo in quanto è stato dimostrato che, in seguito ad aumento intracellulare di colesterolo tramite incubazione con LDL, gli eccessi di questo lipide si localizzano nelle caveolae. Inoltre la riduzione di espressione di Caveolina-1 mediata da antisense causa diminuzione dell'efflusso del colesterolo. A supporto di questi dati, il suo aumento di espressione *in vivo* nel fegato murino causa un aumento dei livelli di colesterolo-HDL nel plasma (Frank PG et al, 2001). La Caveolina-1 perciò sembra agire aumentando la disponibilità e la cessione di colesterolo alla membrana plasmatica caveolare per il successivo efflusso.

Il trasporto del colesterolo dalle caveolae alle HDL può avvenire tramite diffusione facilitata che dipende dalla presenza di SR-B1, membro della famiglia dei recettori spazzino, la cui espressione è abbondante nelle caveolae. Tale recettore era stato inizialmente caratterizzato come catalizzatore della cattura selettiva degli esteri del colesterolo dalle lipoproteine extracellulari, in particolare HDL (Williams TM and Lisanti MP, 2004).

Un altro importante meccanismo per la cessione extracellulare di colesterolo è l'assemblaggio di nuove lipoproteine HDL a partire da fosfolipidi e colesterolo

cellulari. Diverse specifiche funzioni cellulari sono richieste per tale reazione incluso un sito di interazione per la apolipoproteina ApoA1 con le specifiche fonti di lipidi intracellulari. Tale reazione, che sembra essere la fonte principale di HDL per il plasma, è mediata dalla proteina di membrana codificata dal gene ABCA-1 (*ATP-binding cassette transporter A1*) che agisce essenzialmente come mediatore del legame tra la ApoA1 e la cellula (Fitzgerald ML et al, 2004). Abca-1 è essenziale per la formazione di HDL plasmatiche come dimostrato dalla deficienza di HDL in topi mancanti di tale gene. Nell'uomo mutazioni nel gene ABCA-1 sono associate all'insorgenza della malattia di Tangier, una delle patologie genetiche associate a carenza di HDL. La funzione di Abca-1 nel mantenimento dell'omeostasi del colesterolo sembra quindi quella di ridurre il colesterolo intracellulare non esterificato quando i suoi livelli sono troppo elevati. I livelli intracellulari di Abca-1 infatti sono determinati essenzialmente dai livelli di colesterolo libero citoplasmatico in quanto è stato osservato che la sua espressione diminuisce in seguito a deplezione di colesterolo ed aumenta in seguito a suo rifornimento (Yokoyama S, 2006).

Un altro membro della superfamiglia dei trasportatori ABC di membrana che ha un ruolo nel trasporto del colesterolo all'interno della cellula è la proteina codificata dal gene MDR1 o Glicoproteina-P. Essa, agendo in direzione opposta a Caveolina-1, è implicata nel rilascio del colesterolo libero dalla membrana plasmatica permettendo così il suo trasporto al reticolo endoplasmatico, sede della esterificazione ad opera di Acat (Batetta B et al, 2003). Studi di incubazione con LDL ed HDL, rispettivamente per fornire o rimuovere colesterolo cellulare, hanno evidenziato che l'espressione di MDR1 è regolata dai livelli di colesterolo intracellulari. Inoltre è stata rilevata una correlazione positiva tra i livelli di mRNA di MDR1 ed il tasso di proliferazione cellulare mentre è stata rilevata una correlazione negativa con l'espressione di Caveolina-1 *in vitro* sia in cellule normali che tumorali (Orlowski S et al, 2006).

2.4.3 Trasduzione dei segnali

La scoperta che i microdomini caveolari purificati biochimicamente contenessero numerose molecole di segnale ha portato Lisanti MP et al (1994) di ipotizzare che le caveolae svolgessero un ruolo importante nella trasduzione dei segnali cellulari raggruppando numerose molecole e permettendo così una rapida ed efficiente trasmissione del segnale (*Caveolae Signaling Hypothesis*). Secondo tale ipotesi le caveolae servirebbero come punto di attracco per numerosi recettori della superficie cellulare, che, quando attivati dal legame con lo specifico ligando, vengono reclutati nelle caveolae dove interagiscono con i loro specifici componenti del segnale.

La *Caveolae Signaling Hypothesis* è stata confermata ed ampliata fino ad

includere un ruolo attivo da parte di Caveolina-1 dopo la scoperta che questa proteina interagisce e regola l'attività di numerose proteine segnale associate alle caveolae. L'interazione è mediata dal dominio CSD (*Caveolin-1 Scaffolding Domain*) di Caveolina-1 e da un aminoacido aromatico del *Caveolin Binding Motif* (CBM), dominio condiviso dalla maggior parte delle proteine in grado di interagire con Caveolina-1; il CBM solitamente si trova all'interno del sito catalitico attivo ed è caratterizzato dalla sequenza $\Phi X \Phi X X X X \Phi$, $\Phi X X X X \Phi X X \Phi$ oppure $\Phi X \Phi X X X X \Phi X X \Phi$ dove Φ può essere una fenilalanina, una tirosina o un triptofano ed X un aminoacido qualunque (Couet J et al, 1997). Successivamente a queste iniziali scoperte, una rapida successione di studi ha permesso di identificare una ampia varietà di molecole segnale che localizza nelle caveolae inclusi recettori associati a proteine G, proteine G eterotrimeriche, recettori di membrana (EGF-R, PDGF-R), chinasi tirosiniche non recettoriali (Src, Fyn), chinasi in serina/treonina non recettoriali (PKA, PKC, ERK, PI3-chinasi) ed altri enzimi (eNOS, adenilato ciclasi); sebbene non sembri essere un criterio assoluto per localizzare nelle caveolae, la maggior parte di queste molecole segnale contiene modificazioni lipidiche come gruppi prenilici, palmitoilici, miristoilici (Song KS et al 1997).

Per quanto riguarda la funzione delle interazioni tra Caveolina-1 e le proteine segnale, studi condotti da Li S et al (1995) mostrano che un peptide mimetico contenente la sequenza CSD di Caveolina-1 è in grado di inibire direttamente l'attivazione delle proteine G. Successivamente Couet J et al (1997) hanno dimostrato che nelle chinasi in tirosina o in serina/treonina, in cui il dominio catalitico consiste di 11 sottodomini (I-XI) altamente conservati di cui il IX contiene il CBM, il legame alla Caveolina-1 tramite CSD è sufficiente per inibire la sua attività fosfo-transferasica *in vitro*. Inoltre, analogamente a quanto osservato per le proteine G, le proteine chinasi sono fortemente inibite da peptidi contenenti la sequenza del CSD. Altri studi hanno poi dimostrato che Caveolina-1 ed il suo CSD regolano negativamente il segnale di molte altre proteine, incluse eNOS, il recettore per EGF, la tirosina chinasi Src, H-Ras e c-Neu (Razani B et al, 2002).

A parte poche eccezioni, infatti, il legame della Caveolina-1 inibisce l'attività delle proteine con cui interagisce. In alcuni casi, il legame a Caveolina-1 mantiene la proteina segnale in uno stato inattivo fino all'arrivo dello stimolo, che può essere rappresentato dal legame dello specifico ligando o da modificazioni post-traduzionali come la fosforilazione; in altri casi la Caveolina-1 serve per portare a termine la trasmissione del segnale dopo l'attivazione. In entrambi i casi, l'interazione con Caveolina-1 è dinamica e strettamente regolata (Schlegel A et al, 2000)

Tra i meccanismi molecolari regolati da Caveolina-1, quello meglio caratterizzato è probabilmente il segnale di eNOS (ossido di azoto sintetasi

endoteliale). Tale enzima, tramite un meccanismo dipendente dal suo gruppo palmitoile, viene trasportato alle caveolae dove l'interazione CSD/CBM ne causa l'inibizione. L'attivazione di eNOS, con conseguente produzione di ossido di azoto, può essere causata dall'aumento di calcio citosolico a seguito dell'azione di agonisti quali l'acetilcolina; in questo caso infatti, il Calcio lega ed attiva la Calmodulina che a sua volta interagisce con eNOS spiazzando l'inibizione data da Caveolina-1. Diversi studi hanno mostrato che mutazioni puntiformi nel CBM di eNOS causano perdita della capacità di interagire con Caveolina-1 senza tuttavia alterarne la attività enzimatica (Razani B et al, 2002). Il recettore β -adrenergico (β -AR) è un classico recettore a sette domini transmembrana associato a proteina G che in seguito a stimolazione attiva un segnale a cascata che coinvolge proteine associate alle caveolae, a partire dalla subunità Gs. Questo, a sua volta, porta all'attivazione dell'adenilato ciclasi con conseguente aumento della concentrazione di cAMP e attivazione della proteina chinasi A (PKA).

L'attivazione del recettore per il fattore di crescita epidermico (EGF-R) in seguito al legame con lo specifico ligando, induce proliferazione cellulare tramite innesco della via di segnale della cascata delle p42/44 MAP (*mitogen-activated protein*) chinasi. Molti componenti di tale *pathway* sembrano essere compartimentalizzati nelle caveolae inclusi Ras, Raf-1, MEK-1/2 ed ERK-1/2; Caveolina-1 controlla il segnale di proliferazione tramite questa via ed inibisce direttamente ERK-1/2 sia *in vivo* che *in vitro*. Risultati ottenuti in cellule di mammifero mostrano che tale cascata di segnale viene iperattivata in seguito a deplezione di colesterolo o a trasfezione con un costrutto di Caveolina-1 antisense (Cohen AW et al, 2004).

La via del fosfatidil-inositolo 3 (PI3)-chinasi /Akt costituisce un'altra via di segnale criticamente coinvolta nel controllo della crescita e della sopravvivenza cellulare. Studi condotti da Zundel W et al (2000) indicano che una elevata espressione di Caveolina-1 sensibilizza i fibroblasti alla morte cellulare indotta da ceramide tramite un meccanismo dipendente da PI3-chinasi. Inoltre è stato riportato che l'espressione di Caveolina-1 riduce l'attività di Akt e sensibilizza sia la linea cellulare di fibroblasti immortalizzati NIH-3T3 che quella di carcinoma della vescica T24 alla morte cellulare indotta da staurosporina; nello stesso studio la sensibilità alla staurosporina di cellule esprimenti Caveolina-1 antisense viene ristabilita dal trattamento con l'inibitore della PI3-chinasi LY294002 (Liu J et al, 2001). In contrasto gli studi di Shack S et al (2003) indicano che la sensibilizzazione indotta da Caveolina-1 all'arsenico sia associata ad attivazione della via PI3-K/Akt piuttosto che ad una sua inibizione. Sia *in vitro* che *in vivo* inoltre una elevata espressione di Caveolina-1 sostiene la sopravvivenza cellulare tramite attivazione di Akt in seguito al mantenimento del suo stato fosforilato; tale attivazione sembra derivare dalla interazione e

quindi inibizione delle fosfatasi in serina/treonina PP1 e PP2A ad opera di Caveolina-1 (Li L et al, 2003).

Esiste una interessante relazione tra Caveolina-1 ed il segnale mediato dal recettore dell'insulina (Ins-R). Al contrario delle regolazioni negative frequentemente osservate, la Caveolina aumenta la fosforilazione dei bersagli a valle dell'insulina, incluso IRS-1. Tali effetti sono mediati da una diretta interazione tra Caveolina-1 e Ins-R. La Caveolina-1 quindi agisce come attivatore del segnale mediato dall'insulina che inoltre ne causa la fosforilazione a livello della tirosina 14. Oltre che in seguito a stimolazione con insulina, la Caveolina-1 viene fosforilata in risposta a stimoli extracellulari come radiazioni ultraviolette, H₂O₂, iperosmolarità, tramite un meccanismo dipendente dalla p38 MAP chinasi e dalla chinasi Src suggerendo perciò di essere un importante elemento a monte della cascata di trasduzione del segnale attivata da stress cellulare (Volonte D et al, 2001).

Allo stesso modo, la Caveolina-1 sembra avere un ruolo chiave nel collegare il segnale mediato dalle integrine con l'attivazione della via dei segnali di Ras-ERK e la progressione del ciclo cellulare. Infatti, sebbene la maggior parte delle proteine interagiscano con le Caveoline durante differenti stadi del loro ciclo di attivazione, alcuni studi rivelano che esse possono formare complessi ternari con proteine segnale mancanti di attività catalitica intrinseca; ad esempio l'interazione della Caveolina-1 e Fyn con la corta coda citoplasmatica delle β 1-integrine determina la formazione di un complesso necessario per l'azione dei ligandi extracellulari implicati nella regolazione della crescita cellulare dipendente dall'ancoraggio. Questo meccanismo potrebbe spiegare perché la perdita di espressione Caveolina-1 nelle cellule trasformate favorisce la crescita indipendente dall'ancoraggio; altri risultati, invece, suggeriscono che sia la fosforilazione di Caveolina-1 in tirosina 14 a stimolare la crescita indipendente dall'ancoraggio e la migrazione cellulare tramite un meccanismo che richiede la proteina adattatrice GRB7 (Quest A et al, 2004). Altre proteine come il recettore urochinasico u-PAR associato a glicosilfosfatidil inositolo fanno parte del complesso integrine/caveoline e regolano la funzione delle integrine (Williams TM and Lisanti MP, 2005).

In parallelo agli studi che hanno identificato il ruolo delle caveolae ed in particolare di Caveolina-1 nella compartimentalizzazione e integrazione dei segnali cellulari, si sono moltiplicate le evidenze della sua implicazione nella patologia molecolare di un certo numero di patologie umane quali diabete, infiammazioni, tumori, aterosclerosi, sindrome di Alzheimer (Schwencke C et al, 2006).

2.5 Caveolina-1 nelle patologie umane

2.5.1 Diabete tipo II

Le prime evidenze che le caveolae fossero implicate nel segnale mediato dall'insulina derivano dalle osservazioni che tali microdomini sono particolarmente abbondanti negli adipociti e che i livelli sia di proteina Caveolina-1 che del suo mRNA aumentano notevolmente durante il differenziamento di fibroblasti murini 3T3-L1 in adipociti che è un processo dipendente dall'insulina (Scherer PE et al, 1994). Il legame dell'insulina al suo recettore specifico (Ins-R) suscita una cascata di eventi di fosforilazione che iniziano con l'autofosforilazione di Ins-R seguita dalla fosforilazione di molecole segnale a valle inclusa la famiglia dei substrati del recettore dell'insulina (IRS). Ins-R sembra essere localizzato nelle caveolae e, in seguito a stimolazione, interagisce con Caveolina-1 con conseguente fosforilazione della Caveolina-1 in tirosina 14. Negli adipociti tale fosforilazione è specifica per l'insulina in quanto non si osserva con altri fattori di crescita quali EGF, PDGF, TNF α (Smith RM et al, 1998).

Altri studi hanno dimostrato che anche il trasportatore del glucosio, GLUT4, localizza nelle caveolae e che la sua densità aumenta in seguito al trattamento con insulina. Come già menzionato, la Caveolina-1 potenzia il segnale di Ins-R mentre la distruzione delle caveolae tramite deplezione di colesterolo attenua questo segnale; infatti, adipociti di ratto trattati con β -metil-ciclodestrina mostrano una riduzione della sensibilità alla stimolazione con insulina, della capacità di catturare glucosio (Gustavsson J et al, 1999) e dell'attivazione di elementi responsivi a valle dell'insulina come IRS-1 e la proteina chinasi B (PKB)/Akt (Parpal S et al, 2001).

Sebbene topi Cav-1 $-/-$ non abbiano un fenotipo francamente diabetico, essi sono resistenti ad obesità indotta dalla dieta e sviluppano progressiva atrofia del tessuto adiposo. Metabolicamente questi topi sono caratterizzati da elevati livelli di acidi grassi liberi e di trigliceridi ma non mostrano alterazione dei livelli di insulina e di glucosio plasmatici. Tuttavia essi hanno una diminuzione del 90% dei livelli di Ins-R nel tessuto adiposo e, se sottoposti ad un dieta ricca di grassi per 9 mesi, sviluppano iperinsulinemia postprandiale. Inoltre la stimolazione con insulina di questi topi non causa attivazione dei bersagli a valle come PKB/Akt e GSK-3 β indicando che la Caveolina-1 è necessaria per l'azione dell'insulina negli adipociti (Cohen AW et al, 2003). Non è sorprendente che in pazienti affetti da severa resistenza all'insulina siano state trovate mutazioni puntiformi in residui aromatici del CBM di Ins-R. Tali mutazioni sembrano causare una distruzione della funzionalità di Ins-R in quanto danneggiano la sua autofosforilazione e di conseguenza ne aumentano la degradazione (Cohen AW et al,

2004).

2.5.2 Infiammazioni

La soppressione della risposta infiammatoria esercitata da Caveolina-1 deriva dalla sua capacità di interagire direttamente e di inibire l'attività di eNOS. In assenza di Caveolina-1 eNOS non risponde ai segnali regolatori negativi e la sua attività rimane elevata con conseguente aumento costitutivo dei livelli di NO. Rispetto al wild-type i topi Cav-1 $-/-$ mostrano una attenuata risposta infiammatoria polmonare (minor numero di neutrofili, ridotta permeabilità vascolare e formazione di edema) in seguito a stimolazione con lipopolisaccaride. Tale effetto sembra essere dovuto all'aumento della concentrazione plasmatica di NO in seguito alla stimolazione di eNOS; questo a sua volta determina soppressione dell'attività di NF- κ B con conseguente riduzione trascrizionale di proteine proinfiammatorie come la ossido di azoto sintetasi inducibile (iNOS) ed la molecola di adesione intracellulare-1 (ICAM-1) (Garrean S et al, 2006).

Recenti studi inoltre indicano che le proprietà immunomodulatorie di Caveolina-1 derivano dalla sua capacità di regolazione delle citochine sia tramite interazione diretta che tramite associazione con i loro recettori. Numerosi recettori citochinici infatti sono stati localizzati nelle caveolae quali quello per IL-2, IL-6, IFN- α , IFN- γ e TNF- α . Inoltre il ruolo protettivo esercitato da Caveolina-1 nelle infiammazioni sembra derivare dalla sua capacità di sopprimere la produzione di citochine proinfiammatorie (TNF- α ed IL-6) e di aumentare quella di citochine antinfiammatori (IL-10) (Wang XM et al, 2006).

2.5.3 Tumori

2.5.3.1 Regolatore negativo o promotore della crescita?

La elevata espressione di Caveolina-1 in cellule altamente differenziate, quiescenti o senescenti suggerisce un suo possibile ruolo come regolatore negativo della proliferazione cellulare. In supporto a questa ipotesi Galbiati F et al (2001b) hanno mostrato che i livelli di espressione di Caveolina-1 sono regolati negativamente da fattori di crescita e che la overespressione di Caveolina-1 ricombinante può inibire la proliferazione cellulare in seguito all'arresto del ciclo cellulare in G_0/G_1 tramite attivazione della via di segnale p53/p21^{CIP1}. Tale studio è supportato dalla precedente osservazione che Caveolina-1 funziona normalmente come repressore trascrizionale della Ciclina D1, importante componente del complesso Ciclina/Cdk che fosforila Rb, ed in questo modo controlla l'entrata cellulare in fase S (Hulit J et al, 2000).

Fibroblasti embrionali di topo Cav-1 $-/-$ sono caratterizzati da un aumento della proliferazione cellulare con bassa frazione di cellule in fase G_0/G_1 ed alta frazione in fase S (Razani B et al, 2001). Essi inoltre mostrano una alterata espressione di diverse proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare; in particolare è stata osservata iperattivazione costitutiva di ERK-1/2, diminuzione di espressione dell'inibitore $p21^{CIP1}$ ed overespressione di Ciclina D1 e PCNA consistenti con il loro fenotipo iperproliferativo (Williams TM et al, 2004).

Caveolina-1 sembra funzionare come inibitore endogeno del segnale proliferativo indotto dalla cascata $p42/44$ MAP chinasi in quanto è stata dimostrata una interessante relazione reciproca tra Caveolina-1 e l'attivazione di ERK- 1/2. Infatti in cellule NIH-373, fibroblasti murini immortalizzati, la down-regolazione di Caveolina-1 tramite oligonucleotidi antisenso è sufficiente per indurre un fenotipo trasformato e causare attivazione della cascata $p42/44$ MAP chinasi; viceversa, la iperattivazione costitutiva di tale *pathway* causa riduzione dell'espressione di Caveolina-1 (Williams TM and Lisanti MP, 2005).

Diversi studi genetici supportano un ruolo come soppressore tumorale per Caveolina-1. Il gene umano CAV-1 infatti è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7 (7q31.1) in una regione genica, il locus D7S522, che contiene il sito fragile FRA7G; tale regione è frequentemente associata a perdita di eterozigotà (LOH) in diversi tumori umani incluso il carcinoma mammario, dell'ovario, del colon, della prostata e del rene (Cohen AW et al, 2004). Tali osservazioni hanno fatto supporre la presenza di un gene oncosoppressore all'interno o in prossimità in tale locus; tuttavia nessun gene vi è stato mappato direttamente e i geni più vicini a tale regione codificano per Caveolina-1 e Caveolina-2.

Inoltre è stato riportato che il promotore di CAV-1 è ipermetilato in diverse linee cellulari tumorali quali quelle derivanti da carcinoma mammario (Engelman JA et al, 1999) e prostatico (Cui J et al, 2001), suggerendo che il silenziamento trascrizionale di Caveolina-1 potrebbe rappresentare una fase cruciale della cancerogenesi.

L'analisi di sequenza del gene CAV-1 in una coorte di pazienti con tumori primari della mammella, ha rilevato la presenza di una mutazione sporadica (P132L) nel 16% dei casi esaminati. Tale mutazione causa la ritenzione di Caveolina-1 nell'apparato di Golgi; essa inoltre agisce in maniera dominante negativa in quanto la sua co-espressione con la forma non mutata causa errata localizzazione e ritenzione intracellulare anche della forma *wild-type* di Caveolina-1 (Hayashi K et al, 2001). Han SE et al (2004) hanno individuato la presenza di mutazioni in CAV-1 anche in linee cellulari derivanti da carcinoma orale squamoso.

Dato l'elevato tasso proliferativo delle varie linee cellulari derivanti da topi Cav-1 $-/-$ è sorprendente l'osservazione che questi animali non mostrano una

aumentata incidenza di tumori. Tuttavia è stato dimostrato che topi mancanti di Caveolina-1 sottoposti all'azione di cancerogeni quali 7,12-dimetilbenzoantracene (DMBA) mostrano una aumentata incidenza di tumori della pelle. Analogamente a quanto rilevato *in vitro*, l'iperplasia dell'epidermide in queste cellule esposte all'azione di cancerogeni è risultata caratterizzata da iperattivazione della cascata p42/44 MAP chinasi ed aumentata espressione di Ciclina D1. Apparentemente quindi la perdita di Caveolina-1 da sola non è sufficiente ad indurre trasformazione cellulare e tumorigenesi *in vivo* ma la sua assenza sembra potenziare tale processo se associata all'azione di un cancerogeno (Capozza F et al, 2003). In maniera analoga Williams TM et al (2004) hanno dimostrato un significativo potenziamento della trasformazione indotta da oncogeni quali H-Ras^{G12V} o v-Src in assenza di Caveolina-1.

