
Alma Mater Studiorum – Università' di Bologna

**Dottorato di Ricerca in Scienze dello Sviluppo
e del Movimento Umano**

Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D3

Settore Scientifico disciplinare: MED/06

**Valutazione del ruolo dell'espressione di IRS-1
nel differenziamento osteoblastico di cellule di
osteosarcoma ed MSCs**

Presentata da Clara Contaldo

Coordinatore del Dottorato

Chiar.ma Prof.ssa Elisabetta Caramelli

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa Cinzia Zucchini

Correlatore

Chiar.ma Prof.ssa Katia Scotlandi

Esame finale anno 2013

Abstract

L'osteosarcoma (OS) è il tumore primitivo dell'osso più comune in età pediatrica e adolescenziale. L'OS è stato recentemente riconsiderato come una patologia da de-differenziamento, legata all'interruzione del processo cui vanno incontro i precursori osteoblastici, quali le cellule staminali mesenchimali (MSCs), per trasformarsi in osteoblasti maturi.

Il sistema IGF è coinvolto nella regolazione della proliferazione e del differenziamento di cellule di OS. IRS-1 è un mediatore critico di tale via di segnalazione e il suo livello di espressione modula il differenziamento di cellule ematopoietiche. Lo scopo di questa tesi è stato quello di definire il ruolo di IRS-1 nel differenziamento osteoblastico di MSCs e cellule di OS. Il potenziale differenziativo di cellule di OS umano e murino e di MSCs derivate da midollo osseo è stato valutato tramite Alizarin Red staining e Real Time-PCR. Dai dati ottenuti è emerso come i livelli di espressione di IRS-1 diminuiscano durante il differenziamento osteoblastico. Conseguentemente, i livelli di espressione di IRS-1 sono stati manipolati utilizzando shRNA per down-regolare l'espressione della proteina o un plasmide per sovra-esprimerla. Sia la down-regolazione sia la sovra-espressione di IRS-1 hanno inibito il differenziamento osteoblastico delle linee cellulari considerate. Allo scopo di valutare il contributo di IRS-1 nella via di segnalazione di IGF-1R è stato utilizzato l'inibitore di tale recettore, α IR-3. Anche in questo caso è stata osservata una riduzione della capacità differenziativa. L'inibitore del proteasoma MG-132 ha portato ad un aumento dei livelli di IRS-1, portando nuovamente all'inibizione del differenziamento osteoblastico e suggerendo che l'ubiquitinazione di questa proteina potrebbe avere un ruolo importante nel mantenimento di appropriati livelli di espressione di IRS-1. I risultati ottenuti indicano la criticità dei livelli di espressione di IRS-1 nella determinazione della capacità differenziativa sia di cellule di OS umano e murino, sia delle MSCs.

Abstract

Osteosarcoma (OS) is the most common primary malignant bone tumor affecting children and adolescents. OS has recently been re-considered as a differentiation disease, caused by genetic and epigenetic alterations which may impair normal bone development by blocking multipotent mesenchymal stem cell (MSCs) differentiation into osteoblasts. The IGF-system is involved in regulating OS cell proliferation and differentiation. IRS-1 is a critical mediator of IGF-1R signaling and its expression level modulates hematopoietic cell differentiation. The aim of this study is to define the role of IRS-1 in the osteoblastic differentiation of MSCs and OS cells. Differentiating potential of human and murine OS cell lines and bone marrow-derived mouse MSCs was evaluated by Alizarin Red staining and real-time PCR. We found that IRS-1 expression level decreased during differentiation. Consequently, IRS-1 expression levels were manipulated using shRNAs to knock-down, or a plasmid to over-express the protein. Both down-regulation and over-expression of IRS-1 inhibited osteoblastic differentiation. To understand the contribution of IRS-1 in the IGF-1R pathway we used the α IR-3 IGF-1R blocking antibody, which inhibited the differentiation process. The proteasome inhibitor MG-132 led to an increase in IRS-1 protein level that again inhibited osteoblastic differentiation, suggesting ubiquitination may play a role in maintaining the appropriate expression level of IRS-1. Taken together, these results indicate that IRS-1 expression level is critical for determining the differentiating capacity of MSCs as well as human and mouse OS cells and that precise regulation of IRS-1 expression by cells is required for this commitment to osteoblastic differentiation.