In contrasto, diversi studi indicano per Caveolina-1 una attività di promotore della crescita. In particolare diversi studi indicano una associazione tra l'espressione di Caveolina-1 e un effetto antiapoptotico in condizioni di privazione di siero, di ormoni o in risposta all'overespressione di *c-myc*; tali studi sono supportati dall'osservazione che in linee cellulari di carcinoma della prostata la riduzione di espressione di Caveolina-1 tramite oligonucleotici antisense ristabilisce la sensibilità all'induzione di apoptosi (William TM et al, 2005). Inoltre, in cellule di mieloma la inibizione della fosforilazione di Caveolina-1 o la distruzione delle caveolae tramite agenti in grado di sequestrare il colesterolo è in grado di bloccare il segnale indotto da IL-6 e da IGF-1 tramite inibizione della via di segnale della PI3-chinasi (Podar K et al, 2003). Tali risultati sono in accordo con quanto dimostrato da Li L et al (2003) nel carcinoma della prostata umano in cui Caveolina-1 sostiene la proliferazione cellulare tramite attivazione di Akt.

Il tessuto prostatico normale non esprime Caveolina-1 mentre essa risulta espressa in seguito allo sviluppo di carcinoma sia nel topo che nell'uomo, dove la espressione di Caveolina-1 correla positivamente con i parametri clinici di Gleason, l'estensione extra-prostatica ed il coinvolgimento linfonodale suggerendo un suo utilizzo come marcatore prognostico in questo tumore (Sato T et al, 2003); Li L et al (2001) inoltre hanno riportato un aumento di espressione dopo terapia androgeno ablativa. Recentemente il ruolo di Caveolina-1 nello sviluppo e nella progressione del carcinoma della prostata è stato investigato tramite incrocio di topi Cav-1 ^{-/-} con topi transgenici caratterizzati da sviluppo spontaneo di adenocarcinoma della prostata (TRAMP); i risultati di tale studio hanno dimostrato che la perdita di Caveolina-1 causa una significativa riduzione della massa tumorale e della comparsa di metastasi linfonodali (Williams TM et al, 2005).

La espressione di Caveolina-1 inoltre sembra essere associata all'acquisizione del fenotipo MDR (*multidrug resistance*) caratterizzato da resistenza a diversi

farmaci strutturalmente e funzionalmente distinti. La espressione di Caveolina-1 ed il numero di caveolae morfologicamente identificabili sembra aumentare in linee cellulari umane MDR derivanti da diversi tumori primari, quali mammario, del colon, dell'ovario e del polmone. Nel fenotipo MDR, l'aumento di espressione di Caveolina-1 sembrerebbe accelerare l'efflusso di farmaci facilitandone il trasporto dal compartimento intracellulare alle pompe di efflusso presenti nella membrana plasmatica utilizzando il sistema di trasporto intracellulare del colesterolo (Cohen AW et al, 2004).

Un altro potenziale contributo di Caveolina-1 alla crescita e alla biologia del tumore deriva dal suo ruolo nel processo di angiogenesi. La formazione di nuovi vasi indotta da VEGF (fattore di crescita endoteliale vascolare), infatti, richiede NO prodotto dall'enzima eNOS la cui attività è controllata da Caveolina-1. Il trattamento di cellule endoteliali in cultura con agenti in grado di distruggere le caveolae (filippina) causa riduzione della formazione di strutture simili a capillari mentre la somministrazione di VEGF causa riduzione di espressione di Caveolina-1. Topi Cav-1 -/- mostrano aumentata proliferazione delle cellule endoteliali ed aumento della permeabilità vascolare; la riduzione di Caveolina-1 tramite oligonucleotidi antisenso inoltre previene la maturazione dei nuovi vasi *in vivo* mentre un suo aumento di espressione o del suo CSD sembra promuovere la formazione di capillari endoteliali *in vitro* (Liu J et al, 2002).

Il contributo di Caveolina-1 alla cancerogenesi è stato ampiamente investigato anche in studi clinicamente orientati. Tuttavia l'espressione di Caveolina-1 è risultata controversa e dipendente dal tipo tumorale. La maggior parte dei risultati ottenuti da studi *ex vivo* sono in accordo con quelli *in vivo* e suggeriscono che in alcuni tumori Caveolina-1 possa agire come soppressore della crescita tumorale mentre in altri come promotore. Per esempio una diminuzione di espressione di Caveolina-1 è tipica di carcinomi mammari (Hayashi K et al, 2001), polmonari (Kato T et al, 2004) ed ovarici (Wiechen K et al, 2001a) come anche di sarcomi mesenchimali (Wiechen K et al, 2001b). D'altro canto, Caveolina-1 è molto espressa in tumori della vescica (Rajjayabum PH et al, 2001), del colon (Fine SW et al, 2001), squamosi dell'esofago (Kato K et al, 2002), papillari tiroidei (Ito Y et al, 2002), del pancreas (Suzuoki M et al, 2002) e carcinomi della prostata (Yang G et al, 1999).

2.5.3.2 Metastasi

Diversi studi suggeriscono un coinvolgimento di Caveolina-1 nella insorgenza di metastasi. Yang G et al (1998) hanno rilevato elevati livelli di Caveolina-1 in tumori metastatici mammari e prostatici sia murini che umani. In particolare nel carcinoma della prostata umano essa è risultata aumentata nelle linee cellulari derivate da metastasi rispetto a quelle derivate dai tumori primitivi e sembra

promuovere l'attività metastatica probabilmente tramite stimolazione autocrina/paracrina; la riduzione di espressione di Caveolina-1 tramite oligonucleotidi antisenso ne riduce il fenotipo metastatico. Un aumento di espressione di Caveolina-1 dopo terapia androgeno ablativa inoltre è stato rilevato anche nei tumori della prostata metastatici oltre che in quelli primari (Tahir SA et al, 2001). Un aumento di espressione di Caveolina-1 è risultato correlato con l'insorgenza di metastasi anche nel carcinoma esofageo squamoso, nel carcinoma renale e nell'adenocarcinoma polmonare; tali risultati sono particolarmente interessanti per quei tumori in cui Caveolina-1 è sottoregolata nel tumore primitivo e suggeriscono che un suo aumento di espressione possa rappresentare una acquisizione che contribuisce al fenotipo metastatico (Williams TM and Lisanti MP, 2005). Tale concetto di comportamento bi-fasico di Caveolina-1 è stato dimostrato in cellule di carcinoma del colon dopo selezione di varianti metastatiche (Bender FC et al, 2000).

Sebbene alcuni studi abbiano rilevato aumento di espressione di Caveolina nei carcinomi mammari metastatici altri studi supportano un suo effetto inibitorio nell'insorgenza di metastasi. Sloan EK et al (2004) hanno usato un modello ortotopico di metastasi spontanee del carcinoma mammario per indagare il coinvolgimento di Caveolina-1 nella crescita e nella capacità metastatica di questo tumore; tale modello comprende linee cellulari derivanti da un carcinoma mammario spontaneo di topo Balb/c/C3H che mostrano un differente e specifico profilo di metastasi spontanee dopo iniezione nel tessuto mammario. I risultati di tali studi hanno dimostrato che le linee cellulari altamente metastatiche 4T1.2 e 4T1.13 esprimono bassi livelli di Caveolina-1 mentre essa è risultata espressa ad alti livelli nella linea cellulare con bassa capacità metastatica 66c14 ed in quella non metastatica 67NR. Inoltre una moderata espressione esogena di Caveolina-1 nella linea cellulare 4T1.2 è sufficiente a sopprimere la crescita del tumore primario dopo inoculo delle cellule nella ghiandola mammaria mentre una espressione a più alti livelli è in grado di inibire anche la comparsa di metastasi a distanza.

Il duplice e contrastante ruolo di Caveolina-1 nella progressione tumorale può essere parzialmente spiegato dalla presenza di diversi domini peptidici con funzioni opposte e dalla esistenza di almeno tre distinti meccanismi (fosforilazione tirosinica, fosforilazione serinica, mutazione puntiforme dominante negativa) che inattivano la funzione di soppressore tumorale di Caveolina-1. Secondo tale ipotesi questi meccanismi sarebbero in grado di contrastare la funzione di inibizione della crescita del CSD e spiegherebbero perché Caveolina-1 possa agire sia da regolatore negativo sia da promotore della proliferazione, a seconda del tipo e/o dello stadio tumorale.

Fosforilazione tirosinica.

La fosforilazione in posizione tirosina 14 all'estremità NH₂-terminale fa acquisire a Caveolina-1 una funzione simile ad un recettore per i fattori di crescita che recluta proteine contenenti domini SH2 (come c-Src/Grb7) dalla membrana plasmatica.

Fosforilazione serinica.

In seguito a fosforilazione in posizione serina 80, prossimale al CSD, la Caveolina-1 viene convertita in una forma solubile che viene secreta dalla cellula; conseguentemente il CSD non può interagire e quindi inibire l'attività di molecole segnale citoplasmatiche. Inoltre la forma secreta di Caveolina-1 può acquisire proprietà di fattore di crescita con proprietà autocrine e paracrine e proteggere le cellule da stimoli apoptotici. Questo sembra essere il meccanismo tramite il quale Caveolina-1 acquisisce la funzione di promotore della crescita nel carcinoma della prostata.

Mutazione puntiforme dominante negativa.

La mutazione P132L trovata nel 16% dei carcinomi mammari causa una errata conformazione di Caveolina-1 ed aggregazione proteica; come conseguenza Caveolina-1 rimane nel complesso di Golgi ma non viene degradata. Cellule NIH-3T3 (P132L) mostrano un aumento della crescita in soft agar, della invasività e della chemiotassi (Williams TM and Lisanti MP, 2005).

2.5.4 Aterosclerosi

La proliferazione cellulare è coinvolta anche nella genesi di patologie proliferative vascolari come l'aterosclerosi. Infatti sebbene le fasi precoci dell'aterogenesi siano caratterizzate da una alterata funzionalità endoteliale e dal reclutamento di leucociti mononucleati nell'intima, la progressione dell'ateroma dipende dalla proliferazione di cellule muscolari lisce vascolari (VSMC), dalla loro migrazione dalla tonaca media alla intima e dalla loro produzione di macromolecole della matrice extracellulare. Thyberg J et al (2000) hanno descritto il ruolo fondamentale delle caveoline nella regolazione della crescita delle VSMC ed hanno dimostrato che topi mancanti di Caveolina-1 mostrano diverse disfunzioni a livello vascolare, con difetti soprattutto nella risposta contrattile.

Studi recenti hanno dimostrato che l'overespressione di Caveolina-1 nelle VSMC *in vitro* previene la proliferazione indotta da fattori di crescita; inoltre cellule VSMC proliferanti nell'ateroma umano mostrano ridotta espressione di Caveolina-1 suggerendo una correlazione inversa tra proliferazione ed espressione di Caveolina-1 (Batetta B et al, 2003). Comunque a seconda del

meccanismo patogenetico esaminato il ruolo di Caveolina-1 potrebbe essere sia “proaterogenico” che “antiaterogenico”.

Per esempio topi mancanti di Caveolina-1 mostrano un’ aumentata iperplasia neointimale (proliferazione delle cellule muscolari lisce) in seguito a danni vascolari che sembra essere dovuta all’iperattivazione della cascata delle p42/44 MAK chinasi e all’aumento di espressione della Ciclina D1 (Hassan GS et al, 2004).

Topi Cav-1 $-/-$ sono stati incrociati con topi mancanti geneticamente di Apolipoproteina E suscettibili all’aterosclerosi, per generare topi *ApoE/Cav-1 double-knockout*. Mentre i topi Cav-1 $-/-$ mostrano livelli di colesterolo plasmatico normali ed aumento di trigliceridi, la perdita di Caveolina-1 in topi ApoE $-/-$ causa un significativo aumento anche di colesterolo, consistente con un profilo lipoproteico che dovrebbe predisporre allo sviluppo di lesioni aterosclerotiche. Malgrado tale profilo lipoproteico “pro-aterogenico”, la perdita di Caveolina-1 riduce del 70% la formazione di ateromi nell’aorta; tale effetto protettivo è stato attribuito alla concomitante riduzione di molecole “pro-aterogeniche” delle cellule endoteliali come il recettore CD36 e le molecole di adesione VCAM-1. Tali alterazioni sembrano infatti influenzare il reclutamento e la migrazione dei monociti/macrofagi nelle aree di lesione endoteliale e diminuire la cattura e la deposizione di specifiche lipoproteine (Frank PG et al, 2004).

2.5.5 Sindrome di Alzheimer

La caratteristica principale che differenzia il cervello di soggetti con sindrome di Alzheimer da quello di soggetti normali è la comparsa di placche senili, composte principalmente da β -amiloide ($A\beta$), un peptide composto da 38-42 aminoacidi derivante dal processamento proteolitico della proteina precursore dell’amiloide (APP) ad opera della β - e della γ -secretasi. La α -secretasi invece previene la produzione delle placche senili in quanto taglia la APP all’interno della sequenza della $A\beta$ portando alla produzione di un prodotto solubile che viene secreto dalle cellule (Campbell L et al, 2001). Il processo proteolitico che porta alla formazione di $A\beta$ sembra essere regolato dalla disponibilità di colesterolo; studi epidemiologici infatti hanno mostrato che l’uso di agenti in grado di ridurre la sintesi del colesterolo, come Probucoil o statine, riduce il rischio di insorgenza di sindrome di Alzheimer, la produzione di $A\beta$ ed il deterioramento cognitivo. Inoltre la generazione del peptide amiloidogenico $A\beta$ è risultata associata a regioni di membrana ad alto contenuto di colesterolo, quali caveolae; al contrario la produzione del peptide non amiloidogenico ad opera delle α -secretasi sembra avvenire in zone della membrana a bassa concentrazione di colesterolo ed alta fluidità. Tali studi insieme all’osservazione

che APP co-localizza con Caveolina-1 nelle caveolae e che i livelli sia di proteina che di mRNA di Caveolina-1 sono aumentati in soggetti con sindrome di Alzheimer supportano l'idea che Caveolina-1 abbia un ruolo nella proteolisi di APP *in vivo* (Gaudreault SB et al, 2004). In particolare studi più recenti suggeriscono l'aumento di Caveolina-1 nei neuroni è responsabile della insorgenza della sindrome di Alzheimer sporadica sia in quanto blocca il processamento della APP ad opera della α -secretasi sia in quanto è in grado di aumentare quello ad opera della β -secretasi (Kang M et al, 2006).

PARTE SPERIMENTALE

3. MATERIALI

- Materiali in plastica monouso: GREINER, CORNING, FALCON.
- Reagenti per uso analitico: MERCK, CARLO ERBA, SIGMA, FLUKA.
- ³H-timidina, acido [¹⁴C]oleico, liquido di scintillazione Econofluor: NENTM LIFE SCIENCE PRODUCTS.
- Lastre in silice per TLC: MACHEREY-NAGEL.
- Mezzi di coltura (RPMI 1640, D-MEM, HAM-F12), L-glutamina, antibiotici (streptomicina, penicillina), tripsina-EDTA, trypan blue: SIGMA-ALDRICH.
- Siero fetale bovino (FBS): GIBCO-INVITROGEN.
- N-(4-idrossifenil)retinamide (Fenretinide), 5-aza-2'deoxyctidine, N-(2,6-dioxo-3-piperidyl)phthalimide (Thalidomide): SIGMA-ALDRICH.
- Mycoplasma plusTM PCR primer set: STRATAGENE.
- Leupeptina, aprotinina, AEBSF (4-[2-aminoetil]benzene sulfonil fluoruro idrocloruro), ponceau-S, tween 20, albumina di siero bovino (BSA), mix acrilamide/bisacrilamide, marcatore di peso molecolare non colorato Dalton Mark VII-L, temed (N,N,N',N'-tetrametil etilen diammina), ammonio persolfato, RNA sample loading buffer, olio minerale, GenEluteTM mammalian genomic DNA miniprep Kit, GenEluteTM PCR clean-up, Agaroso: SIGMA-ALDRICH.
- Bromuro di etidio: CLONTECH LABORATORIES INC.
- Marcatore di peso molecolare colorato: CELL SIGNALING TECHNOLOGY.
- BCA protein Assay Kit, RestoreTM western blot stripping buffer: PIERCE.
- Anticorpi primari: PARP, Caspasi 3, Ciclina D1, CDK4, p21 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY), Caveolina-1 (TRANSDUCTION LABORATORIES), β actina (SIGMA).
- Anticorpi secondari, Kit ECL, lastre autoradiografiche Hyperfilm: AMERSHAM BIOSCIENCES.
- Membrana PVDF (polivinilidene difluoruro): MILLIPORE.
- SV total RNA isolation system, Taq DNA polimerasi, dNTPs, MgCl₂, 100bp DNA ladder, enzimi di restrizione, trascrittasi inversa M-MLV, oligo (dT)15 primers, recombinant RNasin[®] ribonuclease inhibitor: PROMEGA.
- Primers: INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES.
- Pellicole fotografiche T55, T57: POLAROID KODAK.

4. METODI

4.1 Colture cellulari

Le linee cellulari sono state mantenute in crescita nei seguenti terreni:

- RPMI 1640: linee cellulari di glioblastoma umano (CRS-A2, A-172), di carcinoma del pancreas umano (T3M4, PaCa44, MiaPaca2) e di carcinoma mammario umano (MCF-7)
- D-MEM: linee cellulari di osteosarcoma umano (MG-63, HOS)
- H/H (50% HAM-F12; 50% D-MEM): linee cellulari di carcinoma mammario umano (MAST, SKBR-3, BRC-230)

contenenti 10% di Siero Fetale Bovino (FBS) scomplementato al calore, 2 mM L-Glutamina, 50 µg/ml Streptomicina e 50 UI/ml Penicillina.

Per il distacco delle cellule è stata utilizzata una miscela di Tripsina 0.05% ed EDTA 0.02% in tampone fosfato salino PBS (NaCl 0.14M, NaH₂PO₄ 5 mM pH 7.2).

Le cellule sono state mantenute a 37°C in un incubatore Heraeus con atmosfera al 95% di aria e 5% di CO₂.

Per la determinazione dell'assenza di micoplasma è stato utilizzato il Kit Mycoplasma PlusTM PCR Primer Set.

4.1.1 Trattamenti farmacologici

- La N-(4-idrossifenil)retinamide (4-HPR o Fenretinide) è stata sciolta in etanolo assoluto alla concentrazione di 10 mg/ml e conservata a -20°C al riparo dalla luce.
- La N-(2,6-dioxo-3-piperidyl)phthalimide (Talidomide) è stata risospesa in DMSO ad una concentrazione di 20 mg/ml e conservata a -20°C.
- Il 5-aza-2'deoxyctidine (DAC) è stato sciolto in DMSO ad una concentrazione di 10 mM e conservato a -80°C.

Per i trattamenti farmacologici (singoli, in associazione o in sequenza), le soluzioni così preparate sono state diluite nell'opportuno mezzo di coltura alla concentrazione desiderata

L'inibizione della crescita è stata valutata tramite conte cellulari con il saggio ad esclusione vitale con il trypan blue 0.1%. L'attività antiproliferativa è stata espressa come % di sopravvivenza delle cellule trattate rispetto al controllo.

4.1.2 Incorporazione di ³H-Timidina nel DNA

Durante le ultime 3 ore di ciascun tempo studiato, le cellule sono state incubate con 2.5 µCi/ml di ³H-Timidina.

Al termine del tempo di trattamento il terreno di cultura è stato rimosso e le cellule lavate 2 volte con PBS freddo. Per eliminare l'eccesso di ³H-Timidina non incorporata nel DNA le cellule sono state trattate con una soluzione 5% TCA (acido tricloro acetico) fredda.

La radioattività incorporata nel DNA è stata determinata dopo lisi cellulare con NaOH 1N e incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente.

4.2 Analisi dei lipidi

4.2.1 Esterificazione del colesterolo

Durante le ultime 4 ore di ciascun tempo studiato, le cellule sono state incubate in un mezzo contenente ¹⁴C-Oleato 2 µCi/ml legato ad albumina di siero bovino (BSA) priva di acidi grassi essenziali. Tale complesso ¹⁴C-Oleato-BSA, è stato preparato aggiungendo 1.4 mg di KOH ad 1 ml di una soluzione 100 µCi/ml di ¹⁴C-Oleato in etanolo e, dopo evaporazione dell'etanolo, sciogliendo il ¹⁴C-Oleato essiccato in 1,5 ml di PBS contenente 2,8 mg/ml BSA.

Al termine dell'incubazione il terreno di cultura è stato rimosso e le cellule portate in sospensione in PBS tramite utilizzo di scraper; la sospensione cellulare ottenuta è stata centrifugata a 1200 rpm per 10 minuti a +4°C ed il pellet lavato 2 volte con PBS 1x freddo.

La estrazione dei lipidi è stata effettuata tramite risospensione del pellet cellulare in acetone freddo seguita da incubazione per 30 minuti a -20°C e centrifugazione a 2500 rpm per 10 minuti a +4°C.

Dopo evaporazione dell'acetone, i lipidi sono stati disciolti in 200 µl di una soluzione 1 mg/ml colesterolo oleato in cloroformio, stratificati in una lastra in gel di silice e separati tramite cromatografia su strato sottile (TLC). Per l'eluizione è stata utilizzata una miscela costituita da n-Eptano/Etere isopropilico/Acido formico (rapporto 30:20:1).

Le frazioni corrispondenti agli esteri del colesterolo sono state ritagliate dalla lastra e, dopo aggiunta di 10 ml di liquido di scintillazione, ne è stata valutata l'incorporazione di [¹⁴C]oleato .

Il pellet (precedentemente privato dei lipidi) è stato risospeso in 500 µl di NaOH ed utilizzato per la quantificazione delle proteine tramite metodo di Lowry. Dopo aggiunta di 2.5 ml di reagente di Lowry [4% Na₂CO₃, 0.04% NaK, 0.02%CuSO₄(H₂O)₅] e di 0.5 ml di reagente di Folin (50% Folin-Ciocalteu's

phenol), la concentrazione proteica è stata determinata tramite lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 750 nm. Come curva di calibrazione sono state utilizzate concentrazioni *standard* di BSA (albumina di siero bovino).

4.3 Analisi delle proteine

4.3.1 Estrazione delle proteine cellulari

Ciascun pellet cellulare è stato risospeso in un tampone di lisi (Nonidet P40 1%, NaF 10mM, Na₃VO₄ 1mM, Na₄P₂O₇·10H₂O 1mM, leupeptina 10µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, AEBSF 1 mM, NaCl 0.14 M, NaH₂PO₄ 5 mM) in rapporto di 20 µl per 10⁶ cellule.

Dopo 1 ora di incubazione a +4°C, il lisato cellulare ottenuto è stato centrifugato a 14000 rpm per 30 minuti a +4°C.

La concentrazione proteica è stata valutata tramite saggio BCA (acido bicinconinico) utilizzando concentrazioni *standard* di BSA come curva di calibrazione.

L'assorbanza è stata valutata alla lunghezza d'onda di 562 nm, dopo incubazione a 37°C per 30 minuti.

Ciascun lisato cellulare è stato poi diluito al 50% in un tampone di caricamento costituito da 0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 30% Glicerolo, 10% 2-mercaptoetanol, 0.01% Blu di bromofenolo. Le proteine sono state denaturate per 5 minuti a 100°C e conservate a -20°C.

4.3.2 Western Blotting

Le proteine (50 µg) sono state separate mediante elettroforesi su gel di poliaccrilamide-SDS costituito da:

Stacking gel: 5% mix acrilamide:bisacrilamide (29:1), 0.31 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% ammonio persolfato, 0.01% temed;

Resolving gel: 9%-12% mix acrilamide:bisacrilamide (29:1), 4.68 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% ammonio persolfato, 0.01% temed.

Prima del caricamento i campioni sono stati denaturati per 5 minuti a 100°C.