INTRODUZIONE.....	3
Osteosarcoma.....	3
Aspetti generali ed epidemiologia.....	3
Osteosarcoma classico o convenzionale.....	5
Eziopatogenesi.....	7
Terapia.....	11
Osteogenesi e differenziamento osteoblastico.....	14
Aspetti generali.....	14
Componente cellulare e matrice.....	15
Processi di ossificazione intramembranosa ed endocondrale.....	17
Cellule del <i>lineage</i> osteoblastico: sviluppo osseo e differenziamento.....	19
Controllo trascrizionale e segnali per il differenziamento.....	20
Controllo dei fattori trascrizionali osteoblasto-specifici.....	26
Osteosarcoma e differenziamento osteoblastico.....	27
Il sistema IGF.....	30
I ligandi.....	31
Le IGFBPs.....	32
Il recettore per IGF-1 (IGF-1R).....	33
Il sistema IGF e lo sviluppo tumorale.....	35
Strategie terapeutiche per colpire il sistema IGF.....	40
IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1).....	44
La famiglia di proteine IRS.....	44

Indice

IRS-1.....	45
IRS-1: degradazione.....	48
IRS-1 e lo sviluppo tumorale.....	50
IRS-1 e il differenziamento.....	52
SCOPO DELLA TESI.....	55
MATERIALI E METODI.....	57
RISULTATI.....	64
Risultati preliminari.....	64
La sovra-espressione di IRS-1 riduce la capacità delle cellule di differenziare in senso osteoblastico e ne aumenta la tumorigenicità.....	67
Importanza di IRS-1 durante il differenziamento osteoblastico.....	76
L'accumulo di IRS-1 inibisce il differenziamento osteoblastico.....	82
PROSPETTIVE FUTURE.....	85
DISCUSSIONE.....	87
BIBLIOGRAFIA.....	92

Introduzione

OSTEOSARCOMA

Aspetti generali ed epidemiologia

L'osteosarcoma (OS), conosciuto anche come sarcoma osteogenico, è un tumore ad elevata malignità costituito da cellule mesenchimali maligne che producono matrice di tipo osteoide ed ossea. Rappresenta il tumore maligno primitivo più frequente dell'apparato scheletrico. In Italia, l'incidenza dei tumori primitivi dell'osso si attesta intorno a 0,8-1 caso per 100.000 abitanti, quindi si calcola vi siano circa 500 nuovi casi di tumori maligni primitivi dell'osso per anno. Tra questi, la percentuale degli osteosarcomi si attesta intorno al 20-25%, perciò si possono supporre circa 100 nuovi casi l'anno. Sulla base dei dati epidemiologici relativi all'osteosarcoma per la popolazione bianca canadese, che mostrano un'incidenza di 4,6 nuovi casi l'anno per milione di abitanti nella fascia di età fino ai 19 anni e supponendo nel nostro paese la medesima incidenza, si possono attendere 57 nuovi casi l'anno di osteosarcoma in soggetti nella stessa fascia d'età. Considerando che tale valore di incidenza si riduce significativamente con l'età, una stima globale, nel nostro Paese, è di circa 100 nuovi casi l'anno [Campanacci M. 1999]. Molti dei pazienti con sarcoma osteogenico delle estremità presentano dolore seguito da gonfiore dei tessuti molli, ma questo è vero per tutti i tumori primari dell'osso poichè l'allungamento del periostio causa dolore prima che il tumore si possa distinguere. Il dolore può anche derivare dall'indebolimento dell'osso con sviluppo di micro fratture. L'insorgenza di dolore severo e improvviso denuncia la presenza di fratture patologiche più gravi, che sono inusuali nei pazienti adulti, mentre più del 15% dei pazienti pediatrici presenta fratture patologiche. Molto rari sono i sintomi di malessere generico, come perdita di peso, pallore, febbre, anoressia [Picci P. 2007].