L'elettroforesi, in tampone di corsa costituito da 5 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM Glicina e 0.02 % SDS, è stata condotta a 180V per circa 3 ore.

Al termine della migrazione, le proteine sono state trasferite tramite Blotting semi-dry su una membrana PVDF precedentemente attivata in metanolo.

Come tamponi per il blotting sono state utilizzate una soluzione Anodica (Tris 25 mM, metanolo 10%, pH 10.4) ed una Catodica (Tris 25 mM, glicina 40 mM, metanolo 10%, pH 9.4).

Il trasferimento è stato fatto avvenire al voltaggio costante di 30 V (170 mA) per circa 2 ore a temperatura ambiente.

4.3.3 Analisi immunoenzimatica

Le membrane ottenute da Western blotting sono state trattate con colorante Ponceau (Ponceau-S 0.2%, acido acetico 3%, acido sulfosalicilico 3%) per 10 minuti a temperatura ambiente per visualizzarne le proteine totali.

Dopo decolorazione in soluzione PBS-T 0.1 (NaCl 0.14 M, NaH₂PO₄ 5 mM pH 7.2, Tween20 0,1%) le singole membrane sono state incubate in una soluzione di saturazione (latte magro in polvere 8% in PBS-T 0.1) per 45 minuti a temperatura ambiente.

Dopo 2 lavaggi in PBS-T 0.1 ciascuna membrana è stata incubata per tutta la notte a 4°C con l'appropriato anticorpo primario diluito in una soluzione 5% BSA in PBS-T 0.1. Il giorno successivo l'incubazione è proseguita a temperatura ambiente per 30 minuti e successivamente le membrane sono state lavate con una soluzione contenente PBS-T 0.5 (NaCl 0.14 M, NaH₂PO₄ 5 mM pH 7.2, Tween20 0,5%).

Le membrane sono state quindi incubate per 1 ora con l'opportuno anticorpo secondario (coniugato con perossidasi di rafano) e lavate con soluzione PBS-T 0.5.

La reazione di chemiluminescenza è avvenuta in seguito ad incubazione delle membrane per 2 minuti in una soluzione costituita da una miscela 1:1 dei due reagenti forniti kit ECL e contenente il luminolo, substrato per la perossidasi di rafano.

Ciascuna membrana è stata posta a contatto con la lasta autoradiografica in un porta-lastra dotato di schermo intensificatore per tempi compresi tra 5 secondi ed 1 minuto.

L'intensità delle bande ottenute è stata valutata tramite lettura al densitometro (Beckman DU-164); per la normalizzazione è stata valutata l'espressione della β -Actina.

4.4 Analisi dell'mRNA

4.4.1 Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto, tramite *SV total RNA Isolation system*, da pellets di $1-2 \times 10^6$ cellule ottenuti dopo centrifugazione a 1000 rpm e 2 lavaggi in PBS sterile.

Ciascun pellet cellulare è stato risospeso in 175 μ l di soluzione di lisi SV RNA

fredda e 350 µl di soluzione di diluizione SV RNA e incubato per 3 minuti a 70°C. Al sovrantante ottenuto dopo centrifugazione a 14.000 rpm per 10 minuti sono stati aggiunti 200 µl di Etanolo 95° ed è stato caricato su una colonnina di silice. La colonnina è stata quindi centrifugata a 14.000 rpm per 1 minuto e successivamente sono stati aggiunti 50 µl di miscela DNAsica (costituita da 40 µl di *Yellow core buffer*, 5 µl di MnCl₂ 0.09 M e 5 µl di DNAsi I). Dopo incubazione temperatura ambiente per 15 minuti la digestione è stata bloccata tramite aggiunta di 200 µl di soluzione *Stop SV DNAsi* e centrifugazione a 14.000 rpm per 1 minuto.

Dopo 2 lavaggi della colonnina con *SV RNA wash solution*, l'eluizione dell'RNA è stata ottenuta tramite aggiunta di 100 µl di H₂O sterile *RNAsi Free* e centrifugazione a 14.000 rpm per 1 minuto. L'RNA così purificato è stato conservato a -70°C.

4.4.2 Analisi qualitativa e quantitativa dell'RNA

La concentrazione dell'RNA è stata valutata alla lunghezza d'onda di 260 nm e la purezza dei campioni determinata tramite valutazione del rapporto dell'assorbanza a 260 nm e 280 nm (compreso tra 1.7 e 2.1).

L'integrità dei campioni estratti è stata determinata tramite elettroforesi su gel d'agaroso dopo aver miscelato 1 µg di ciascun campione con due volumi di *RNA sample loading buffer* e aver incubato a 65°C per 10 minuti.

L'elettroforesi è stata effettuata su un gel all'1% di agaroso in MOPS (0.02M MOPS o acido 3-morfolinpropansolfonico, 8 mM NaC₂H₃O₂, 1 mM EDTA pH 8.0) contenente 1.5% di formaldeide e 0.25 µg/ml di etidio bromuro. La corsa elettroforetica è stata effettuata a 50 V per circa 3 ore in tampone MOPS contenente 0.25 µg/ml etidio bromuro e i campioni sono stati visualizzati tramite luce ultravioletta..

4.4.3 RT-PCR (*reverse transcriptase-polimerase chain reaction*)

Per la retrotrascrizione a cDNA, uguali quantità (2 µg) di RNA totale di ciascun campione sono state dapprima incubate per 5 minuti a 70°C in una soluzione 50 µg/ml Oligo(dT)₁₅, poi addizionate con:

- 5 µl tampone di reazione 5x specifico per la trascrittasi inversa
- 1 µl miscela dNTPs 10 mM
- 1 µl inibitore RNasi 40 U/µl
- 1 µl trascrittasi inversa M-MLV 200 U/µl
- H₂O fino ad un volume finale di 25 µl

e incubati a 42°C per 1 ora poi a 95°C per 5 minuti in termociclatore Mini

Cycler™ (GENENCO). La reazione è stata bloccata a +4°C e i campioni conservati a -20°C.

Per l'amplificazione di specifiche sequenze tramite PCR, a ciascun cDNA (2 µl) sono stati aggiunti:

- 5 µl tampone di reazione 10x specifico per la Taq-polimerasi
- 5 µl miscela dNTPs 2 mM
- 3 µl MgCl₂ 25 mM
- 1 µl di ciascuna coppia di *primers* 50 pmol/µl
- 0.5 µl di Taq-polimerasi 5U/µl
- H₂O fino ad un volume finale di 50 µl

ed è stato sottoposto ad amplificazione utilizzando i *primers* e le condizioni riportate nelle tabella seguente:

Gene (lunghezza amplificato)	Primers	Condizioni
MDR1 (167 pb)	5'CCCATCATTGCAATAGCAGG3' 5'GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA3'	94°C per 30'' 55°C per 60'' 72°C per 60'' } per 30 cicli
ACAT-1 (466 pb)	5'AGCAGAGGCAGAGGAATTGA3' 5'GCACACCTGGCAAGATGGAG3'	95°C per 30'' 58°C per 50'' 72°C per 60'' } per 40 cicli
CAV-1 (360 pb)	5'GAGCGAGAAGCAAGTGTACGA3' 5'ACAGACGGTGTGGACGTAGAT3'	94°C per 30'' 55°C per 45'' 72°C per 120'' } per 30 cicli
β-Actina (275 pb)	5'CTACAATGAGCTGCGTGTGGC3' 5'CAGGTCCGACGCAGGATGGC3'	94°C per 30'' 58°C per 30'' 72°C per 60'' } per 25 cicli
ABCA-1 (286 pb)	5'TCCTCTCCCAGAGCAAAAAGC3' 5'CTCCACAACACTTCACATGGT3'	95°C per 30'' 58°C per 60'' 72°C per 30'' } per 30 cicli

Dopo 7 minuti a 72°C la reazione è stata bloccata a +4 °C.

I prodotti di PCR sono quindi stati separati tramite elettroforesi su gel di

agarosio 0.8% in un tampone TAE (0.04 M Tris, 5 mM Sodio acetato, 1 mM EDTA, pH 7.8) contenente bromuro di etidio 0.25 µg/ml e visualizzati tramite luce ultravioletta.

Come marcatore di peso molecolare è stato utilizzato il 100bp DNA Ladder. La espressione della β-Actina è stata utilizzata come confronto per la normalizzazione della procedura di PCR.

4.5 Analisi del DNA

4.5.1 Estrazione del DNA genomico totale

Il DNA è stato estratto, tramite *GenElute™ Mammalian Genomic DNA kit*, da pellets di $1-2 \times 10^6$ cellule ottenuti dopo centrifugazione a 1000 rpm e 2 lavaggi in PBS sterile.

Ciascun pellet è stato addizionato con 200 µl di soluzione di risospensione e trattato con 20 µl di RNasi A (10 mg/ml) per 2 minuti a temperatura ambiente.

Successivamente a ciascun campione sono stati aggiunti 20 µl di proteinasi K (0.8 mg/ml) e 200 µl di soluzione di lisi. Dopo incubazione a 70 °C per 10 minuti sono stati quindi aggiunti 200 µl di etanolo assoluto ed il lisato cellulare ottenuto è stato trasferito su colonnina di silice precedentemente attivata con 500 µl di soluzione di preparazione della colonna.

Dopo centrifugazione a 8200 RPM per 1 minuto a temperatura ambiente, sono stati effettuati 2 lavaggi con 500 µl di soluzione di lavaggio.

Il rilascio del DNA dalla colonnina è stato ottenuto tramite aggiunta di 100 µl di soluzione di eluizione (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA pH 9), incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti e successiva centrifugazione per 1 minuto a 8200 RPM.

I campioni di DNA così ottenuti sono stati conservati a +4°C.

4.5.2 Analisi qualitativa e quantitativa del DNA

La concentrazione del DNA estratto è stata valutata tramite lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 260 nm.

La purezza dei campioni è stata determinata tramite valutazione del rapporto dell'assorbanza a 260 nm e 280 nm (compreso tra 1.8 e 2.0).

L'integrità del DNA è stata determinata tramite elettroforesi su gel d'agarosio 0.8% in TAE contenente 0.25 µg/ml di etidio bromuro e successiva visualizzazione tramite luce ultravioletta.

4.5.3 Valutazione dell'apoptosi

La induzione di apoptosi è stata valutata tramite l'*Apo-Aler*TM *LM-PCR Ladder-Assay Kit* che permette di identificare il caratteristico ladder apoptotico costituito da frammenti di 180-200 paia di basi o suoi multipli.

A questo scopo 500 ng di DNA genomico totale sono stati miscelati con 35 µl di miscela di legame, contenente adattatori nucleotidici defosforilati in grado di legarsi alle estremità 5'-fosforilate del DNA, e incubati a 55°C per 10 minuti.

Dopo un graduale raffreddamento fino a 10°C, a ciascun campione sono state aggiunte 200 U di DNA T4 ligasi ed è stata eseguita una incubazione a 16°C per tutta la notte.

La successiva amplificazione dei frammenti di DNA è stata ottenuta mediante PCR aggiungendo a 100 ng di DNA-adattatore i seguenti componenti:

- 10 µl tampone di reazione 10x specifico per la Taq-polimerasi
- 10 µl miscela dNTPs 2 mM
- 6 µl MgCl₂ 25 mM
- 1 µl di Taq-polimerasi 5U/µl
- H₂O fino ad un volume finale di 100 µl

ed utilizzando il seguente programma di amplificazione:

72°C per 8 minuti
94°C per 1 minuto } per 25 cicli
72°C per 3 minuti }
72°C per 15 minuti

La reazione è stata bloccata a +4°C ed i campioni analizzati tramite elettroforesi su gel di agaroso 1.2% in TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8.3) contenente etidio bromuro. Come controllo positivo è stato utilizzato DNA timico di vitello.

4.5.4 Analisi della metilazione

L'amplificazione di sequenze specifiche del promotore e del primo esone del gene CAV-1 tramite PCR è stata effettuata in maniera analoga a quanto descritto per la RT-PCR utilizzando i *primers* e le condizioni riportate nella tabella sottostante:

CAV-1 (lunghezza amplificato)	Primers	Condizioni
Promotore (681 pb)	5'TGTATTTTGCAAATATGGCATA3' 5'AGGCACTCCCCAAGGTTCTGGC3'	96°C per 30'' 66°C per 45'' 72°C per 90'' } per 35 cicli
Primo Esone (848 pb)	5'AGCGCGGGAGAAACGTTCTTAC3' 5'CCTGCCAGACGCCAAGATGCAG3'	96°C per 30'' 66°C per 45'' 72°C per 90'' } per 35 cicli

I prodotti di PCR ottenuti sono stati purificati tramite il *GenElute PCR Clean-up Kit*.

Dopo aggiunta di 5 volumi di soluzione di Legame, ciascun campione è stato trasferito su colonnina di silice e centrifugato a 13000 RPM per 1 minuto a temperatura ambiente; successivamente sono stati effettuati 2 lavaggi con 500 µl di soluzione di lavaggio.

Il rilascio degli amplificati di DNA dalla colonnina è stato ottenuto tramite aggiunta di 50 µl di soluzione di eluizione, incubazione a temperatura ambiente per 1 minuto e successiva centrifugazione per 1 minuto a 13000 RPM.

I prodotti di PCR così ottenuti sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione *Msp I* ed *Hpa II* in grado di riconoscere e tagliare il sito di restrizione -CCGG- con una differente sensibilità riguardo al suo stato di metilazione; in particolare *Msp I* taglia tale sito di restrizione in presenza di gruppi metilici mentre *Hpa II* non riconosce tale sito, se metilato.

La digestione di ciascun prodotto di PCR (1 µg) è stata ottenuta tramite incubazione a 37°C per tutta la notte in un tampone costituito da 3U di enzima, 3.3 mM Tris-acetato pH 7.9, 1 mM acetato di magnesio, 6.6 mM acetato di potassio, 0.01 mg/ml BSA. Dopo 10 minuti a 65°C, la reazione è stata bloccata in ghiaccio.

I prodotti della digestione sono stati separati tramite elettroforesi su gel di poli-acrilamide in condizioni non denaturanti [8% mix acrilamide:bisacrilamide (29:1), 0.1% ammonio persolfato, 0.001% Temed in TBE] per circa 2 ore a 195V (35mA).

La visualizzazione è stata ottenuta tramite luce ultravioletta dopo colorazione del gel per 1 ora in tampone TBE contenente etidio bromuro 0.5 µg/ml.

4.6 Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in duplicato e ripetuti almeno due volte. I risultati sono presentati come valore medio \pm E.S. (errore standard) delle determinazioni in duplicato.

L'effetto della somministrazione in associazione o in sequenza dei farmaci è stato valutato tramite determinazione del coefficiente di *Enhancement Ratio* (ER).

$$ER = \frac{SF(A+B)/SF(A)}{SF(B)} \times 100$$

SF: percentuale di sopravvivenza cellulare

ER < 0.8 effetto sinergico

ER > 1.2 effetto antagonistico

0.8 ≤ ER ≤ 1.2 effetto additivo

5. RISULTATI

OSTEOSARCOMA

Studi condotti precedentemente, nel laboratorio in cui ho poi svolto il mio periodo di dottorato, ci avevano permesso di identificare la proteina Caveolina-1 come bersaglio molecolare dell'azione di 4-HPR nell'osteosarcoma umano. Dato il ruolo che Caveolina-1 svolge nel mantenimento della omeostasi intracellulare del colesterolo, lo studio è proseguito, durante il mio periodo di dottorato, con la valutazione dell'effetto di 4-HPR sulla esterificazione di questo lipide. L'analisi, condotta tramite valutazione della incorporazione di ^{14}C -Oleato, mostra che 4-HPR 10 μM determina una riduzione della esterificazione del colesterolo già a partire dalle 6 ore di trattamento sia nella linea cellulare di osteosarcoma umano HOS (Figura 1A) che nella MG-63 (Figura 3A). In entrambe le linee cellulari l'inibizione della esterificazione osservata a brevi tempi di trattamento con il farmaco è presente fino ai tempi più lunghi saggiati (72 ore) (Figura 1B e Figura 3B). La valutazione della incorporazione di ^3H -Timidina nel DNA indica che la riduzione della crescita inizia successivamente alla inibizione della esterificazione: dopo 18 ore di trattamento in entrambe le linee cellulari (Figura 2A e Figura 4A). In parallelo alla esterificazione è stata valutata l'espressione di alcuni geni coinvolti nel mantenimento della omeostasi del colesterolo, quali MDR-1, che, assieme a Caveolina-1, è implicato nel trasporto intracellulare del colesterolo, ACAT-1, che ne catalizza la esterificazione ed il trasportatore di membrana ABCA-1. L'analisi, effettuata in RT-PCR, ha permesso di rilevare un aumento dell'espressione di ABCA-1 dopo 18 ore di trattamento con 4-HPR sia nella linea cellulare HOS (Figura 5A) che nella MG-63 (Figura 6A). La valutazione a tempi di trattamento compresi tra 24 e 72 ore evidenzia un calo di espressione dell'enzima ACAT-1 in parallelo alla riduzione di MDR-1 in entrambe le linee cellulari (Figura 5B e Figura 6B).

Allo scopo di comprendere se il silenziamento genico tramite metilazione fosse coinvolto nella riduzione di espressione di Caveolina-1 ad opera di 4-HPR si è indagata la presenza di gruppi metilici nel gene CAV-1. Regioni ricche di isole CpG del promotore e del primo esone sono state amplificate tramite PCR e successivamente digerite con gli enzimi di restrizione *HpaII* ed *MspI*, caratterizzati da una differente sensibilità allo stato di metilazione del loro sito di restrizione. Lo studio è stato condotto nelle linee cellulari HOS ed MG-63 dopo trattamento con 4-HPR 10 μM per 24, 48 e 72 ore. I prodotti della digestione enzimatica dei trattati sono risultati uguali a quelli generati dai controlli a tutti i tempi di trattamento e in entrambe le linee cellulari indicando assenza di metilazione nelle regioni analizzate. Nella Figura 7 è mostrato un profilo di

digestione.

In parallelo alla analisi della metilazione del gene di Caveolina-1 sono stati valutati i livelli di espressione del suo mRNA per comprendere se la down-regolazione osservata fosse dovuta ad un controllo a livello della trascrizione. Lo studio, effettuato a tempi di trattamento compresi tra 6 e 72 ore, rileva una uguale espressione dell'mRNA di Cavolina-1 nei trattati con 4-HPR 10 μ M rispetto ai controlli sia nella linea cellulare HOS che nella MG-63 (Figura 5 e Figura 6).

GLIOBLASTOMA

Analogamente a quanto rilevato nell'osteosarcoma, studi precedenti condotti nel laboratorio in cui ho poi svolto il mio periodo di dottorato, avevano documentato che la Caveolina-1 è un bersaglio molecolare dell'azione di 4-HPR anche nel glioblastoma umano dove è risultata down-regolata indipendentemente dalla induzione di apoptosi. In tale tumore infatti avevamo dimostrato che 4-HPR inibisce la proliferazione in due linee cellulari (CRS-A2 ed A-172) inducendo apoptosi in una di queste (CRS-A2). Nel mio periodo di dottorato lo studio è proseguito con la valutazione del meccanismo molecolare tramite cui essa induce morte cellulare programmata in questa linea cellulare. Come mostrato in Figura 8, il trattamento con 4-HPR 10 μ M determina, dopo 24 ore, la comparsa della forma attiva (17 kDa) della Caspasi 3, in parallelo alla riduzione della sua forma zimogena (32 kDa). A conferma della attivazione della Caspasi 3 è stato identificato anche aumento della forma degradata (85 kDa) del suo substrato PARP (*Poly ADP-ribose polymerase*) in associazione alla riduzione della forma attiva di 115 kDa.

Anche in questo tumore si è indagato se la riduzione di espressione proteica di Caveolina-1 fosse dovuta ad una regolazione a livello trascrizionale. L'analisi è stata effettuata in RT-PCR a tempi di trattamento di 24, 48 e 72 ore. I risultati, analogamente a quanto rilevato nell'osteosarcoma, non evidenziano alcuna variazione di espressione di Caveolina-1 sia nella linea cellulare CRS-A2 che nella A-172 (Figura 9).

Dato il ruolo di Caveolina-1 nella regolazione della attività della chinasi Akt/pAkt, la cui attivazione è molto importante nella eziologia del glioblastoma, era stato valutato il suo coinvolgimento nella azione di 4-HPR in questo tumore. I risultati, ottenuti precedentemente al mio periodo di dottorato, avevano evidenziato che, indipendentemente dalla induzione di apoptosi, il trattamento farmacologico è in grado di inibire il segnale di Akt/pAkt in quanto riduce sia l'espressione della forma basale che di quella fosforilata. Lo studio dell'effetto di 4-HPR su tale percorso molecolare è proseguito, durante il mio dottorato, con l'analisi di molecole a valle della chinasi Akt/pAkt. I risultati evidenziano, sia

nella linea cellulare CRS-A2 che nella A-172, una riduzione della espressione proteica della Ciclina D1 a partire dalle 24 ore di trattamento con 4-HPR 10 μ M; in parallelo si osserva riduzione della chinasi ciclina-dipendente ad essa associata, Cdk4. Inoltre, in corrispondenza della down-regolazione di Ciclina D1/Cdk4 il farmaco induce una riduzione della espressione proteica di p21 (Figura 10).

Lo studio nel glioblastoma umano è proseguito valutando l'effetto della somministrazione di 4-HPR in combinazione con Talidomide, farmaco che ha mostrato di avere una certa attività in questo tumore. Come riportato in Figura 11, entrambe le linee cellulari da noi saggiate sono risultate resistenti al trattamento con Talidomide (10-100 μ g/ml). E' stato quindi valutato l'effetto derivante dalla somministrazione di 4-HPR 10 μ M e Talidomide 50 μ g/ml in associazione ed in sequenza per diversi tempi. In particolare è stato valutato l'effetto della somministrazione in associazione per 72 ore (CRS-A2 e A-172) e per 96 ore (CRS-2). L'effetto dei due farmaci in sequenza è stato saggiato per tempi di 72 ore \rightarrow 72 ore (CRS-A2 e A-172) e per tempi di 96 ore \rightarrow 96 ore (CRS-A2). Per ciascuno dei trattamenti in associazione o in sequenza analizzati la valutazione dell'*E.R.* (*enhancement ratio*) ha identificato un effetto additivo (Tabella 1).

CARCINOMA MAMMARIO

Sulla base dei risultati precedentemente ottenuti nell'osteosarcoma e nel glioblastoma è stato valutato il coinvolgimento di Caveolina-1 nel meccanismo di azione di 4-HPR nel carcinoma mammario umano. A questo scopo è stato saggiato l'effetto di 4-HPR sulla proliferazione di due linee cellulari esprimenti Caveolina-1 (SKBR-3 e BRC-230) e di due in cui essa risulta assente (MAST e MCF-7). I risultati, riportati in Figura 12, mostrano che tutte le linee cellulari sono sensibili al trattamento farmacologico con 4-HPR per tempi compresi tra 24 e 72 ore. Lo studio è quindi proseguito con la valutazione del meccanismo molecolare di 4-HPR nelle linee cellulari esprimenti Caveolina-1. Allo scopo di verificare se ci fosse induzione di apoptosi in tali linee cellulari è stata valutata la presenza di ladder apoptotico. Come mostrato in Figura 13, la 4-HPR induce morte cellulare programmata a partire dalle 24 ore di trattamento sia nelle SKBR-3 che nelle BRC-230. E' stato quindi valutato l'effetto del trattamento farmacologico sulla espressione proteica di Caveolina-1; i risultati, riportati in Figura 14, evidenziano che i livelli proteici non subiscono alterazione a tutti i tempi esaminati.

CARCINOMA DEL PANCREAS

Studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio avevano evidenziato che la 4-HPR è in grado di indurre una moderata inibizione della crescita nel carcinoma del pancreas *in vitro*. Allo scopo di indagare se tale effetto potesse essere potenziato dalla demetilazione di geni coinvolti nel suo meccanismo d'azione, nel mio periodo di dottorato abbiamo valutato l'effetto della somministrazione di 4-HPR in combinazione con l'inibitore della metilazione 5-aza-2'deoxyctidine (DAC). L'effetto del DAC (1-2 μM) sulla proliferazione è stato saggiato nelle linee cellulari che erano risultate sensibili alla 4-HPR: MiaPaca2, PaCa44 e T3M4. Come riportato in Figura 15, la linea cellulare PaCa44 è risultata molto sensibile al trattamento col DAC; per questo motivo le successive analisi sono state condotte utilizzando le T3M4 e le MiaPaca2. In entrambe le linee cellulari è stato valutato l'effetto della somministrazione contemporanea di 4-HPR 5 μM e DAC 2 μM per 72 ore. Alle stesse dosi è stato saggiato l'effetto dei due farmaci in sequenza per tempi di 72 ore \rightarrow 72 ore. La valutazione degli *E.R.* (*Enhancement Ratio*) per la determinazione dell'effetto dei trattamenti in associazione o in sequenza ha identificato un effetto additivo (Tabella 2).

6. DISCUSSIONE

La 4-HPR (fenretinide) è un derivato sintetico della vitamina A che, dopo la sua sintesi alla fine degli anni '60 ad opera della *W. Johnson Pharmaceutical* (USA), è stata oggetto di numerosi studi *in vitro* e su modelli animali dai quali è emerso un suo possibile ruolo nella prevenzione tumorale. Sulla base di questi essa è stata valutata in studi clinici di chemioprevenzione che hanno rilevato la sua efficacia nel rallentare la progressione di tumori della prostata diagnosticati precocemente (Chodak GW et al, 1993), nel regredire lesioni premaligne come la cheratosi attinica facciale (Moglia D et al, 1996), nel prevenire carcinomi dell'ovario e secondi tumori mammari in donne in premenopausa (Veronesi U et al, 1999) e nel ridurre l'insorgenza di recidive in pazienti trattati chirurgicamente per leucoplachia orale (Lippman SM et al, 2006).

Rispetto ai retinoidi naturali la 4-HPR ha un migliore profilo tossicologico in quanto non si accumula a livello epatico con conseguente riduzione della tossicità in questa sede, ha una bassa tossicità aspecifica e una buona tollerabilità; gli studi clinici per valutare gli effetti della terapia a lungo termine hanno rilevato effetti collaterali di lieve entità e reversibili con la sospensione del trattamento (Garaventa A et al, 2003). La 4-HPR inoltre ha un buon profilo farmacocinetico: la sua biodisponibilità dopo somministrazione orale è elevata e la emivita plasmatica risulta superiore rispetto a quanto rilevato per altri retinoidi (Swanson BN et al, 1980). Sebbene considerata principalmente un agente chemiopreventivo, diversi studi *in vitro* e su modelli animali suggeriscono che essa possa trovare un impiego anche nella terapia antitumorale (Faderl S et al, 2003; Gopal AK et al, 2003).

A differenza dei retinoidi naturali che agiscono tramite induzione di differenziazione e blocco del ciclo cellulare, la 4-HPR regola la crescita cellulare soprattutto tramite induzione di apoptosi, sebbene siano stati riportati anche effetti citostatici (Jinno H et al, 1999) e capacità differenziante (Chen S et al, 2003); tuttavia, ad alte dosi essa induce necrosi piuttosto che morte cellulare programmata (Bruno S et al, 2002).

Il meccanismo molecolare alla base del controllo della proliferazione cellulare e della induzione di apoptosi da parte di 4-HPR non è stato ancora del tutto chiarito ma sembra che esso possa essere diverso a seconda del tessuto analizzato e, talvolta, differenti meccanismi possono operare nell'ambito dello stesso tipo di tessuto.

Lo studio da me condotto nel periodo di dottorato riguarda la valutazione del meccanismo molecolare alla base della attività di 4-HPR in tumori solidi umani quali osteosarcoma, glioblastoma, carcinoma del pancreas e mammario. Studi precedenti condotti nel laboratorio dove ho svolto il mio triennio di dottorato

hanno permesso di identificare un bersaglio molecolare innovativo della azione di 4-HPR nell'osteosarcoma e nel glioblastoma umani, la Caveolina-1, proteina coinvolta nella trasduzione di numerosi segnali intracellulari, fondamentale nella biogenesi delle caveolae e nel mantenimento della omeostasi del colesterolo (Gasperi-Campani A et al, 2006). Sulla base di questa sua implicazione nel trasporto intracellulare del colesterolo, nel presente studio è stato valutato l'effetto di 4-HPR sulla esterificazione di questo lipide, processo fondamentale tramite cui la cellula ne regola i livelli citoplasmatici. Lo studio è stato condotto nell'osteosarcoma *in vitro* nelle linee cellulari in cui era stata precedentemente da noi documentata efficacia di 4-HPR nell'inibire la proliferazione cellulare e nell'indurre apoptosi indipendentemente dalla presenza di p53 (Gasperi-Campani A et al, 2002). Lo studio riportato nella presente tesi ha evidenziato che il trattamento farmacologico causa una precoce riduzione della sintesi di nuovi esteri con conseguente aumento del colesterolo citoplasmatico libero; gli eccessi intracellulari di questo lipide non esterificato possono essere tossici per la cellula (Fielding CJ and Fielding PE, 2001) e possono essere responsabili della inibizione della crescita, come documentato dal fatto che, nel presente studio, la inibizione della proliferazione inizia successivamente alla inibizione della esterificazione. Per contrastare gli eccessi di colesterolo libero, in presenza di agenti che ne inibiscono la esterificazione, la cellula può mettere in atto meccanismi per aumentarne l'esporto tramite up-regolazione del trasportatore di membrana ABCA-1, la cui espressione è determinata essenzialmente dai livelli di colesterolo libero intracellulari (Yokoyama S, 2006). Nel presente studio, di fatto, in seguito alla inibizione della esterificazione si osserva un aumento della espressione di ABCA-1. Un altro membro della famiglia dei trasportatori di membrana implicato nel mantenimento dell'omeostasi intracellulare del colesterolo è la Glicoproteina P, codificata dal gene MDR-1: essa, agendo in direzione opposta ad ABCA-1, determina il rilascio del colesterolo libero dalla membrana plasmatica al reticolo endoplasmatico. La down-regolazione di MDR-1 rilevata nel presente studio suggerisce che l'aumento di colesterolo intracellulare libero fa sì che la cellula metta in atto meccanismi per diminuire l'entrata di colesterolo ed è in accordo con altri studi che suggeriscono una correlazione positiva tra il tasso di proliferazione cellulare e l'espressione di MDR-1 (Orlowski S et al, 2006). I risultati riportati in questa tesi documentano la inibizione della esterificazione del colesterolo come nuovo meccanismo alla base della attività antiproliferativa e della induzione di apoptosi da parte di 4-HPR; questo sembra essere la conseguenza sia di un effetto precoce diretto nei confronti dell'enzima che catalizza la esterificazione del colesterolo (Acat-1) sia da un più tardivo controllo della sua trascrizione come dimostrato dal calo di espressione del suo mRNA. Questo studio, inoltre, evidenzia il ruolo svolto degli esteri del colesterolo nel controllo della crescita cellulare anche nei tumori

solidi, dopo che lo si era documentato nelle leucemie (Dessi S et al, 2003) e nelle cellule muscolari lisce da aorta umana (Batetta B et al, 2003): essi non rappresentano solo una forma di deposito lipidico ma hanno un ruolo nella induzione della proliferazione cellulare come dimostrato dal fatto che esiste una correlazione positiva tra tasso di proliferazione cellulare ed esterificazione del colesterolo mentre il trattamento con agenti inibitori della esterificazione del colesterolo causa una significativa riduzione della crescita cellulare.

Lo studio è proseguito, nel mio triennio di dottorato, con la valutazione del meccanismo a cui si deve la riduzione di espressione di Caveolina-1 ad opera di 4-HPR precedentemente osservata nell'osteosarcoma e nel glioblastoma umani. A questo scopo è stata valutata la metilazione come possibile meccanismo alla base del suo silenziamento genico: i risultati sembrano escludere che tale meccanismo sia coinvolto nell'effetto di 4-HPR sulla espressione di Caveolina-1, a differenza di quanto riportato da Engelman JA et al (1999) in linee cellulari di carcinoma mammario in cui la assenza di espressione di Caveolina-1 è risultata associata a metilazione del suo gene.

La valutazione dell'espressione del mRNA di Caveolina-1 non ha rilevato alcuna variazione dei suoi livelli in seguito al trattamento con 4-HPR né nell'osteosarcoma né nel glioblastoma; tali risultati suggeriscono che il meccanismo che determina l'effetto del farmaco sulla espressione di Caveolina-1 sia lo stesso nei due modelli sperimentali e che il coinvolgimento di Caveolina-1 avvenga ad un livello successivo alla sua trascrizione.

In virtù della sua lipofilia, la 4-HPR è in grado di attraversare la barriera emato-encefalica risultando quindi di grande interesse un suo possibile impiego nel trattamento e nella prevenzione della progressione dei tumori cerebrali (Puduvalli VK et al, 2004). Studi da noi precedentemente condotti nel glioblastoma umano ci avevano permesso di documentare che 4-HPR è attiva nell'inibire la proliferazione di due linee cellulari (CRS-A2 e A-172) inducendo apoptosi in una di queste (CRS-A2). Nel presente studio la valutazione del meccanismo dell'induzione di apoptosi da parte di 4-HPR nella linea cellulare CRS-A2 indica che ciò avviene tramite attivazione della cascata delle Caspasi, in linea con quanto riportato in linee cellulari di glioma (Puduvalli VK et al, 1999).

Sulla base della inibizione della chinasi Akt/pAkt ad opera di 4-HPR precedentemente identificata nel glioblastoma, lo studio qui riportato è proseguito con la valutazione di molecole coinvolte in tale percorso molecolare. Poichè l'attivazione di Akt/pAkt, fortemente coinvolta nella eziologia di questo tumore, sembra regolare la proliferazione cellulare sia tramite regolazione diretta della Ciclina D1 (Chakravarti A et al, 2004) sia tramite stabilizzazione e fosforilazione della proteina p21 (Li Y et al, 2002) è stato valutato l'effetto di 4-HPR su tali molecole. In entrambe le linee cellulari di glioblastoma analizzate il

trattamento con 4-HPR causa una riduzione della espressione della Ciclina D1 e della chinasi ciclina dipendente ad essa associata, Cdk4; tali risultati sono in accordo con quanto rilevato da Panigone S et al (2000) nel carcinoma mammario e da Hsieh T e Wu JM (2000) nel linfoma di Burkitt. Nel presente studio inoltre il trattamento farmacologico induce riduzione della espressione di p21. I risultati qui riportati quindi suggeriscono che l'effetto di 4-HPR nel glioblastoma umano derivi dalla inibizione della proliferazione sostenuta dal segnale di Ciclina D1/Cdk4 e dalla soppressione della sopravvivenza mediata da p21 tramite inibizione della chinasi Akt/pAkt.

Una delle strategie per aumentare la efficacia dei retinoidi consiste nella loro combinazione con la radioterapia o con altri agenti farmacologici (Sun SY and Lotan R, 2002). Un farmaco che ha mostrato di avere una certa attività antitumorale nei glioblastomi è Talidomide, caratterizzato da proprietà immunomodulatorie ed antiangiogenetiche, che analogamente a 4-HPR è in grado di attraversare la barriera emato-encefalica. Per queste sue caratteristiche unite all'osservazione che le linee cellulari CRS-A2 ed A-172 sono risultate resistenti al trattamento con Talidomide, è stato saggiato l'effetto sulla proliferazione cellulare derivante dalla somministrazione di 4-HPR in associazione o in sequenza con Talidomide. I risultati riportati nella presente tesi hanno evidenziato che ai tempi analizzati i due farmaci, nei diversi schemi di associazione, hanno effetto additivo sulla proliferazione cellulare.

Sulla base dei risultati ottenuti nell'osteosarcoma e glioblastoma umani è stato valutato il coinvolgimento della Caveolina-1 nel meccanismo d'azione di 4-HPR nel carcinoma mammario umano, tumore nel quale ne è nota la efficacia dalla letteratura (Simeone AM and Tari AM, 2004). A questo scopo nel mio periodo di dottorato è stato saggiato l'effetto del trattamento farmacologico in linee cellulari che esprimono Caveolina-1 (SKBR-3 e BRC-230) ed in linee cellulari che non la esprimono (MCF-7 e MAST). I risultati indicano che la 4-HPR è attiva nell'inibire la proliferazione delle linee cellulari BRC-230 e MAST; inoltre è stato confermato l'effetto antiproliferativo nelle linee cellulari SKBR-3 e MCF-7 già riportato da Panigone S et al (2000). La successiva valutazione del meccanismo molecolare di azione di 4-HPR nelle linee cellulari esprimenti Caveolina-1 ha evidenziato che 4-HPR agisce tramite induzione di apoptosi. Per quanto riguarda l'espressione proteica di Caveolina-1, essa non subisce alterazione in entrambe le linee cellulari. I risultati del presente studio suggeriscono che nel carcinoma mammario 4-HPR è attiva nell'inibire la proliferazione cellulare in maniera indipendente dalla presenza di Caveolina-1; anche nelle linee cellulari in cui essa risulta espressa, 4-HPR sembra agire con un meccanismo molecolare differente rispetto a quanto da noi rilevato nell'osteosarcoma e nel glioblastoma umani.

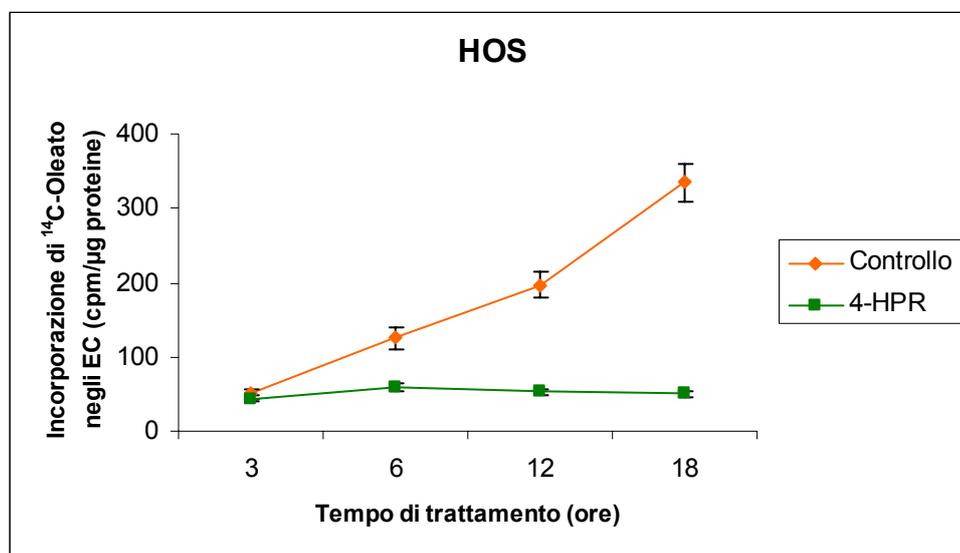
Studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio avevano evidenziato che 4-HPR

è in grado di indurre una moderata inibizione della crescita nel carcinoma del pancreas *in vitro*. Sebbene l'efficacia del trattamento con 4-HPR in questo tumore fosse risultata di minore entità rispetto a quanto rilevato in altri tumori, essa può essere considerata importante alla luce della scarsa risposta di questo carcinoma ai farmaci attualmente in uso, alla sua alta aggressività e alla possibilità teorica di aumentarne la efficacia tramite combinazione con altri farmaci. Per questo motivo, nel presente studio è stata indagata la possibilità di potenziare l'effetto di 4-HPR tramite demetilazione di geni coinvolti nel suo meccanismo molecolare di azione; in particolare è stato indagato l'effetto sulla proliferazione derivante dalla somministrazione contemporanea o in sequenza di 4-HPR con l'agente demetilante 5-aza-2'deoxyctidine (DAC). I risultati riportati nella presente tesi hanno evidenziato un effetto additivo sulla proliferazione cellulare.

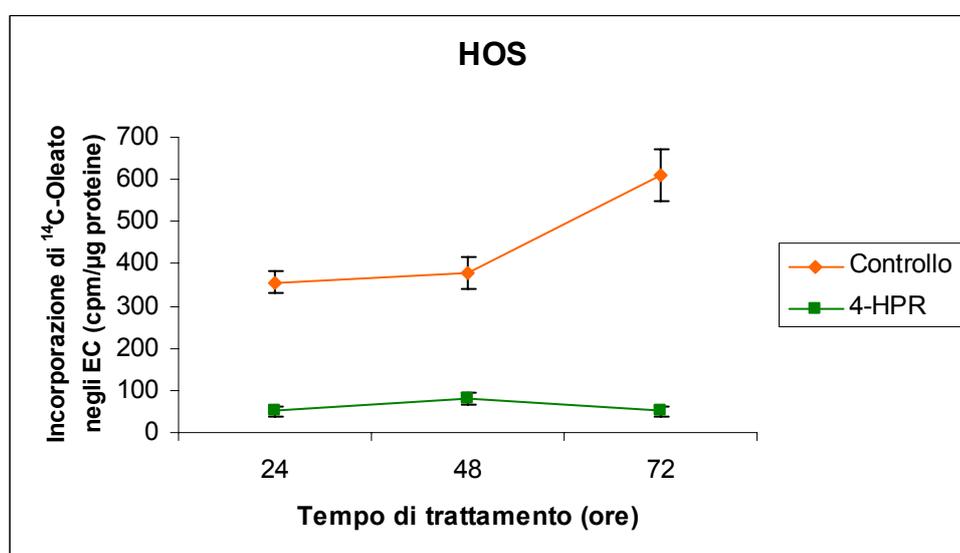
Lo studio riportato nella presente tesi suggerisce che l'azione di 4-HPR nei tumori umani può essere indipendente da Caveolina-1 come dimostrato nel carcinoma mammario umano oppure mediato dalla sua down-regolazione come precedentemente rilevato nell'osteosarcoma e nel glioblastoma umani. Nei modelli tumorali in cui Caveolina-1 è un bersaglio molecolare di 4-HPR la valutazione del meccanismo che determina l'effetto del farmaco sulla sua espressione suggerisce che esso non sia dovuto a regolazione della sua trascrizione ma ad una azione ad un livello successivo ad essa. Tante sono le molecole con cui Caveolina-1 interagisce direttamente e tramite cui modula numerose vie di trasduzione del segnale; effetti indiretti inoltre possono essere mediati dalla sua influenza nel trasporto del colesterolo. Il suo coinvolgimento o meno nel meccanismo d'azione di 4-HPR pertanto può essere dovuto alla attivazione o inattivazione di specifici segnali da essa regolati nei diversi modelli tumorali, che sono attualmente in studio nel laboratorio in cui ho svolto il mio periodo di dottorato.

Nel presente studio è stata identificata, per la prima volta, la inibizione della esterificazione del colesterolo come meccanismo alla base della attività antiproliferativa e della induzione di apoptosi da parte di un farmaco antitumorale, quale la 4-HPR, nell'osteosarcoma umano; studi successivi a questa tesi chiariranno se tale meccanismo di azione di 4-HPR è presente anche in altri modelli tumorali. Tali risultati uniti alla evidenza che gli esteri del colesterolo rivestono un ruolo importante nel controllo della crescita cellulare identificano la inibizione della esterificazione come un nuovo bersaglio per il controllo della proliferazione cellulare, sia normale (Batetta B et al, 2003) che tumorale (Dessi S et al, 2003; Dessi S et al, 2007).

7. FIGURE E TABELLE

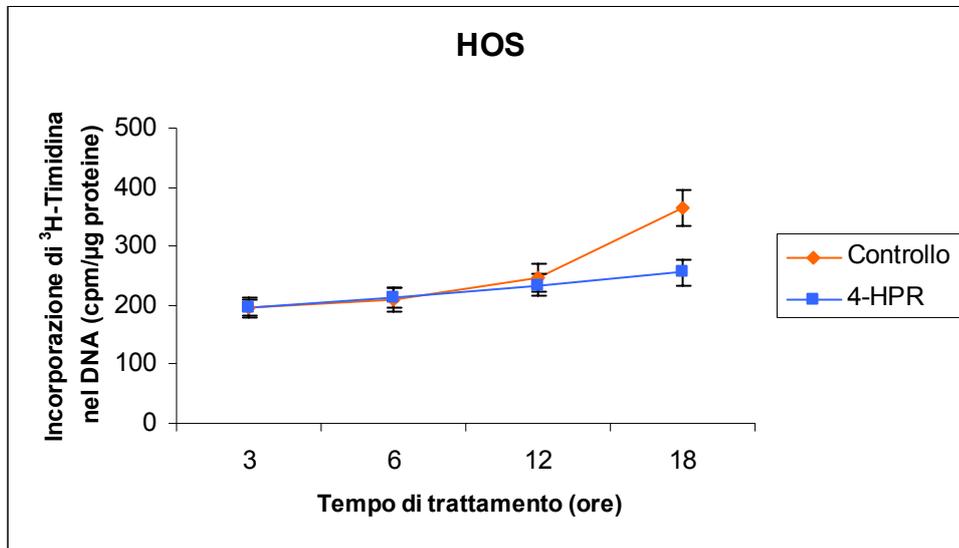


A

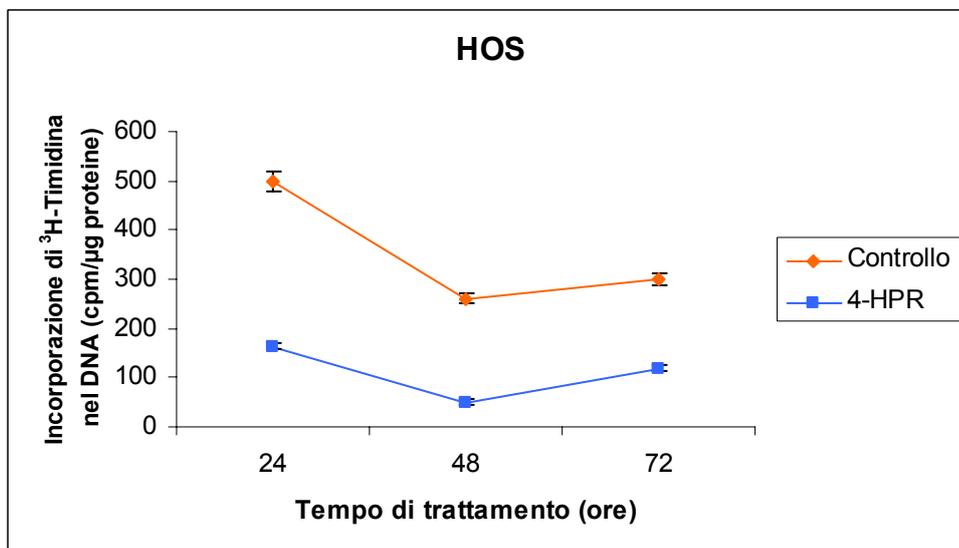


B

Figura 1. Incorporazione di ^{14}C -Oleato negli esteri del colesterolo (EC) nella linea cellulare di osteosarcoma umano HOS in assenza (Controllo) o presenza di 4-HPR 10 μM (4-HPR).