Introduzione

Il registro dei Tumori Maligni Primitivi dell'Osso dell'Istituto Ortopedico Rizzoli mostra come l'osteosarcoma colpisca maggiormente i giovani, con un'età mediana di 19 anni, periodo in cui si ha il maggior accrescimento. L'osteosarcoma ha una distribuzione bimodale, con un picco di incidenza nella seconda decade e uno in età più avanzata, intorno ai 50 anni [Dorfman, H. 1995][Jaffe N., 1979] [Dahlin DC, 1986]; il picco adolescenziale sembra correlare con l'intensa crescita tipica della pubertà, infatti le zone in cui più spesso insorge il tumore sono quelle in cui si ha un massiccio rimaneggiamento osseo, suggerendo anche una correlazione tra l'attività osteoblastica e la tumorigenesi [Kansara M. 2007]. Alcuni studi mettono in evidenza una maggiore incidenza di questa patologia nei maschi piuttosto che nelle femmine [Mascarenhas L., 2000], con un rapporto di 1,5-2 : 1.; raramente l'osteosarcoma insorge in bambini di età inferiore ai 5 anni (in questa fascia d'età è più diffuso il sarcoma di Ewing), così come in pazienti anziani esso è solitamente un tumore secondario, post-irradiazione o su Malattia di Paget [Jaffe N., 1979] [Deyrup AT., 2007] [Hansen MF, 2006 63].

L'osteosarcoma può colpire tutti i distretti ossei, ma nel 90% dei casi si riscontra nelle ossa lunghe e nel 50% dei casi colpisce le ossa del ginocchio. Nell'ordine di insorgenza troviamo prima la parte distale del femore e la parte prossimale della tibia, seguite dalla parte prossimale dell'omero; si hanno riscontri anche nelle ossa cranio-facciali, nell'estremità prossimale del femore, nella diafisi del femore e nel bacino. Molto più raramente compare in sedi come il perone, la diafisi e l'estremità distale della tibia; ancora più atipiche sono le masse localizzate a livello della colonna vertebrale, della scapola, della clavicola, delle coste, dello sterno, dell'omero distale, dell'avambraccio, della mano e del piede [Campanacci M. 1999]. Nelle ossa lunghe l'osteosarcoma predilige le metafisi e le meta diafisi, mentre la cartilagine di accrescimento costituisce un ostacolo che ritarda l'invasione dell'epifisi: nell'adulto, infatti, il tumore si estende rapidamente all'epifisi. Raramente il tumore origina in una zona diafisiaria o epifisiaria (Figura 4).

Introduzione

osteoidi e di osso prodotta. Nel 25% dei casi è presente una componente tumorale cartilaginea talmente ricca da simulare un condrosarcoma.

Istologicamente, e per definizione, l'osteosarcoma convenzionale è un sarcoma a cellule fusate ad alto grado di malignità, che produce matrice osteoide, tuttavia ne sono state descritte tre varianti istologiche, che tengono conto dell'aspetto predominante della matrice: osteoblastico, fibroblastico e condroblastico. La variante osteoblastica è sicuramente la più frequente e rappresenta il 50% degli osteosarcoma convenzionali. Le cellule mostrano aspetto fusato o epitelioidi e presentano un significativo grado di atipia citologica. La produzione di matrice osteoide variamente mineralizzata è abbondante e tende ad intrappolare le cellule neoplastiche con deposizione a livello pericellulare oppure può mostrare un'organizzazione trabecolare. Il restante 50% si divide tra l'istotipo fibroblastico (25%), con produzione di matrice molto ridotta e con una prevalenza della componente fusata simil-fibrosarcomatosa, e l'istotipo condroblastico (25%), in cui si ritrova un'importante componente condroide di tipo maligno, simile a quella osservata nei condrosarcomi; intorno ai lobuli cartilaginei è possibile riscontrare la presenza di cellule fusate con produzione di matrice osteoide. Anche in assenza di matrice osteoide, la presenza di una neoplasia condroide ad alto grado di malignità, associata ad una componente fuso-cellulare in un paziente giovane, porta alla diagnosi di osteosarcoma di tipo condroblastico. Può accadere che la presenza di cellule giganti simil-osteoclasti mascheri un osteosarcoma convenzionale, inducendo il patologo a pensare ad un tumore a cellule giganti, ma nel caso di un paziente giovane una lesione a cellule giganti dell'osso nella regione metafisaria deve far sospettare un osteosarcoma. La presenza di metastasi a distanza è molto frequente in questo tipo di patologia e la sede preferenziale è il polmone; la presenza di metastasi ha un significato altamente prognostico.

Introduzione

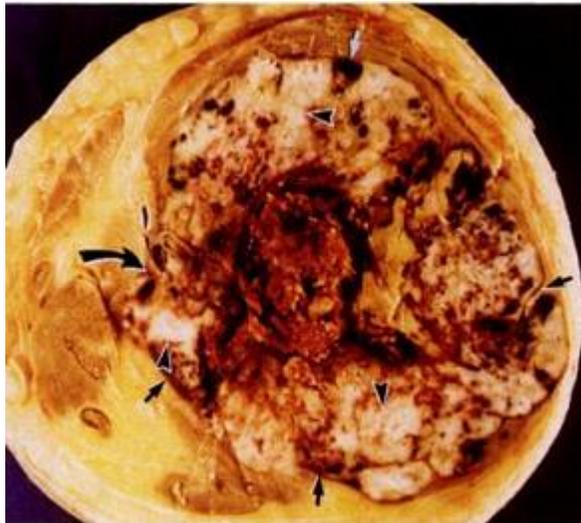


Figura 1. Osteosarcoma intramidollare alto grado con coinvolgimento del midollo (Murphey M., 1997).

Eziopatogenesi

Nel corso degli anni sono stati effettuati numerosi studi sugli aspetti citogenetici e molecolari dell'osteosarcoma con risultati spesso discordi. Pertanto il loro valore diagnostico e prognostico appare tuttora limitato e la rarità della patologia non contribuisce a chiarirne il significato eziologico. L'osteosarcoma è annoverato tra i sarcomi a cariotipo complesso [Hayden JB, 2006], e a differenza di quanto accaduto per il rhabdomyosarcoma alveolare, per il sarcoma di Ewing e per il sarcoma sinoviale, non è mai stata descritta alcuna traslocazione caratteristica di questa patologia [Cormier et al., 2004]. Sono state individuate diverse alterazioni geniche che correlano con l'insorgenza dell'osteosarcoma. Il 70% dei casi di osteosarcoma mostra alterazioni numeriche e strutturali e amplificazioni genomiche. Tra queste alterazioni le più comuni sono la duplicazione del cromosoma 1, la perdita dei cromosomi 9, 10, 13 e/o 17, la perdita parziale o completa del braccio lungo del cromosoma 6 e riarrangiamenti dei cromosomi 11, 19 e 20 [Sandberg et al., 2003]. L'amplificazione del tratto 8q, è presente in circa il 50% degli