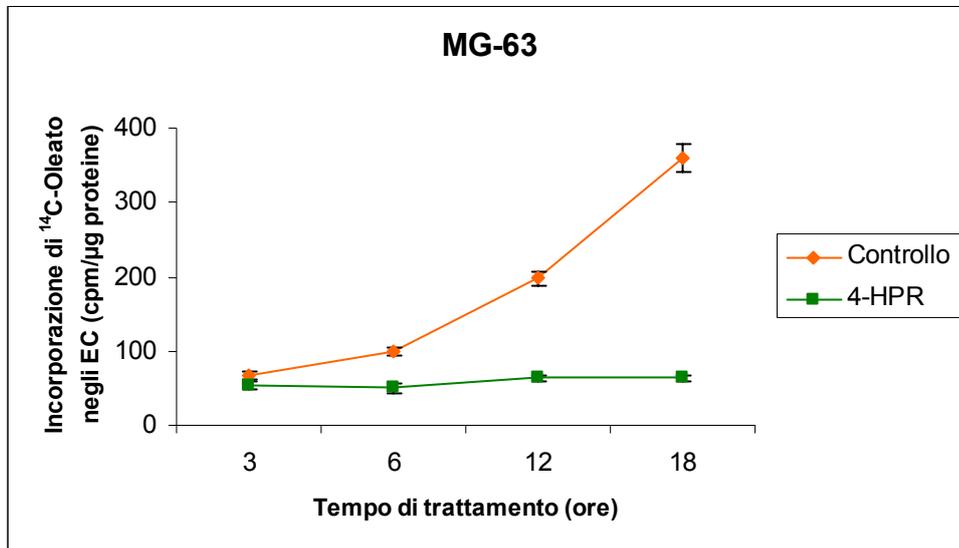


A

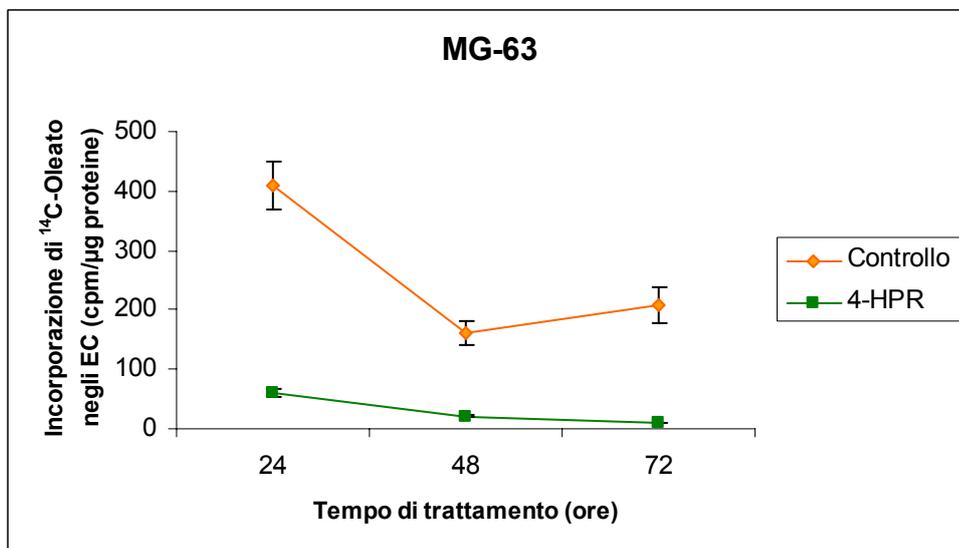


B

Figura 2. Incorporazione di ³H-timidina nel DNA nella linea cellulare di osteosarcoma umano HOS in assenza (Controllo) o presenza di 4-HPR 10 μM (4-HPR).

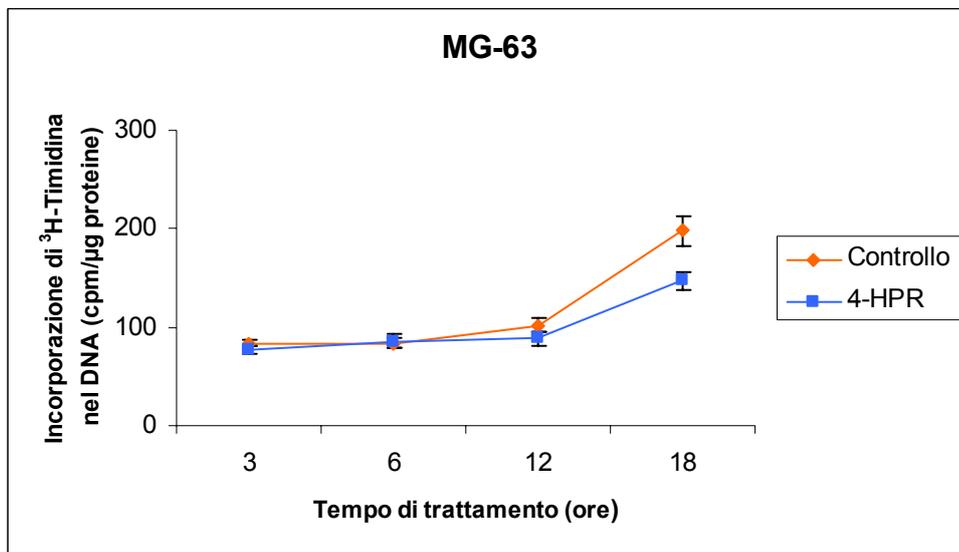


A

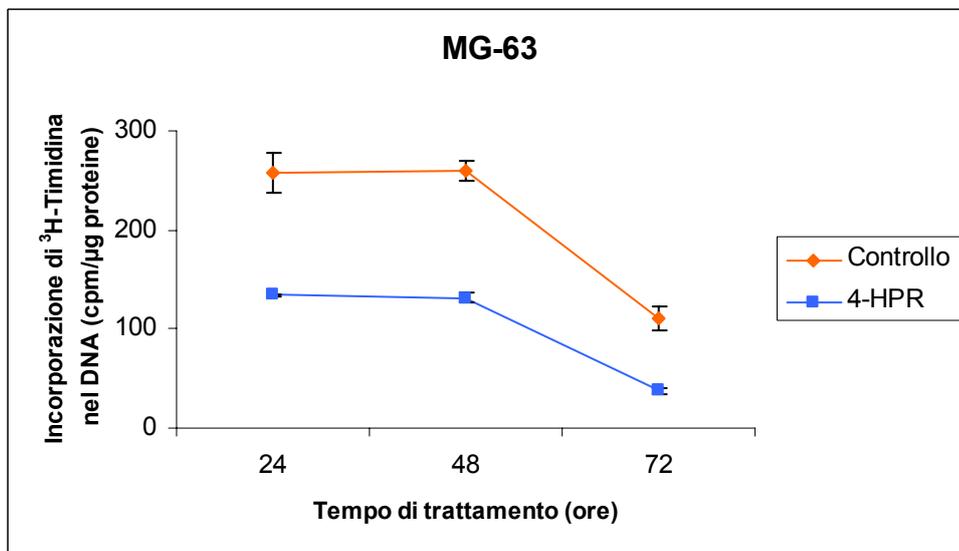


B

Figura 3. Incorporazione di ^{14}C -Oleato negli esteri del colesterolo (EC) nella linea cellulare di osteosarcoma umano MG-63 in assenza (Controllo) o presenza di 4-HPR 10 μM (4-HPR).

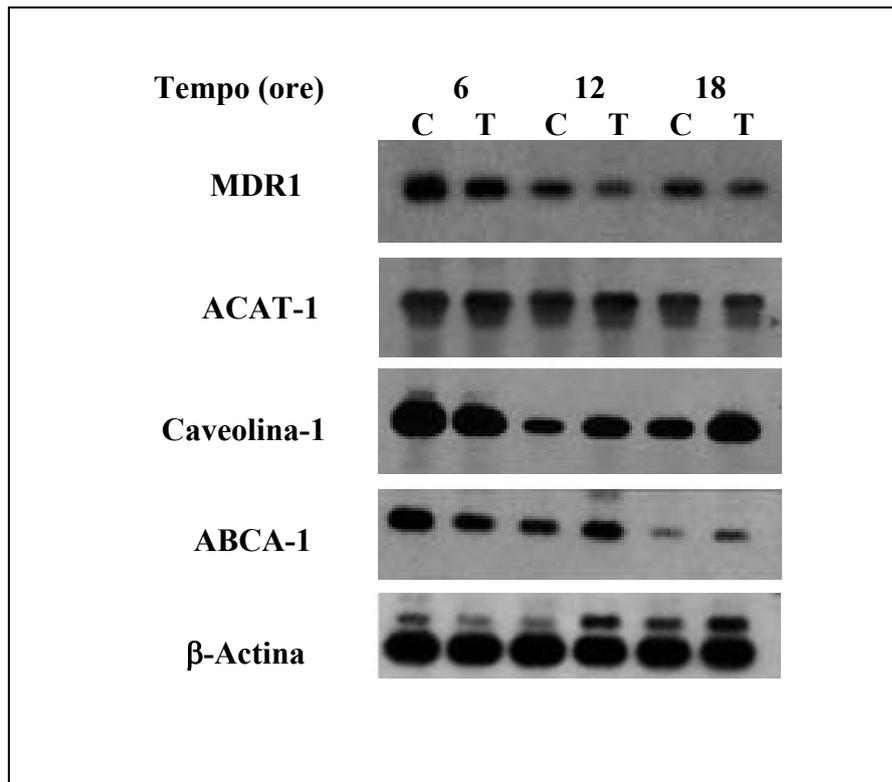


A

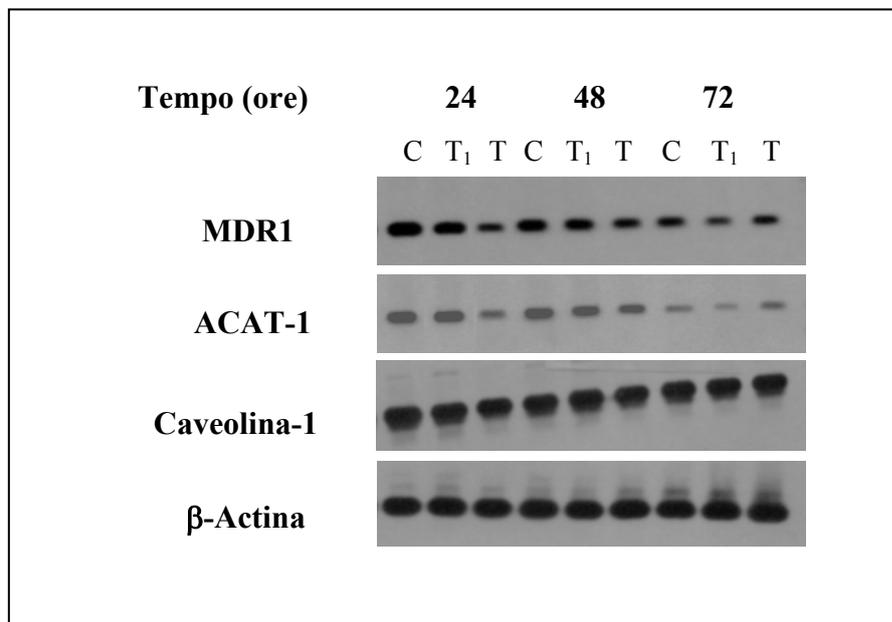


B

Figura 4. Incorporazione di ³H-timidina nel DNA nella linea cellulare di osteosarcoma umano MG-63 in assenza (Controllo) o presenza di 4-HPR 10 µM (4-HPR).

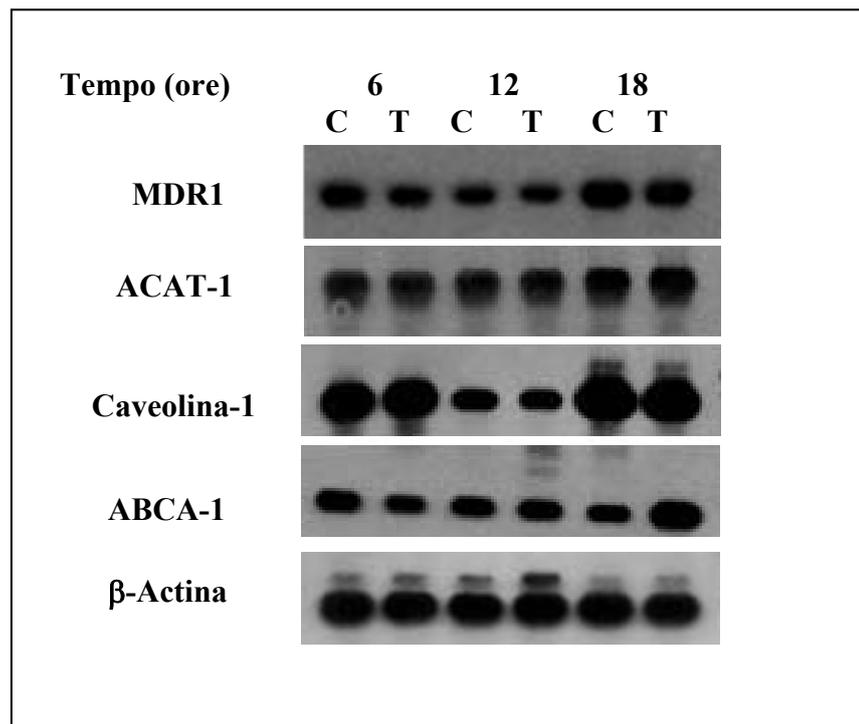


A

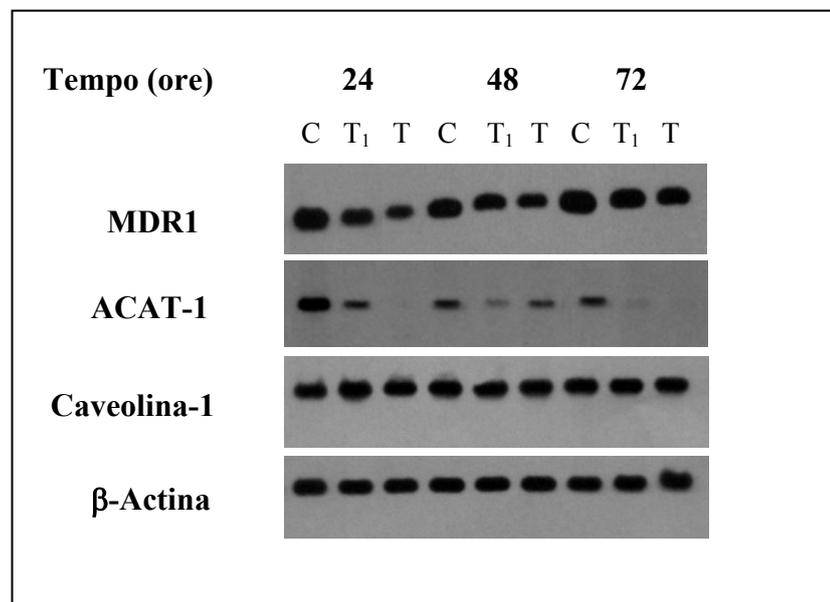


B

Figura 5. Valutazione dell'espressione dell'mRNA di MDR1, ACAT-1, Caveolina-1 e ABCA-1 tramite RT-PCR nella linea cellulare di osteosarcoma umano HOS in assenza (C) o presenza di 4-HPR 5 μ M (T₁) o 10 μ M (T).



A



B

Figura 6. Valutazione dell'espressione dell'mRNA di MDR1, ACAT-1, Caveolina-1 e ABCA-1 tramite RT-PCR nella linea cellulare di osteosarcoma umano MG-63 in assenza (C) o presenza di 4-HPR 5 μ M (T₁) o 10 μ M (T).

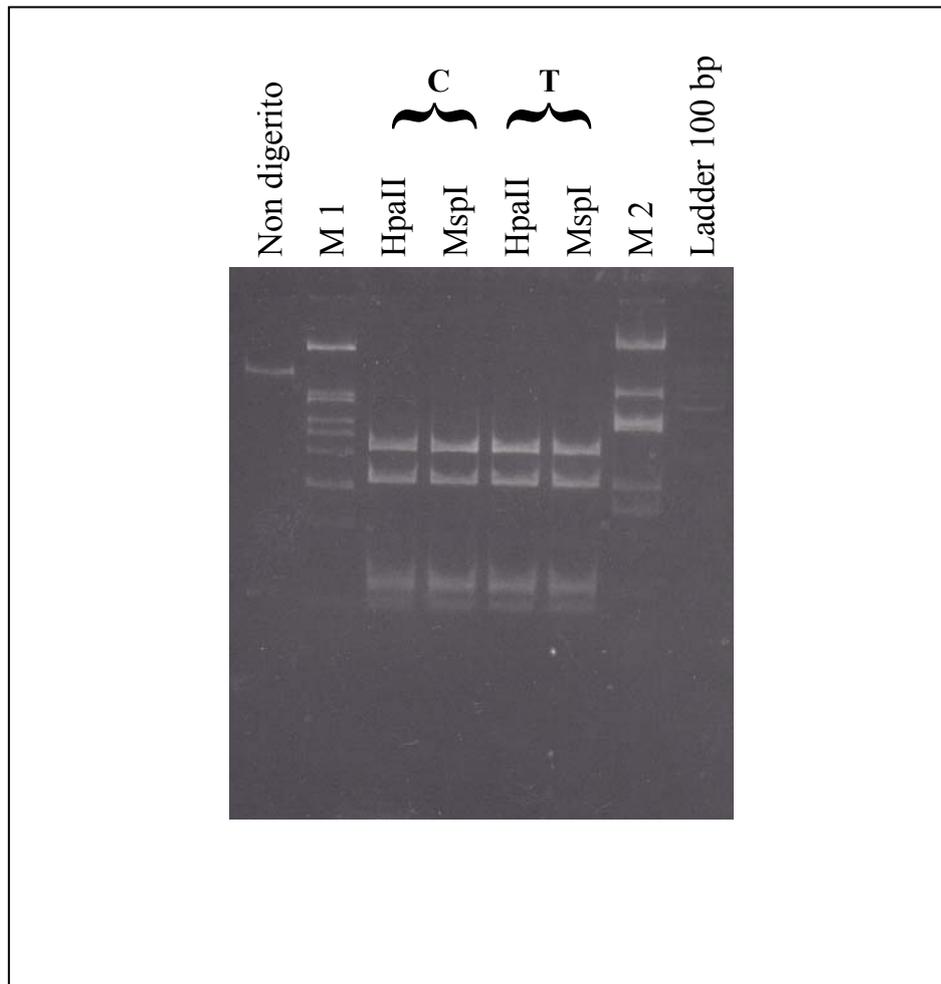


Figura 7. Analisi della metilazione del primo esone del gene CAV-1 tramite digestione con enzimi di restrizione *HpaII* ed *MspI* nella linea cellulare di osteosarcoma umano HOS in assenza (C) o presenza di 4-HPR 10 μ M (T) per 24 ore (M 1 ed M 2: marcatori di peso molecolare).

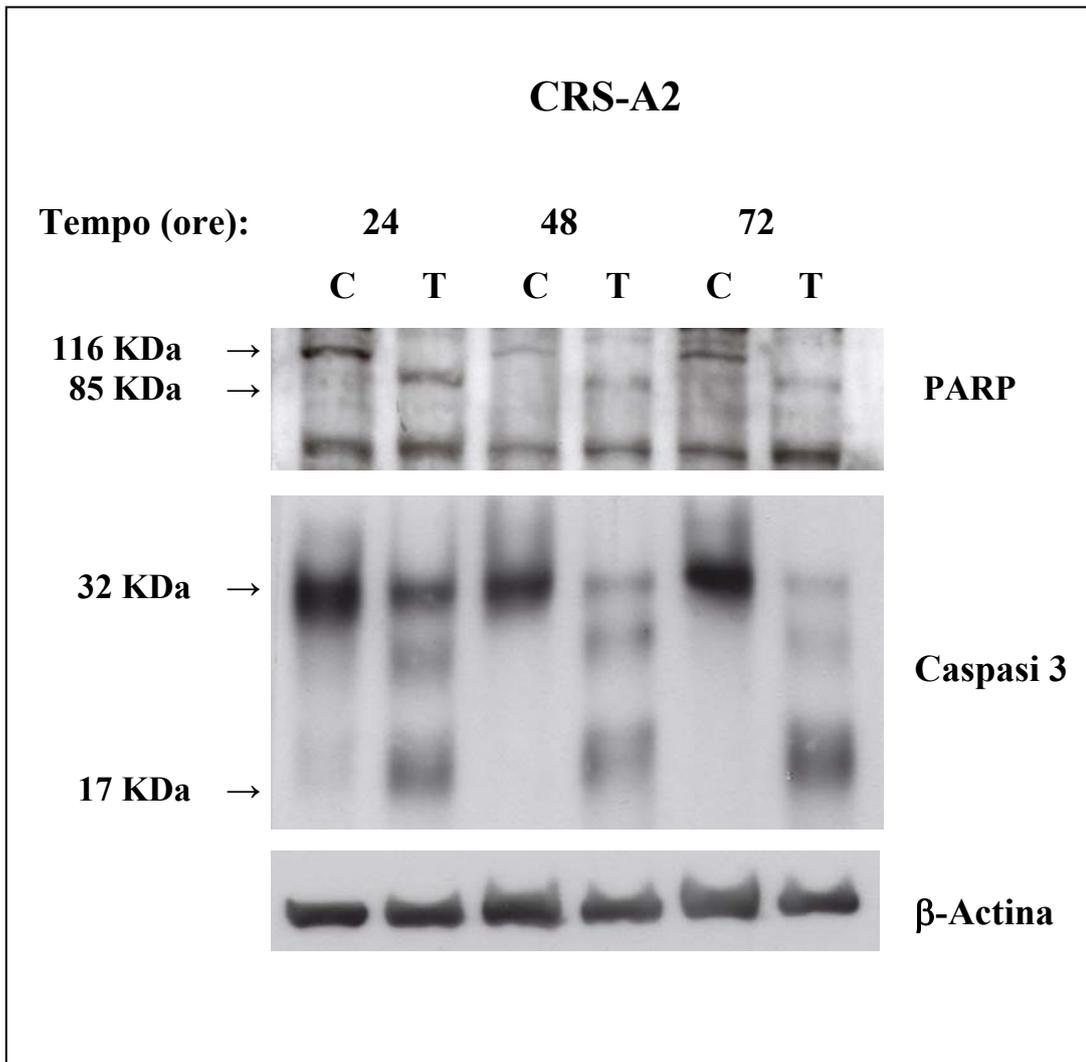


Figura 8. Analisi in Western Blotting dell'induzione di Caspasi 3 e del suo substrato PARP (*Poly ADP-ribose polymerase*) nella linea cellulare di glioblastoma umano CRS-A2 in assenza (C) o presenza di 4-HPR 10 μ M (T).

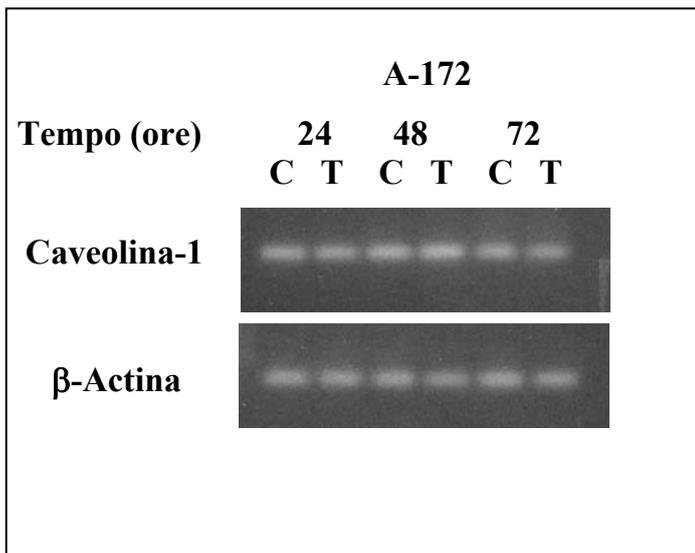
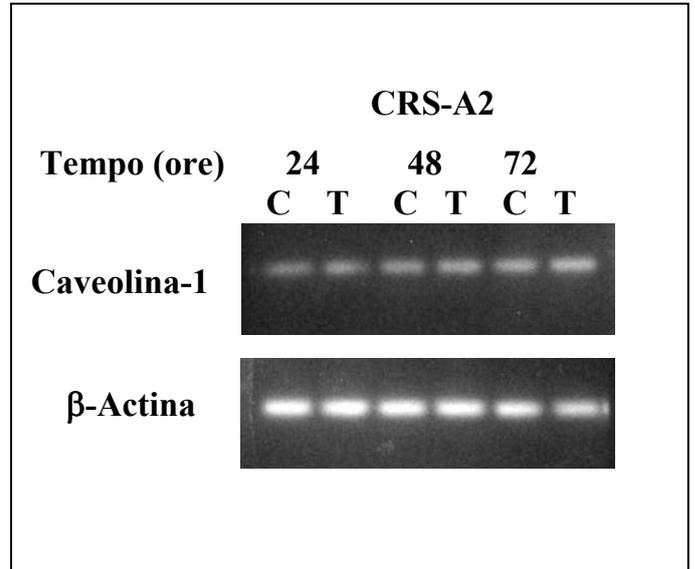


Figura 9. Valutazione dell'espressione dell'mRNA di Caveolina-1 tramite RT-PCR nelle linee cellulari di glioblastoma umano CRS-A2 e A-172 in assenza (C) o presenza di 4-HPR 10 μ M (T).

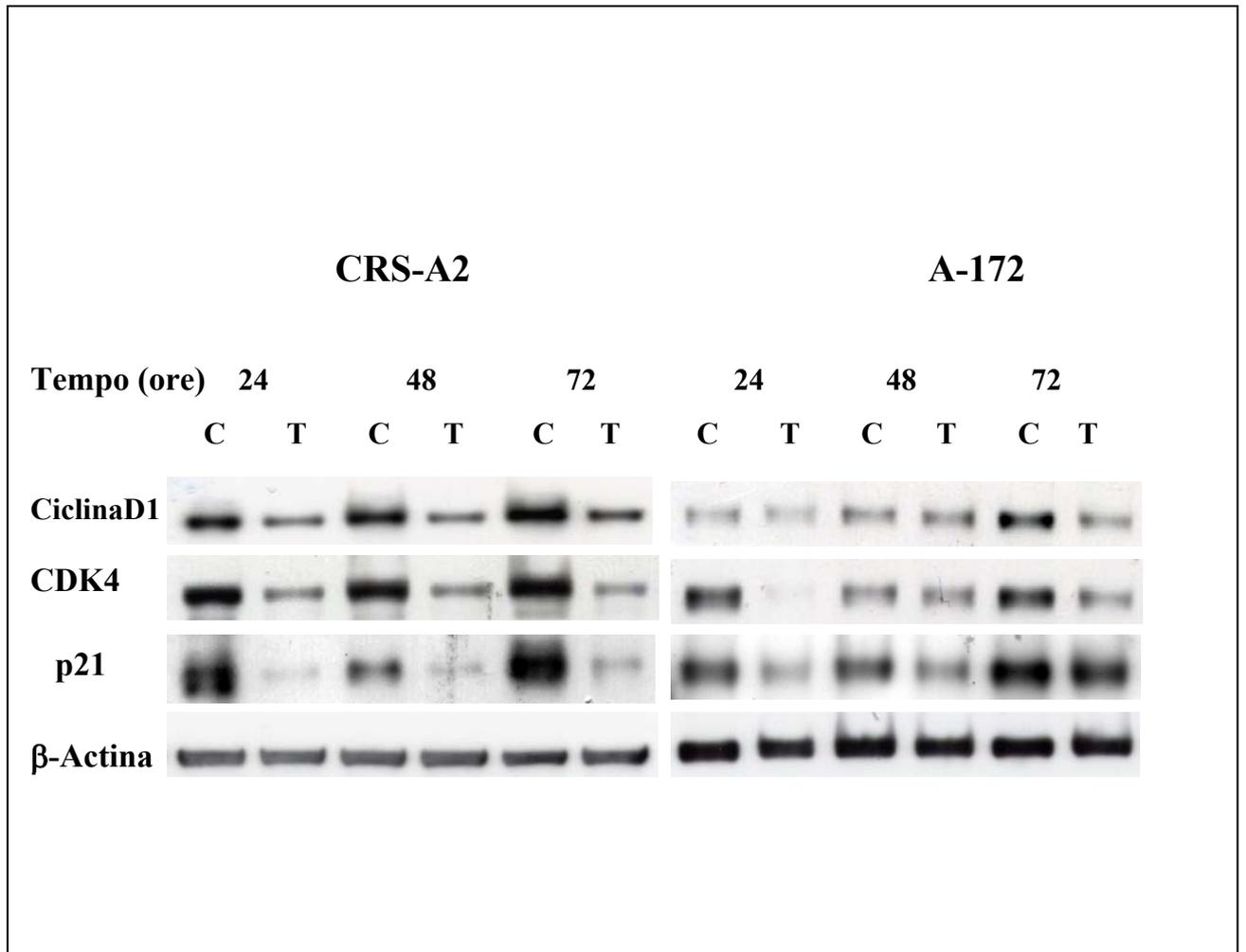


Figura 10. Analisi in Western Blotting dell'espressione di CiclinaD1/CDK4 e p21 nelle linee cellulari di glioblastoma umano CRS-A2 e A-172 in assenza (C) o presenza di 4-HPR 10 μ M (T).

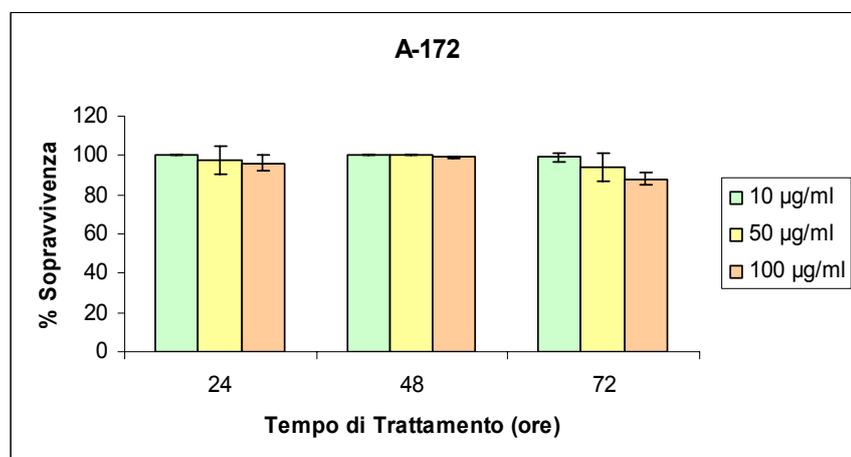
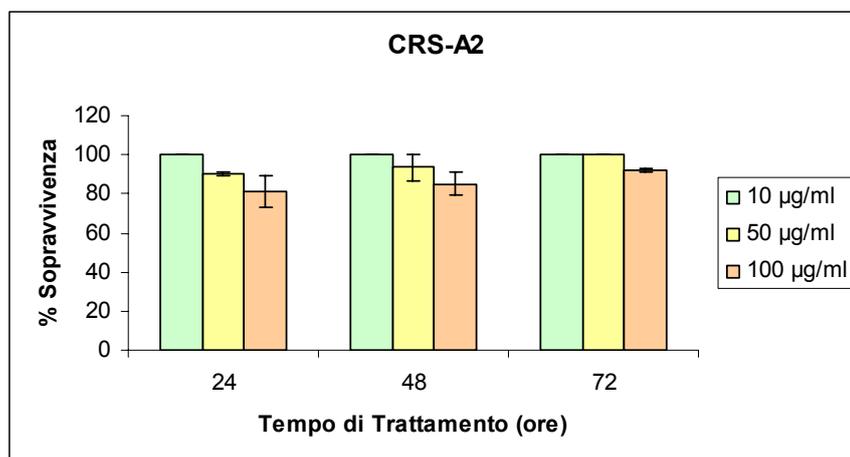


Figura 11. Effetto di Talidomide sulla proliferazione delle linee cellulari di glioblastoma umano CRS-A2 e A-172.

CRS-A2					
	4-HPR	Talidomide	4-HPR + Talidomide	4-HPR → Talidomide	Talidomide → 4-HPR
72 ore	58 % ± 2	90 % ± 2	48 % ± 3 <i>E.R. > 0.8</i>	77 % ± 3 <i>E.R. > 0.8</i>	53 % ± 3 <i>E.R. > 0.8</i>
96 ore	54 % ± 4	85 % ± 4	46 % ± 3 <i>E.R. > 0.8</i>	85 % ± 4 <i>E.R. > 0.8</i>	42 % ± 4 <i>E.R. > 0.8</i>

A-172					
	4-HPR	Talidomide	4-HPR + Talidomide	4-HPR → Talidomide	Talidomide → 4-HPR
72 ore	68 % ± 7	95 % ± 1	76 % ± 4 <i>E.R. > 0.8</i>	89 % ± 4 <i>E.R. > 0.8</i>	81 % ± 3 <i>E.R. > 0.8</i>

Tabella 1. Effetto delle combinazioni farmacologiche di 4-HPR (10 µM) e Talidomide (50 µg/ml) sulla sopravvivenza cellulare (% ± E.S.) delle linee cellulari di glioblastoma umano CRS-A2 e A-172. *E.R.* (*Enhancement Ratio*) valutato come descritto nei Materiali e Metodi.

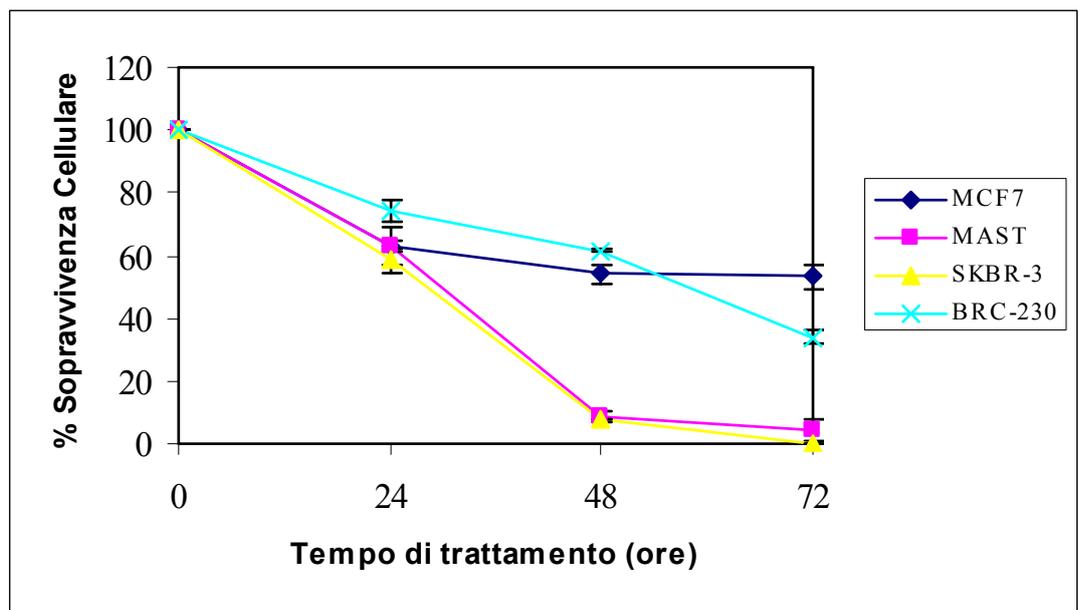


Figura 12. Effetto di 4-HPR 10 μ M sulla proliferazione delle linee cellulari di carcinoma mammario umano MCF-7, MAST, SKBR-3 e BRC-230.

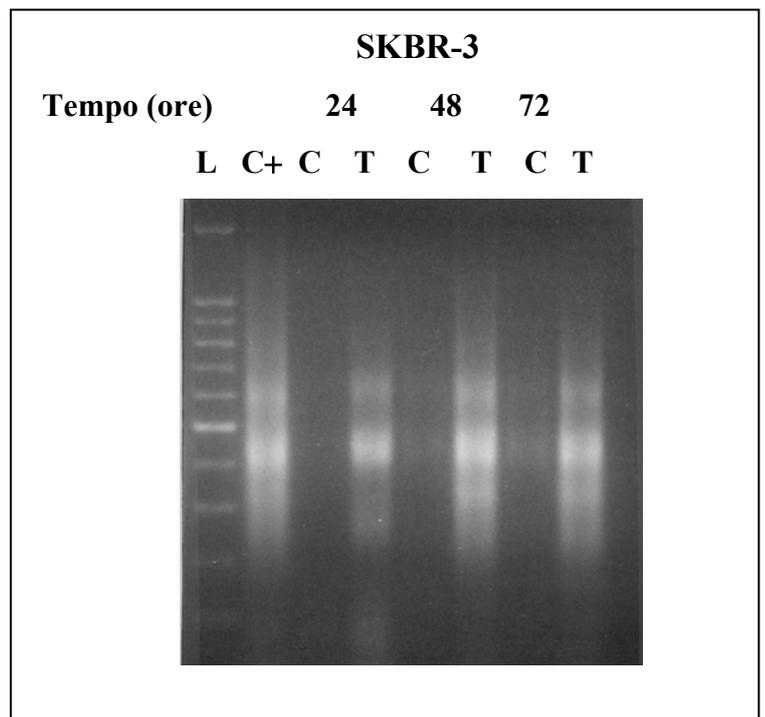
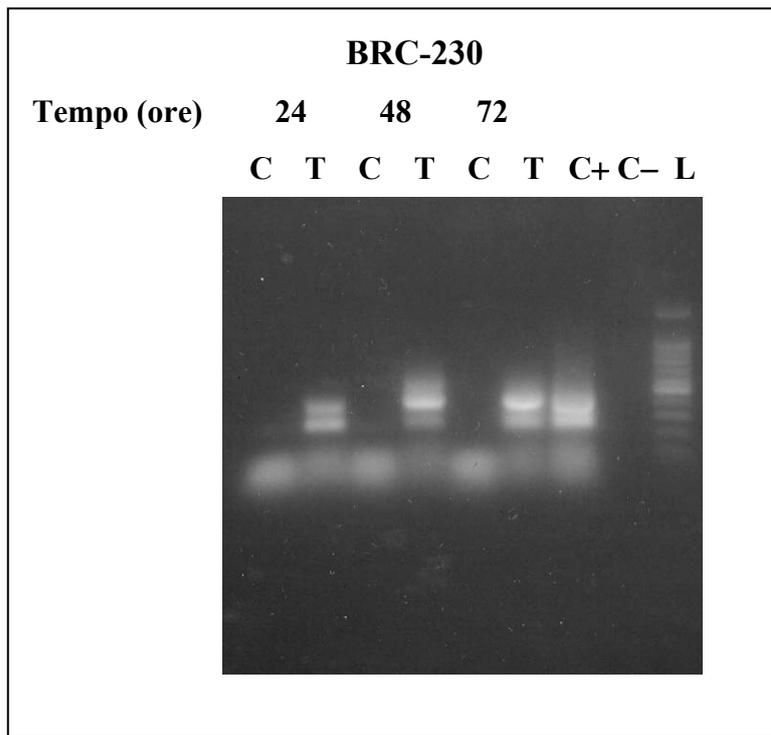


Figura 13. Induzione di apoptosi nelle linee cellulari di carcinoma mammario umano in assenza (C) o presenza (T) di 4-HPR 10 μ M (BRC-230) o 5 μ M (SKBR-3); C+: controllo positivo, C-: controllo negativo, L: 100bp Ladder.

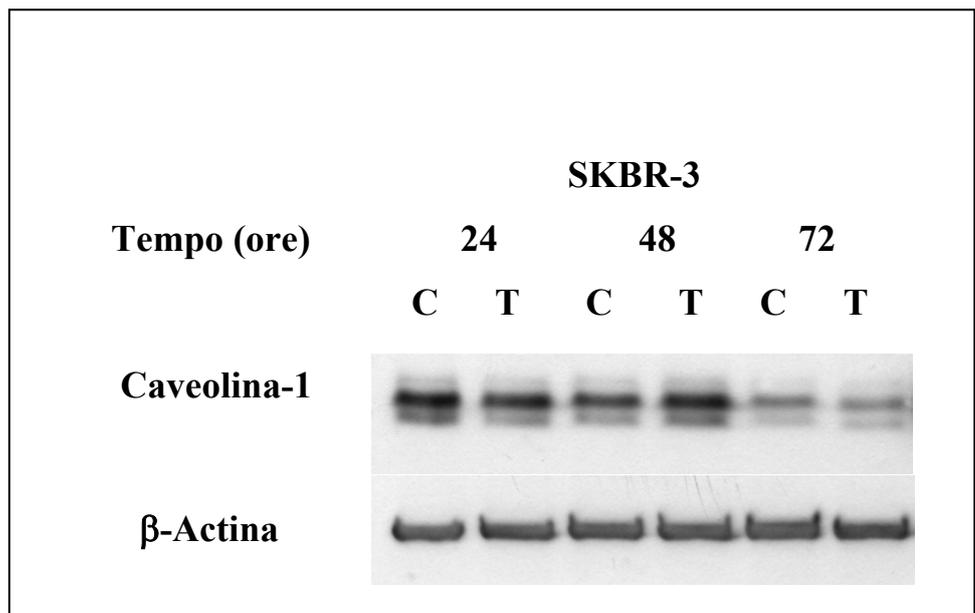
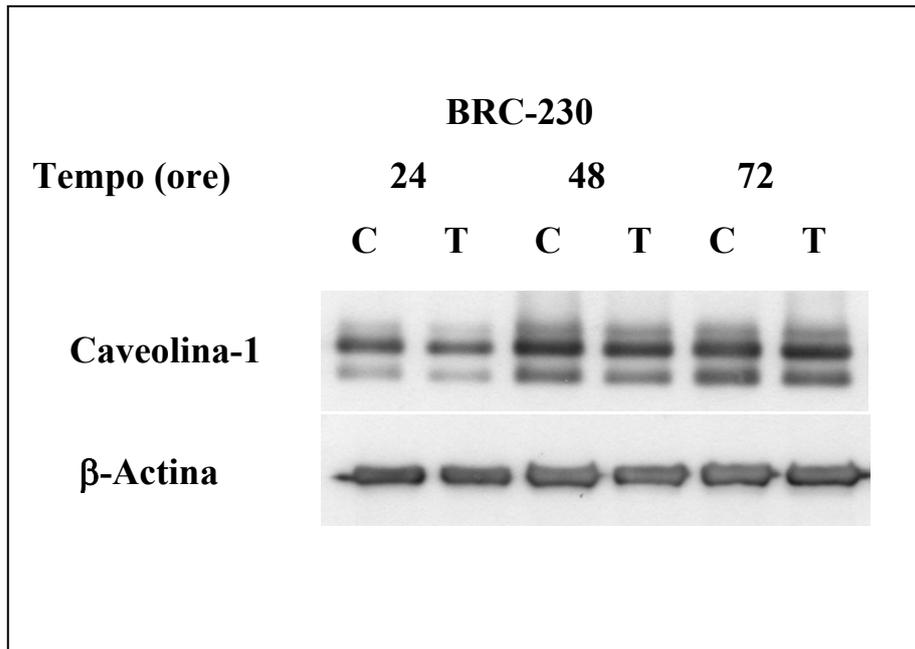


Figura 14. Analisi in Western Blotting dell'espressione di Caveolina-1 nelle cellulari di carcinoma mammario umano in assenza (C) o presenza (T) di 4-HPR 10 μ M (BRC-230) o 5 μ M (SKBR-3).

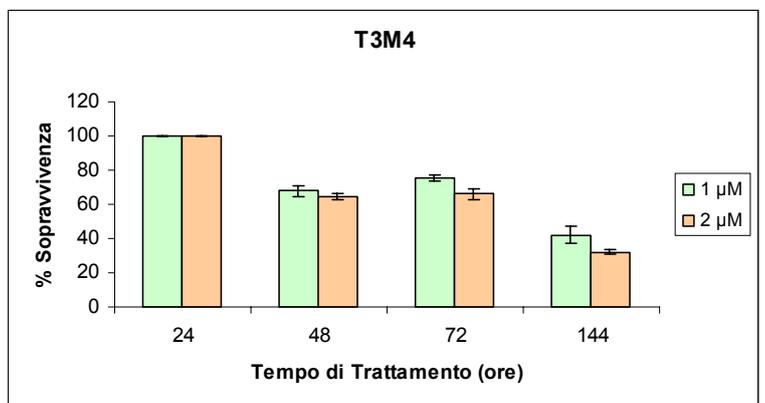
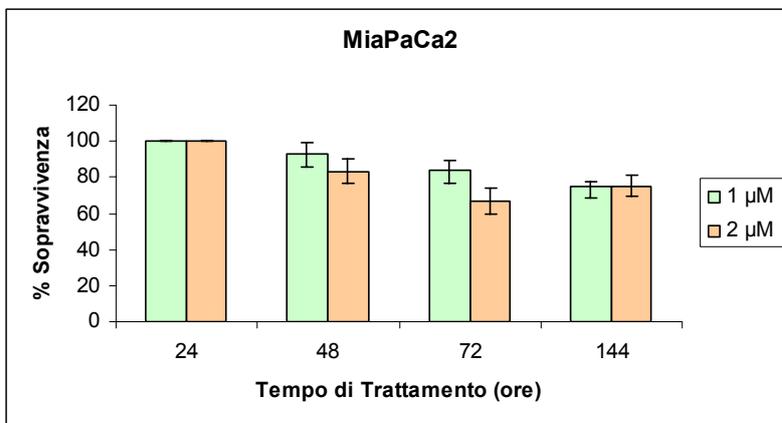
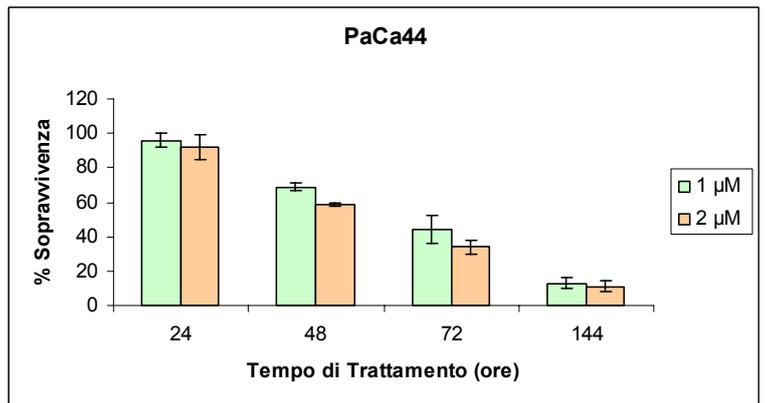


Figura 15. Effetto di 5-aza-2'deoxyctidine (DAC) sulla proliferazione delle linee cellulari di carcinoma del pancreas umano T3M4, MIAPaCa2, PaCa44

T3M4					
	4-HPR	DAC	4-HPR + DAC	4-HPR → DAC	DAC → 4-HPR
72 ore	57 % ± 4	72 % ± 3	48 % ± 3	65 % ± 3	82 % ± 6
			<i>E.R. > 0.8</i>	<i>E.R. > 0.8</i>	<i>E.R. > 0.8</i>

MIAPaCa2					
	4-HPR	DAC	4-HPR + DAC	4-HPR → DAC	DAC → 4-HPR
72 ore	66 % ± 4	62 % ± 5	50 % ± 5	82 % ± 3	62 % ± 3
			<i>E.R. > 0.8</i>	<i>E.R. > 0.8</i>	<i>E.R. > 0.8</i>

Tabella 2. Effetto delle combinazioni farmacologiche di 4-HPR (5 µM) e 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC, 2 µM) sulla sopravvivenza cellulare (% ± E.S.) delle linee cellulari di carcinoma del pancreas umano T3M4 e MIAPaCa2. *E.R.* (*Enhancement Ratio*) valutato come descritto nei Materiali e Metodi.

8. BIBLIOGRAFIA

Abou-Issa H, Moeschberger M, El-Masry W, Tejwani S, Curley RW and Webb TE, *Relative efficacy of glucarate on the initiation and promotion phases of rat mammary carcinogenesis*. Anticancer Res, 15: 805-10, 1995.

Abu J, Batuwangala M, Herbert K and Symonds P, *Retinoic acid and retinoid receptors: potential chemopreventive and therapeutic role in cervical cancer*. Lancet Oncol, 6: 712-20, 2005.

Aoyama Y, *Experimental studies on the effects of the combined use of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) and tamoxifen (TAM) for estrogen receptor (ER) negative breast cancer*. Kurume Med J, 49: 27-33, 2002.

Appierto V, Villani MG, Cavadini E, Lotan R, Vinson C and Formelli F, *Involvement of c-Fos in fenretinide-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells*. Cell Death Differ, 11: 270-79, 2004.

Barna G, Sebestyen A, Weischede S, Perak I, Mihalik R, Formelli F and Kopper L, *Different ways to induce apoptosis by fenretinide and all-trans-retinoic acid in human B lymphoma cells*. Anticancer Res, 25: 4179-85, 2005.

Batetta B, Mulas MF, Sanna F, Putzolu M, Bonatesta RR, Gasperi-Campani A, Roncuzzi L, Baiocchi D and Dessì S, *Role of cholesterol ester pathway in the control of cell cycle in human aortic smooth muscle cells*. FASEB J, 17: 746-48, 2003.

Bednarek A, Shilkaitis A, Green A, Lubet R, Kelloff G, Christov K and Aldaz CM, *Suppression of cell proliferation and telomerase activity in 4-(hydroxyphenyl)retinamide-treated mammary tumors*. Carcinogenesis, 20: 879-83, 1999.

Bender FC, Reymond MA, Bron C and Quest AFG, *Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity*. Cancer Res, 60: 5870-78, 2000.

Bist A, Fielding PE and Fielding CJ, *Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol*. Proc Natl Acad Sci USA, 94: 10693-98, 1997.

Boya P, Morales MC, Gonzales-Polo RA, Andreau K, Goudier I, Perfettini JL, Laroche N, Deniaud A, Baran-Marszak F, Fagard R, Feuillard J, Asumendi A, Raphael M, Pau B, Brenner C and Kroemer G, *The chemopreventive agent N-(4-hydroxyphenyl)retinamide induces apoptosis through a mitochondrial pathway regulated by proteins from the Bcl-2 family*. Oncogene, 22: 6220-30, 2003.

Bruno S, Tenca C, Saverino D, Ciccone E and Grossi CE, *Apoptosis of squamous cells at different stages of carcinogenesis following 4-HPR treatment*. Carcinogenesis, 23: 447-56, 2002.

- Camerini T, Mariani L, De Palo G, Marubini E, Di Mauro MG, Decensi A, Costa A and Veronesi U, *Safety of the synthetic retinoid fenretinide: long-term results from a controlled clinical trial for prevention of contralateral breast cancer*. J Clin Oncol, 15: 1664-70, 2001.
- Campbell L, Gumbleton M and Ritchie K, *Caveolae and the caveolins in human disease*. Adv Drug Del Rev, 49: 325-35, 2001.
- Campbell RM and DiGiovanna JJ, *Skin cancer chemoprevention with systemic retinoids: an adjunct in the management of selected high-risk patients*. Dermatol Ther, 19: 306-14, 2006.
- Capozza F, Williams TM, Schubert W, McClain S, Bouzahzah B, Sotgia F and Lisanti MP, *Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation*. Am J Pathol 162: 2029-39, 2003.
- Chakravarti A, Zhai G, Suzuki Y, Sarkesh S, Black PM, Muzikansky A, Loeffler JS, *The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas*. J Clin Oncol, 22: 1926-33, 2004.
- Chang C, Dong R, Miyazaki A, Sakashita N, Zhang Y, Liu J, Guo M, Li B and Chang T, *Human acyl-CoA:cholesterolAcyltransferase (ACAT) and its potential as a target for pharmaceutical intervention against atherosclerosis*. Acta Biochim Biophys Sin, 38: 151-56, 2006.
- Chen S, Samuel W, Fariss RN, Duncan T, Kutty RK and Wiggert B, *Differentiation of human retinal pigment epithelial cells into neuronal phenotype by N-(hydroxyphenyl) retinamide*. J Neurochem, 84: 972-81, 2003.
- Chen YR, Zhou G and Tan TH, *c-Jun N-terminal kinase mediates apoptotic signaling induced by N-(hydroxyphenyl) retinamide*. Mol Pharmacol, 56: 1271-79, 1999.
- Chiesa F, Tradati N, Grigolato R, Baracchi P, Biganzoli E, Crose N, Lovadini E, Formelli F, Costa L, Giardini R, Zurrada S, Costa A, De Palo G and Veronesi U, *Randomized trial of fenretinide (4-HPR) to prevent recurrences, new localizations and carcinomas in patients operated on for oral leukoplakia: Long-term results*. Int J Cancer, 115: 625-29, 2005.
- Chodak GW, Rukstalis D, Kellman HM and Williams M, *Phase II study of the retinoid analogue 4-HPR in men with carcinoma of the prostate*. J Urol, 149: 257, 1993.
- Clifford JL, Menter DG, Wang M, Lotan R and Lippman SM, *Retinoid receptor-dependent and -independent effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in F9 embryonal carcinoma cells*, Cancer Res, 59:14-18, 1999.
- Cohen AW, Hnasko R, Schubert W and Lisanti MP, *Role of caveolae and caveolins in health and disease*. Physiol Rev, 84: 1341-79, 2004.

Cohen AW, Razani B, Wang XB, Combs TP, Williams TM, Scherer PE and Lisanti MP, *Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285: C222-35, 2003.

Colombo N, Formelli F, Cantu MG, Parma G, Gasco M, Argusti A, Santinelli A, Montironi R, Cavadini E, Baglietto L, Guerrieri-Gonzaga A, Viale G and Decensi A, *A phase I-II preoperative biomarker trial of fenretinide in ascitic ovarian cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15: 1914-19, 2006.

Conley B, O'Shaughnessy J, Prindiville S, Lawrence J, Chow C, Jones E, Merino MJ, Kaiser-Kupfer MI, Caruso RC, Podgor M, Goldspiel B, Venzon D, Danforth D, Wu S, Noone M, Goldstein J, Cowan KH and Zujewski J, *Pilot trial of the safety, tolerability, and retinoid levels of N--(hydroxyphenyl) retinamide in combination with tamoxifen in patient at high risk for developing invasive breast cancer*. *J Clin Oncol*, 18: 275-83, 2000.

Conrad PA, Smart EJ, Ying YS, Anderson RGW and Bloom GS, *Caveolin cycles between the plasma membrane caveolae and the Golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps*. *J Cell Biol*, 131: 1421-33, 1996.

Corazzari M, Lovat PE, Oliviero S, Di Sano F, Donnorso RP, Redfern CPF and Piacentini M, *Fenretinide: a p53-independent way to kill cancer cells*, *Biochim Biophys Res Commun*, 331: 810- 15, 2005.

Costa A, Formelli F, Chiesa F, Decensi A, De Palo G and Veronesi U, *Prospects of chemoprevention of human cancers with the synthetic retinoid fenretinide*. *Cancer Res*, 54 :2032s-7s, 1994.

Costa A, Malone W, Perloff M, Buranelli F, Campa T, Dossena G, Magni A, Pizzichetta M, Andreoli C, Del Vecchio M, Formelli F, Barbieri A, *Tolerability of the synthetic retinoid Fenretinide (HPR)*. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 25: 805-8, 1989.

Couet J, Li Okamoto T, Ikezu T and Lisanti MO, *Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins*. *J Biol Chem*, 272: 6525-33, 1997.

Cui J, Rohr LR, Swanson G, Speights VO, Maxwell T and Brothman AR, *Hypermethylation of the caveolin-1 gene promoter in prostate cancer*. *Prostate*, 46: 249-56, 2001.

Darwiche N, Hatoum A, Ddaibo G, Kodara H, Nasr R, Adou-Lteif G, Bezzi R, Hermine O, de The H and Bezarbachi A, *N-(4-hydroxyphenyl)retinamide induces growth arrest and apoptosis in HTLV-I-transformed cells*. *Leukemia*, 18: 607-15, 2004.

De Palo G, Marubini L, Camerini T, Marubini E, Formelli F, Pasini B, Decensi A and Veronesi U, *Effect of fenretinide on ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 86: 24-27, 2002.

Decensi A, Johansson H, Miceli R, Mariani L, Camerini T, Cavadini E, Di Mauro MG, Barreca A, Gonzaga AG, Diani S, Sandri MT, De Palo G and Formelli F, *Long-term effects of fenretinide, a retinoic acid derivative, on the insulin-like growth factor system in women with breast cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev*, 10: 1047-53, 2001.

Decensi A, Torrisi R, Gozza A, Severi G, Bertelli G, Fontana V, Pensa F, Carozzo L, Traverso A, Milone S, Dini D and Costa A, *Effect of fenretinide on bone mineral density and metabolism in women with early breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 53: 145-51, 1999.

Delia D, Aiello A, Lombardi L, Pelicci PG, Grignani F, Formelli F, Menard S, Costa A, Veronesi U and Aerotti MA, *N-(4-hydroxyphenyl)retinamide induces apoptosis of malignant cell lines including those unresponsive to retinoic acid*. *Cancer Res*, 53: 6036-41, 1993.

Dessi S, Batetta B, Baiocchi B, Putzolu M, Roncuzzi L and Gasperi-Campani A, *Inhibition of cholesterol esterification in the control of leukemia proliferation in vitro*. 2007, in stampa.

Dessi S, Mulas MF, Sanna F, Putzolu M, Bonatesta RR, Roncuzzi L, Baiocchi D, Batetta B and Gasperi-Campani A, *Role of cholesterol esterification in the growth of leukemia cells in vitro*. *Proceed 94th Ann Meet AACR*, 44: 323-24, 2003.

Dietzen DJ, Hastings WR and Lublin DM, *Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues: palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae*. *J Biol Chem*, 270: 6838-42, 1995.

DiPietrantonio AM, Hsieh TC, Juan G, Traganos F, Darzynkiewicz Z and Wu JM, *Fenretinide-induced caspase 3 activity involves increased protein stability in a mechanism distinct from reactive oxygen species elevation*. *Cancer Res*, 60: 4331-35, 2000.

Engelman JA, Zhang XL and Lisanti MP, *Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1)*. *FEBS Lett*, 448: 221-30, 1999.

Faderl S, Lotan R, Kantajian HM, Harris D, Van Q and Estrov Z, *N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (fenretinide, 4-HPR) a retinoid compound with antileukemic and proapoptotic activity in acute lymphoblastic leukaemia (ALL)*. *Leuk Res*, 27: 259-66, 2003.

Fanjul AN, Delia D, Pierotti MA, Rideout D, Yu JQ, Pfahl M and Yu J, *N-(4-hydroxyphenyl) retinamide is a highly selective activator of retinoid receptors*. *J Biol Chem*, 271: 22441-46, 1996.

Favoni RE, de Cupis A, Bruno S, Yee D, Ferrara A, Pirani P, Costa A and Decensi A, *Modulation of the insulin-like growth factor-I system by 4-(hydroxyphenyl) retinamide in human breast cancer cell lines*. *Br J Cancer*, 77: 2138-47, 1998.

Ferrari N, Morini M, Pfeffer U, Minghelli S, Douglas MN and Albin A, *Inhibition of Kaposi's sarcoma in vivo by Fenretinide*. Clin Cancer Res, 9: 6020-29, 2003.

Fielding CJ and Fielding PE, *Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol*. Adv Drug Deliv Rev, 49: 251-64, 2001.

Fielding CJ, Bist A and Fielding PE, *Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers*. Proc Natl Acad Sci USA, 94: 3753-58, 1997.

Fine SW, Lisanti MP, Galbiati F, Li M, *Elevated expression of caveolin-1 in adenocarcinoma of the colon*. Am J Clin Pathol, 115: 719-24, 2001.

Fitzgerald ML, Morris AL, Chroni A, Mendez AJ, Zannis VI and Freeman MW, *ABCA1 and amphipathic apolipoprotein form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux*. J Lipid Res, 45: 287-94, 2004.

Follen M, Atkinson EN, Schottenfeld D, Malpica A, West L, Lippman S, Zou C, Hittelman WN, Lotan R and Hong WK, *A randomized clinical trial of 4-hydroxyphenylretinamide for high-grade squamous intraepithelial lesions of cervix*. Clin Cancer Res, 7: 3356-65, 2001.

Fontana JA and Rishi AK, *Classical and novel retinoids: Their targets in cancer therapy*. Leukemia, 16: 463-72, 2002.

Formelli F, Camerini T, Cavadini E, Appierto V, Villani MG, Costa A, De Palo G, DiMauro MG and Veronesi U, *Fenretinide breast cancer prevention trial: drug and retinol plasma levels in relation to age and disease outcome*. Cancer Epidem Biom Prev, 12: 34-41, 2003.

Formelli F, Carsana R, Costa A, Buranelli F, Campa T, Dossena G, Magni A and Pizzichetta M, *Plasma retinol level reduction by the synthetic retinoid fenretinide: a one year follow-up study of breast cancer patients*. Cancer Res, 49: 6149-52, 1989.

Fra AM, Williamson E, Simons K and Parton RG, *De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin*. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 8655-59, 1995.

Frank PG, Lee H, Park DS, Tandon NN, Scherer PE and Lisanti MP, *Genetic ablation of caveolin-1 confers protection against atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 24: 98-105, 2004.

Frank PG, Pedraza A, Choen DE and Lisanti MP, *Adenovirus-mediated expression of caveolin-1 in mouse liver increase plasma high-density lipoprotein levels*. Biochemistry, 40: 10892-900, 2001.

Galbiati F, Engelman JA, Volonte D, Zhang XL, Minetti C, Li M, Hou H Jr, Kneitz B, Edelmann W and Lisanti MP, *Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and T-tubule abnormalities*. J Biol Chem 276: 21425-33, 2001a.

Galbiati F, Volonte D, Liu J, Capozza F, Frank PG, Zhu L, Pestell RG and Lisanti MP, *Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G0/G1 arrest via a p53/p21 (WAF1/Cip1)-dependent mechanism*. Mol Biol Cell, 12: 2229-44, 2001b.

Garaventa A, Luksch R, Lo Piccolo MS, Cavadini E, Montaldo PG, Pizzitola MR, Boni L, Ponzoni M, Decensi A, De Bernardi B, Fossati Bellani F and Formelli F, *Phase I trial and pharmacokinetics of fenretinide in children with neuroblastoma*. Clin Cancer Res, 9: 2032-39, 2003.

Garrean S, Gao XP, Brovkovich V, Shimizu J, Zhao YY, Vogel SM and Malik AB, *Caveolin-1 regulates NF-kappaB activation and lung inflammatory response to sepsis induced by lipopolysaccharide*. J Immunol 177: 4853-60, 2006.

Gasperi-Campani A, Baiocchi D, Brognara I, Cocchi S and Roncuzzi L, *Growth suppressive effect and apoptosis induction by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in human osteosarcoma cells in vitro*. Eur J Cancer, 38, Suppl. 7, S110, 2002.

Gasperi-Campani A, Baiocchi D, Marti G, Rossi AML and Roncuzzi L, *Caveolin-1 as a novel target of therapeutic activity of Fenretinide in osteosarcoma and glioblastoma in vitro*. Proc 97th Ann Meet AACR, 47:1291, 2006.

Gaudreault SB, Dea D and Poirier J, *Increased caveolin-1 expression in Alzheimer's disease brain*. Neurobiol Aging, 25: 753-59, 2004.

Glenney JR Jr, *Tyrosine phosphorylation of a 22-KDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus*. J Biol Chem, 264: 20163-20, 1989.

Gopal AK, Pagel JM, Hedin N and Press OW, *Fenretinide enhances rituximab-induced cytotoxicity against B-cell lymphoma xenograft through a caspase-dependent mechanism*. Blood, 103: 3516-20, 2003.

Guerrieri-Gonzaga A, Robertson C, Bonanni B, Serrano D, Cazzaniga M, Mora S, Gulisano M, Johansson H, Formelli F, Intra M, Latronico A, Franchi D, Pelosi G, Johnson K and Decensi A, *Preliminary results on safety and activity of a randomized, double-blind, 2x2 trial of low-dose tamoxifen and fenretinide for breast cancer prevention in premenopausal women*. J Clin Oncol, 24: 129-35, 2006.

Gustavsson J, Parpal S, Karlsson M, Ramsing C, Thorn H, Borg M, Lindroth M, Peterson KH, Magnusson KE and Stralfors P, *Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane*. FASEB J, 13: 1961-71, 1999.

Hail N Jr, Kim H J and Lotan R, *Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis*. Apoptosis, 11; 1677-94, 2006.

- Han SE, Park KH, Lee G, Huh YJ, Min BM, *Mutation and aberrant expression of Caveolin-1 in human oral squamous cell carcinomas and oral cancer cell lines*. Int J Oncol, 24: 435-40, 2004.
- Hassan GS, Jasmin JF, Schubert W, Frank PG and Lisanti MP, *Caveolin-1 deficiency stimulates neointima formation during vascular injury*. Biochemistry, 43: 8312-21, 2004.
- Hayashi K, Matsuda S, Machida K, Yamamoto T, Fukuda Y, Nimura Y, Hayakawa T and Hamaguchi M, *Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancer*. Cancer Res, 61: 2361-64, 2001.
- Herbert BS, Sanders BG and Kline K, *N-4-(hydroxyphenyl) retinamide activation of transforming growth factor-beta and induction of apoptosis in human breast cancer cells*. Nutrit Cancer, 34: 121-32, 1999.
- Hsieh T and Wu JM, *Apoptosis and restriction of G₁/S cell cycle by fenretinide in Burkitt's lymphoma Mutu I cell line accessed with bcl-6 down-regulation*. Biochem Biophys Res Commun 276: 1295-301, 2000.
- Hulit J, Bash T, Fu M, Galbiati F, Albanese C, Sage DR, Schlegel A, Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Lisanti MP and Pestell RG, *The cyclin D1 gene is transcriptionally repressed by Caveolin-1*. J Biol Chem, 275: 21203-09, 2000.
- Hultin TA, Filla MS and McCormick DL, *Distribution and metabolism of the retinoid, N-(4-methoxyphenyl)-all-trans -retinamide, the major metabolite of N-(N-4-hydroxyphenyl)-all-trans -retinamide, in the female mice*. Drug Metabol Disposit, 18: 175-79, 1990.
- Hultin TA, May CM and Moon RC, *N-(4-hydroxyphenyl)-all-trans-retinamide pharmacokinetics in female rats and mice*. Drug Metabol Disposit, 14: 714-17, 1986.
- Ito Y, Yoshida H, Nakano K, Kobayashi K, Yokozawa T, Hirai K, Matsuzuka F, Matsuura N, Kakudo K, Kuma K and Miyauchi A, *Caveolin-1 overexpression is an early event in the progression of papillary carcinoma of the thyroid*. Br J Cancer, 86: 912-16, 2002.
- Jinno H, Steiner MG, Metha RG, Osborne MP and Telang NT, *Inhibition of aberrant proliferation and induction of apoptosis in HER-2/neu oncogene transformed human mammary epithelial cells by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide*. Carcinogenesis, 20: 229-36, 1999.
- Kang M, Chung YH, Hwang C, Murata M, Fujimoto T, Mook-Jung I, Cha CI and Park W, *Caveolin-1 upregulation in senescent neurons alters amyloid precursor protein processing*. Exper Mol Med, 38: 126-33, 2006.
- Kato K, Hida M, Miyamoto M, Hashida H, Shinohara T, Itoh T, Okushiba S, Kondo S and Katoh H, *Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage*. Cancer, 94: 929-33, 2002.

Kato T, Miyamoto M, Kato K, Cho Y, Itoh T, Morikawa T, Okushiba S, Kondo S, Ohbuchi T and Katoh H, *Difference of caveolin-1 expression pattern in human lung neoplastic tissue. Atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma and squamous cell carcinoma.* Cancer Lett, 214 : 121-28, 2004.

Kim HG, Yamal JM, Xu XC, Hu W, Boiko I, Linares A, Vlastos AT, Atkinson EN, Malpica A, Hittelman WN and Follen M, *Cervical chromosome 9 polysomy: validation and use as a surrogate endpoint biomarker in a 4-HPR chemoprevention trial.* Gynecol Oncol, 99: S32-7, 2005.

Kim HJ, Chakravarti N, Oridate N, Choe C, Claret FX and Lotan R, *N-(hydroxyphenyl) retinamide-induced apoptosis triggered by reactive oxygen species is mediated by activation of MAPKs in head and neck squamous carcinoma cells.* Oncogene, 25: 2785-94, 2005.

Kurie J, Lee JS, Khuri FR, Mao L, Morice RC, Lee JJ, Walsh GL, Broxson A, Lippman SM, Ro JY, Kemp BL, Liu D, Fritsche HA, Xu X, Lotan R and Hong WK, *N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in the chemoprevention of squamous metaplasia and dysplasia of oral bronchial epithelium.* Clin Cancer Res, 6: 2973-79, 2000.

Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M and Simons K, *VIP 21, a 21-KD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles.* L Cell Biol, 118: 1003-14, 1992.

Li L, Ren CH, Tahir SA, Ren C and Thompson TC, *Caveolin-1 maintains activated Akt in prostate cancer cells through scaffolding domain binding site interaction with and inhibition of serine/threonine protein phosphatase PP1 and PP2A.* Mol Cel Biol, 23: 9389-404, 2003.

Li L, Yang S, Ebara S, Satoh T, Nasu Y, Timme TL, Ren C, Wang J, Tahir SA and Thompson TC, *Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells.* Cancer Res, 61: 4386-92, 2001.

Li S, Couet MP and Lisanti MP, *Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases.* J Biol Chem 271: 29182-90, 1996.

Li S, Okamoto T and Chun M, *Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin.* J Biol Chem, 126: 111-26, 1995.

Li Y, Dowbenko D and Lasky LA, *AKT/PKB phosphorylation of p21 Cip/WAF1 enhances protein stability of p21 Cip/WAF1 and promotes cell survival.* J Biol Chem, 277: 11352-61, 2002.

Lippman SM, Lee JJ, Martin JM, El-Naggar AK, Xu X, Shin DM, Thomas M, Mao L, Fritsche HA, Zhou X, Papadimitrakopoulou V, Tran H, Clayman GL, Hittelman WN, Hong WK and Lotan R, *Fenretinide activity in retinoid-resistant oral leukoplakia*. Clin Cancer Res, 15: 3109-14, 2006.

Lisanti MP, Sargiacomo M and Scherer PE, *Purification of caveolae-derived membrane microdomains containing lipid-anchored signaling molecules, such as GPI-anchored proteins, H-Ras, Src-family tyrosine kinases, eNOS, and G-protein alpha-, beta-, and gamma-subunits*. Methods Mol Biol, 116: 51-60, 1999.

Lisanti MP, Scherer PE, Tang ZL and Sargiacomo M, *Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis*. Trends Cell Biol, 4: 231-35, 1994.

Liu G, Wu M, Leui G and Ferrari N, *Inhibition of cancer cell growth by all-trans retinoic acid and its analog N-(4-hydroxyphenyl) retinamide: a possible mechanism of action via regulation of retinoid receptors expression*. Int J Cancer, 78: 248-54, 1998.

Liu J, Lee P, Galbiati F, Kitsis RN and Lisanti MP, *Caveolin-1 expression sensitizes fibroblastic and epithelial cells to apoptotic stimulation*. Am J Physiol Cell Physiol, 280: C 823-35, 2001.

Liu J, Wang XB, Park DS and Lisanti MP, *Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation*. J Biol Chem, 277: 10661-68, 2002.

Lovat PE, Di Sano F, Corazzari M, Fazi B, Donnorso RP, Pearson AD, Hall AG, Redfern CP and Piacentini M, *Gangliosides link the acidic sphingomyelinase-mediated induction of ceramide to 12-lipoxygenase-dependent apoptosis of neuroblastoma in response to fenretinide*. J Natl Cancer Inst, 96: 1288-99, 2004.

Lovat PE, Oliviero S, Corazzari M, Rodolfo M, Ranalli B, Goranov B, Melino G, Redfern CPF and Piacentini M, *Bak: a downstream mediator of fenretinide-induced apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells*. Cancer Res, 63: 7310-13, 2003b.

Lovat PE, Ranalli M, Corazzari M, Raffaghello L, Pearson ADJ, Ponzoni M, Piacentini M, Melino G and Redfern CPF, *Mechanisms of free-radical induction in relation to fenretinide-induced apoptosis of neuroblastoma*. J Cell Biochem, 89: 698-708, 2003a.

Maurer B, Metelitsa L, Seeger R, Cabot M and Reynolds C, *Increased of ceramide and induction of mixed apoptosis/necrosis by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in neuroblastoma cell lines*. J Natl Cancer Inst, 91: 1138-46, 1999.

McCormick DL, Bagg BJ and Hultin TA, *Comparative activity of dietary or topical exposure to three retinoids in the promotion of skin tumor induction in mice*. Cancer Res, 47: 5989-93, 1987.

Mehta RR, Hawthorne ME, Graves JM and Mehta RG, *Metabolism of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) may serve as a biomarker for its efficacy against breast cancer and melanoma cells*. Eur J Cancer, 34: 902-07, 1998.

Merritt G, Aliprandis ET, Prada F, Rigas B and Kashfi K, *The retinoid fenretinide inhibits proliferation and downregulates cyclooxygenase-2 gene expression in human colon adenocarcinoma cell lines*. Cancer Lett, 164: 15-23, 2001.

Moglia D, Formelli F, Baliva G, Bono A, Accetturi M, Nava M and De Palo G, *Effects of topical treatment with fenretinide (4-HPR) and plasma vitamin A levels in patients with actinic keratoses*. Cancer Lett, 110: 87-91, 1996.

Moon RC, Thompson HJ, Becci PJ, Grubbs CJ, Gander RJ, Newton DL; Smith JM, Phillips SL, Henderson WR, Mullen LT, Brown CC and Sporn MB, *N-(4-hydroxyphenyl)retinamide, a new retinoid for the prevention of breast cancer in the rat*. Cancer Res, 39: 1339-46, 1979.

Murata M, Peranen J, Schreiner R, Weiland F, Kurzchalia T and Simons K, *VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein*. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 10339-43, 1995.

Norkin LC, *Caveolae in the uptake and targeting of infectious agents and secreted toxins*. Adv Drug Deliv Rev, 49: 301-15, 2001.

Okamoto T, Schelegel A, Scherer PE and Lisanti MP, *Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane*. J Biol Chem, 273: 5419-22, 1998.

Orlowski S, Martin S and Escargueil A, *P-glycoprotein and "lipid rafts": some ambiguous mutual relationships (floating on them, building them or meeting them by chance?)*. Cell Mol Life Sci, 63: 1038-59, 2006.

Oson S, Hosoi H, Kuwahara Y, Matsumoto Y, Iehara T and Sugimoto T, *Fenretinide induces sustained-activation of JNK/p38 MAPK and apoptosis in a reactive oxygen species-dependent manner in neuroblastoma cells*. Int J Cancer, 112: 219-24, 2004.

Pagnan G, Caridi G, Montaldo PG, Bado M, Chiesa V, Allen TM and Ponzoni M, *Apoptosis of human neuroblastoma cells induced by liposoma-capsulated fenretinide*. J Liposome Res, 8: 401-23, 1998.

Palade GE, *Fine structure of blood capillaries*. J Appl Physiol, 24:1424-36, 1953.

Panigone S, Debernardi S, Taya Y, Fontanella E, Airoidi R and Delia D, *pRb and Cdk regulation by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide*. Oncogene, 19:4035-41, 2000.

Parpal S, Karlsson M, Thorn H and Stralfors P, *Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control*. J Biol Chem 276: 9670-78, 2001.

Paulson JD, Oldham JW, Preston RF, Newman D, *Lack of genotoxicity of the cancer chemopreventive agent N-(4-hydroxyphenyl) retinamide*. Fundam Appl Toxicol, 5:44-50, 1985.

Pienta KJ, Nguyen NM and Lehr JE, *Treatment of prostate cancer in the rat with the synthetic retinoid fenretinide*. Cancer Res, 53: 224-26, 1993.

Podar K, Tai YT, Cole CE, Hideshima T, Sattler M, Hamblin A, Mitsiades N, Schlossman RL, Davies FE, Morgan GJ, Munshi NC, Chauhan D and Anderson KC, *Essential role of caveolae in interleukin-6-and insulin-like growth factor I-triggered Akt-1-mediated survival of multiple myeloma cells*. J Biol Chem, 278: 5794-801, 2003.

Puduvalli VK, Li JT, Chen L and McCutcheon IE, *Induction of apoptosis in primary meningioma cultures by fenretinide*. Cancer Res, 65: 1547-53, 2005.

Puduvalli VK, Saito Y, Xu R, Kouraklis GP, Levin VA and Kyritsis AP, *Fenretinide activates caspases and induces apoptosis in gliomas*. Clin Cancer Res, 5: 2230-2235, 1999.

Puduvalli VK, Yung WK, Hess KR, Kuhn JG, Groves MD, Levin VA, Zwiebel J, Chang SM, Cloughesy TF, Junck L, Wen P, Lieberman F, Conrad CA, Gilbert MR, Meyers CA, Liu V, Mehta MP, Nicholas MK and Prados M, *Phase II study of Fenretinide (NSC 374551) in adults with recurrent malignant gliomas: a north american brain tumor consortium study*. J Clin Oncol, 22: 4282-89, 2004.

Quest A, Leyton L and Parraga M, *Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease* 1,2. Biochem Cell Biol, 82: 129-40, 2004.

Rajjayabun PH, Garg S, Durkan GC, Charlton R, Robinson MC and Mellon JK, *Caveolin-1 expression is associated with high-grade bladder cancer*. Urology, 58: 811-14, 2001.

Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG, Di Vizio D, Hou H Jr, Kneitz B, Lagand G, Christ GJ, Edelman W and Lisanti MP, *Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities*. J Biol Chem, 276: 38121-38, 2001.

Razani B, Woodman SE and Lisanti MP, *Caveolae: from cell biology to animal physiology*, Pharmacological Rev, 54: 431-67, 2002.

Ribatti D, Raffaghello L, Marimpietri D, Cosimo E, Montaldo PG, Nico B, Vacca A and Ponzoni M, *Fenretinide as an anti-angiogenic agent in neuroblastoma*. Cancer Lett, 197: 181-84, 2003.

Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR and Anderson RGW, *Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats*. Cell, 68: 673-82, 1992.

Sabichi AI, Hendricks DT, Bober MA and Birrer MJ, *Retinoic acid beta expression and growth inhibition of gynecological cancer cells by the synthetic retinoid analog N-(4-hydroxyphenyl) retinamide*. J Natl Cancer Inst, 90: 597-605, 1998.

Satoh T, Yang G, Egawa S, Addai J, Frolov A, Kuwao S, Timme TL, Baba S and Thompson TC, *Caveolin-1 expression is a predictor of recurrence-free survival in pT2N0 prostate carcinoma diagnosed in Japanese patients*. *Cancer*, 97: 1225-33, 2003.

Scherer PE, Lisanti MP, Baldini G, Sargiacomo M, Corley-Mastick C and Lodish HF, *Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT 4 with caveolin-rich vesicles*. *J Cell Biol*, 127: 1233-43, 1994.

Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF and Lisanti MP, *Identification, sequence and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 131-35, 1996.

Schlegel A and Lisanti MP, *A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo*. *J Biol Chem* 275: 21605-17, 2000.

Schlegel A and Lisanti MP, *The caveolin triad: caveolae biogenesis, cholesterol trafficking, and signal transduction*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 12: 41-51, 2001.

Schlegel A, Pestell RG and Lisanti MP, *Caveolins in cholesterol trafficking and signal transduction: implications for human disease*. *Front Biosc*, 5: 929-37, 2000.

Schnitzer JE, Oh P, Pinney E and Allard J, *Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules*. *J Cell Biol*, 127: 1217-32, 1994.

Schwencke C, Braun-Dullaeus RC, Wunderlich C and Strasser RH, *Caveolae and caveolin in transmembrane signaling: implications for human disease*. *Cardiovascular Res*, 70: 42-49, 2006.

Serrano D, Baglietto L, Johansson H, Mariette F, Torrisi R, Onetto M, Paganuzzi M and Decensi A, *Effect of the synthetic retinoid fenretinide on circulating free prostate-specific antigen, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding protein-3 levels in men with superficial bladder cancer*. *Clin Cancer Res*, 11: 2083-88, 2005.

Shack S, Wang XT, Kokkonen GC, Gorospe M, Longo DL and Holbrook NJ, *Caveolin-induced activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway increases arsenite cytotoxicity*. *Mol Cell Biol*, 23: 2407-14, 2003.

Shaul PW and Anderson RGW, *Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction*. *Am J Physiol*, 275: L843-51, 1998.

Sheikh MS, Shao ZM, Li XS, Ordonez JV, Conley BA, Wu S, Dawson MI, Han QX, Chao WR, Quick T, Niles RM and Fontana JA, *N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR)- mediated biological actions involve retinoid receptor-independent pathways in human breast carcinoma*. *Carcinogenesis*. 16: 2477-86, 1995.

- Shen JC, Wang TT, Chang S and Hursting SD, *Mechanistic studies of the effects of the retinoid N-(4-hydroxyphenyl) retinamide on prostate cancer cell growth and apoptosis*. Mol Carcinog, 24: 160-68, 1999.
- Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Kishi M and Konishi N, *Requirement of c-jun for testosterone-induced sensitization to N-(4-hydroxyphenyl) retinamid-induced apoptosis*. Mol Carcinogen, 36: 115-22, 2003.
- Shishodia S, Gytierrez AM, Lotan R and Aggarwal BB, *N-(4-hydroxyphenyl)retinamide inhibits invasion, suppresses osteoclastogenesis, and potentiates apoptosis through down-regulation of I(kappa)B(alpha) kinase and nuclear factor-kappaB-regulated gene products*, Cancer Res, 65: 9555-65, 2005.
- Simeone AM and Tari AM, *How retinoids regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis*. Cell Mol Life Sci, 61: 1475-84, 2004.
- Simeone AM, Broemeling LD; Rosenblum J and Tari AM, *HER2/neu reduces the apoptotic effects of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) in breast cancer cells by decreasing nitric oxide production*. Oncogene, 22:6739-47, 2003.
- Simeone AM, Colella S, Krahe R, Johnson MM, Mora E and Tari AM, *N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and nitric oxide pro-drugs exhibit apoptotic and anti-invasive effects against bone metastatic breast cancer cells*. Carcinogenesis, 27: 568-77, 2006.
- Simeone AM, Ekmekcioglu S, Broemling JD, Grimm EA and Tari AM, *A novel mechanism by which N-(4-hydroxyphenyl) retinamide inhibits breast cancer cell growth: the production of nitric oxide*. Mol Cancer Ther, 1: 1009-17, 2002.
- Simionescu N, Simionescu M and Palade GE, *Permeabilità of muscle capillaries to small heme-peptides: evidence for the existence of patent transendothelial channels*. J Cell Biol, 64: 586-607, 1975.
- Sloan EK, Stanley KL and Anderson RL, *Caveolin-1 inhibits breast cancer growth and metastasis*. Oncogene, 23: 7893-97, 2004.
- Smith RM, Harada S, Smith JA, Zhang S, Jarett L, *Insulin-induced protein tyrosine phosphorylation cascade and signalling molecules are localized in a caveolin-enriched cell membrane domain*. Cell Signal 10: 355-62, 1998.
- Song KS, Sargiacomo M, Galbiati F, Parenti M and Lisanti MP, *Targeting of a G alpha subunit (G_{i1} alpha) and c-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: clarifying the role of N-myristoylation*. Cell Mol Biol, 43: 293-303, 1997.
- Soria JC, Moon C, Wang L, Hittelman WN, Jang JC, Sun SY, Lee JJ, Liu D, Kurie LM, Morice RC, Lee JS, Hong WK and Mao L, *Effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide on hTERT expression in the bronchial epithelium of cigarette smokers*, J Natl Cancer Inst, 93: 1257-63, 2001.

- Springer LN and Stewart BW, *N-(4-hydroxyphenyl) retinamide-induced death in human lymphoblastoid cells: 50kb DNA breakage as a means of distinguishing apoptosis from necrosis*. *Cancer Lett*, 128:189-96, 1998.
- Sun SY and Lotan R, *Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 41: 41-55, 2002.
- Sun SY, Schroeder CP, Yue P, Lotan D, Hong WK and Lotan R, *Enhanced growth inhibition and apoptosis induction in NSCLC cell lines by combination of celecoxib and 4-HPR at clinically relevant concentrations*. *Cancer Biol Ther*, 4: 407-13, 2005.
- Supino R, Crosti M, Clerici M, Walters A, Cleris L, Zumino F and Formelli F, *Induction of apoptosis by fenretinide (4HPR) in human ovarian carcinoma cells and its association with retinoic acid receptor expression*. *Int J Cancer*, 65:491-7,1996.
- Suzuoki M, Miyamoto M, Kato K, Hiraoka K, Oshikiri T, Nakakubo Y, Fukunaga A, Shichinohe T, Shinohara T, Itoh T, Kondo S and Katoh H, *Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Br J Cancer*, 87:1140-44, 2002.
- Swanson BN, Zaharevitz DW and Sporn MB, *Pharmacokinetics of N-4-hydroxyphenyl-all-trans-retinamide in rats*. *Drug Metabol Disposit*, 8: 168-72, 1980.
- Tahir SA, Yang G, Ebara S, Timme TL, Satoh T, Li L, Goltsov A, Ittmann M, Morrisett JD and Thompson TC, *Secreted caveolin-1 stimulated cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer*. *Cancer Res*, 61: 3882-85, 2001.
- Tang Z, Okamoto T, Boontrakulpoontawee P, Katada T, Otsuka AJ and Lisanti MP, *Identification, sequence, and expression of an invertebrate caveolin gene family from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Implication for the molecular evolution of mammalian caveolin genes*. *J Biol Chem* 272: 2437-45, 1997.
- Tang ZL, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF and Lisanti MP, *Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle*. *J Biol Chem*, 271: 2255-61, 1996.
- Tari AM, Simeone AM, Li YJ, Gutierrez-Puente Y, Lai S and Symmans WF, *Cyclooxygenase-2 protein reduces tamoxifen and N-(4-hydroxyphenyl)retinamide inhibitory effects in breast cancer cells*. *Lab Invest*, 85: 1357-67, 2005.
- Thaller C, Shalev M, Frolov A, Eichele G, Thompson TC, Williams RH, Dilliogluligil O and Kadmon D, *Fenretinide therapy in prostate cancer: effects on tissue and serum retinoid concentration*. *J Clin Oncol*, 15: 3804-8, 2000.
- Thyberg J, *Differences in caveolae dynamics in vascular smooth muscle cells of different phenotypes*. *Lab Invest*, 80: 915-29, 2000.

- Tiwari M, Kumar A, Sinha RA, Shrivastava A, Balapure AK, Sharma R, Bajpai VK, Mitra K, Babu S and Godbole MM, *Mechanism of 4-HPR-induced apoptosis in glioma cells: evidences suggesting role of mitochondrial-mediated pathway and endoplasmic reticulum stress*. *Carcinogenesis*, 27: 2047-58, 2006.
- Torrise R, Mezzetti M, Johansson H, Barreca A, Pigatto F, Robertson C, Decensi A, *Time course of fenretinide-induced modulation of circulating insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II and IGF-III in a bladder cancer chemoprevention trial*. *Int J Cancer*, 15: 87: 601-5, 2000.
- Uittenbogaard A, Ying Y and Smart EJ, *Characterization of a cytosolic heat-shock protein – caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking*. *J Biol Chem*, 273: 6525-32, 1998.
- Ulukaya E, Kurt A and Wood EJ, *N-(4-hydroxyphenyl)retinamide can selectively induce apoptosis in human epidermoid carcinoma cells but not in normal dermal fibroblasts*. *Cancer Invest*, 19: 145-54, 2001.
- Ulukaya E, Pirianov G, Kurt MA, Wood EJ and Mehmet H, *Fenretinide induces cytochrome c release, caspase 9 activation and apoptosis in the absence of mitochondrial membrane depolarisation*. *Cell Death Differ*, 10: 856-59, 2003.
- Um SJ, Lee SY, Kim EJ, Han HS, Koh YM, Hong KJ, Sin HS and Park JS, *Antiproliferative mechanism of retinoid derivatives in ovarian cancer cells*. *Cancer Lett*, 174: 127-34, 2001.
- Urban D, Myers R, Manne U, Weiss H, Mohler J, Perkins D, Markiewicz M, Lieberman R, Kelloff G, Marshall M and Grizzle W, *Evaluation of biomarker modulation by fenretinide in prostate cancer patients*. *Eur Urol*, 35: 429-38, 1999.
- Vaccari M, Silingardi P, Argnani A, Horn W, Giunti M, Mascolo MG, Grilli S and Colacci A, *In vitro effects of fenretinide on cell-matrix interactions*. *Anticancer Res*, 20: 3059-66, 2000.
- Vaishampayan U, Heilbrun LK, Parchment RE, Jain V, Zwiebel J, Boinpally RR, LoRusso P and Hussain M, *Phase II trial of fenretinide in advanced renal carcinoma*. *Invest New Drug*, 23: 179-85, 2005.
- Veronesi U, De Palo G, Marubini E, Costa A, Formelli F, Mariani L, Decensi A, Camerini T, Rosselli Del Turco M, Di Mauro MG, Muraca MG, Del Vecchio M, Pinto C, D'Aiuto G, Boni C, Campa T, Magni A, Miceli R, Perloff M, Malone WF and Sporn MB, *Randomized trial of fenretinide to prevent second breast malignancy in women with early breast cancer*. *J Natl Cancer Inst* 91: 1847-1856, 1999.
- Veronesi U, Mariani L, Decensi A, Formelli F, Camerini T, Miceli R, Di Mauro MG, Costa A, Marubini E, Sporn MB and De Palo G, *Fifteen-year results of a randomized phase III trial of fenretinide to prevent second breast cancer*. *Ann Oncol*, 17: 1065-71, 2006.

Villablanca JG, Krailo MD, Ames MM, Reid JM, Reaman GH and Reynolds CP, *Phase I trial of oral fenretinide in children with high-risk solid tumors: a report from the children's oncology group (CCG 09709)*. J Clin Oncol, 24: 4223, 2006.

Villani MG, Appierto V, Cavadini E, Valsecchi M, Sonnini S, Curley RW and Formelli F, *Identification of the fenretinide metabolite 4-oxo-fenretinide present in human plasma and formed in human ovarian carcinoma cells through induction of cytochrome P450 26A1*. Clin Cancer Res, 15: 6265-75, 2004.

Vivat-Hannah V and Zusi FC, *Retinoids as therapeutic agents: today and tomorrow*. Mini Rev in Med Chem, 5: 755-60, 2005.

Volonte D, Galbiati F, Pestell RG and Lisanti MP, *Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1(Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress*. J Biol Chem, 276: 8094-103, 2001.

Wang XM, Kim HP, Song R and Choi AMK, *Caveolin-1 confers anti-inflammatory effects in murine macrophages via the MKK3/p38 MAPK pathway*. Am J Respir Cell Mol Biol, 34: 434-442, 2006.

Wiechen K, Diatchenko L, Agoulnik A, Scharff KM, Scharff KM, Schober H, Arlt K, Zhumabayeva B, Siebert PD, Dietel M, Schafer R and Sers C, *Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene*. Am J Pathol, 159: 1635-43, 2001a.

Wiechen K, Sers C, Agoulnik A, Dietel M, Schlag PM, Schneider U, *Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas*. Am J Pathol, 158:833-39, 2001b.

Williams TM and Lisanti MP, *Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis*. Am J Physiol Cell Physiol, 288: C494-506, 2005.

Williams TM and Lisanti MP, *The Caveolin genes: from cell biology to medicine*. Ann Med 36: 584-95, 2004.

Williams TM, Hassan GS, Cohen AW, Medina F, Frank PG, Pestell RG, Di Vizio D, Leda M and Lisanti MP, *Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced tumor development in tramp mice*. J Biol Chem, 280:25134-45, 2005.

Williams TM, Lee H, Cheung MWC, Cohen AW, Razani B, Iyengar P, Scherer PE, Pestell RG and Lisanti MP, *Combined loss of INK4a and Caveolin-1 synergistically enhances cell proliferation and oncogene-induced tumorigenesis*. J Biol Chem, 279: 24745-56, 2004.

Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, Park SH, Nasu Y, Bangma CH, Kattan MW, Scardino PT and Thompson TC, *Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer*. Clin Cancer Res, 4: 1873-80, 1998.

Yang G, Truong LD, Wheeler TM and Thompson TC, *Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker*. *Cancer Res*, 59: 5719-23, 1999.

Yokoyama S, *ABCA1 and biogenesis of HDL*. *J Atheroscler Thromb*, 13: 1-15, 2006.

You KR, Shin MN, Park RK, Lee SO and Kim DG, *Activation of caspase-8 during N-(hydroxyphenyl) retinamide-induced apoptosis in Fas-defective hepatoma cells*. *Hepatology*, 34: 1119-27, 2001.

Zanardi S, Serrano D, Argusti A, Barile M, Puntoni A and Decensi A, *Clinical trials with retinoids for breast cancer chemoprevention*. *Endocr Rel cancer*, 13: 51-68, 2006.

Zundel W, Swiersz LM and Giaccia A, *Caveolin-1 mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide*. *Mol Cell Biol*, 20: 1507-14, 2000.