Introduzione

osteosarcomi e rappresenta un fattore prognostico sfavorevole in termini di sopravvivenza. [Lopez M., 2009]. Le analisi citogenetiche hanno rivelato numerosi punti di rottura e traslocazioni, sottolineando la complessità e l'instabilità del background genetico in questa patologia. Diverse evidenze mettono in relazione l'aumento dell'instabilità e della complessità genomica con il processo di accorciamento dei telomeri [Artandi SE, 2000]. Le cellule tumorali, essendo dotate di proliferazione incontrollata, non sono soggette al normale processo di senescenza e utilizzano meccanismi che consentono il mantenimento della lunghezza dei telomeri; l'85% dei tumori attiva enzimi chiamati telomerasi, responsabili appunto dell'allungamento dei telomeri, il restante 15% utilizza un meccanismo alternativo basato sulla ricombinazione, detto ALT (alternative lengthening of telomeres) [Bryan TM, 1997]. Tale meccanismo viene utilizzato nel 50% degli osteosarcomi [Scheel C, 2001] e l'alta instabilità genomica dovuta a questo meccanismo potrebbe spiegare, almeno in parte, l'estrema variabilità di difetti genomici riscontrabili nell'osteosarcoma. E' stato ipotizzato che osteosarcomi dipendenti da ALT abbiano un comportamento clinico differente rispetto a quelli telomerasi-dipendenti, ma tale correlazione resta ancora da verificare. Recentemente è stato proposto un possibile meccanismo per spiegare l'estrema instabilità genetica dell'osteosarcoma: la cromotripsia, un evento cataclismico in cui i cromosomi vengono frammentati e conseguentemente riassemblati in modo aberrante [Campbell PJ, 2011]. Dalla comparazione dei risultati di esami CGH (Comparative Genomic Hybridization) si notano mutazioni *gain function* dei cromosomi 6p, 8q e 17p. [Szuhai K, 2012]. L'eziologia dell'osteosarcoma è quindi tutt'oggi oggetto di studio. La marcata attività osteoblastica e osteogenica appaiono fattori predisponenti all'insorgenza della neoplasia, come suggeriscono l'aumentata incidenza durante lo sviluppo adolescenziale e la tipica localizzazione a livello delle metafisi. L'esposizione a radiazioni ionizzanti è l'unico fattore di rischio esogeno individuato come causa comprovata dell'insorgenza del 4% degli osteosarcomi [Fuchs B, 2002], con un lungo lasso di tempo, 10-20 anni, intercorrente tra l'esposizione alle radiazioni e l'insorgenza della patologia [Longhi A, 2003], pertanto l'osteosarcoma radio-indotto risulta essere tipico dell'età adulta e molto raro. Alcuni studi comprovano l'origine virale dei sarcomi dell'osso ed anche nel caso dell'osteosarcoma è stata ipotizzata un'origine virale [Finkel MP, 1966]. Il DNA del virus SV40, accidentale contaminante dei vaccini per il poliovirus largamente utilizzati tra il 1955 ed il 1962, è stato ritrovato in cellule di osteosarcoma, ma il follow-up a lungo termine di pazienti che avevano ricevuto questo tipo di vaccinazione non ha mostrato alcun incremento del rischio di

Introduzione

sviluppare tale neoplasia [Mendoza SM, 1998][Engels EA,]. Sono state descritte famiglie in cui diversi membri hanno sviluppato osteosarcoma, suggerendo una predisposizione genetica all'insorgenza di questa patologia [Swaney JJ, 1973]. Altre alterazioni riscontrate frequentemente nell'osteosarcoma sono mutazioni o delezioni a carico di oncogeni e geni oncosoppressori. Screening effettuati su bambini con sarcoma dell'osso hanno rivelato che dal 3 al 4% di essi presentano una mutazione germinale di p53 [McIntyre JF, 1994]. Il gene P53, localizzato nella regione 17p13, codifica per un fattore di trascrizione implicato nella regolazione del ciclo cellulare, nella risposta al danno al DNA e nel processo apoptotico. La gran parte dei casi con mutazioni di p53 nella linea germinale rappresentano pazienti con una storia familiare di sindrome di Li-Fraumeni, infatti come riportato da Wang et al. [Wang LL, 2005] la sindrome di Li-Fraumeni (LFS) porta ad una predisposizione ai tumori ed è associata ai sarcomi delle parti molli, al tumore al seno, alla leucemia, all'osteosarcoma e al melanoma, oltre che ai tumori del colon, del pancreas, della corteccia surrenale e del cervello; i soggetti LFS mostrano un aumentato rischio di sviluppare tumori multipli primitivi. Questi pazienti presentano mutazioni dei geni p53 ed Rb. Anche pazienti affetti dalla sindrome di Rothmund-Thomson e dalla sindrome di Bloom possiedono una maggiore predisposizione allo sviluppo di osteosarcoma; queste due sindromi sono caratterizzate dalla perdita di due geni, RECQL4 nella prima e BLM nella seconda, codificanti per due DNA elicasi, quindi coinvolti nel processo di duplicazione che aiutano lo svolgimento dell'elica di DNA. Anche i pazienti con sindrome di Paget mostrano una predisposizione allo sviluppo dell'osteosarcoma, infatti l'1% di questi pazienti sviluppa la neoplasia ossea presa in considerazione. La sindrome di Paget dell'osso è dovuta ad una disconnessione tra l'attività degli osteoclasti e quella degli osteoblasti, risultando nella formazione di ossa largamente deformate [Wagner ER., 2011]. L'amplificazione e l'over-espressione dei geni di MDM2 e CDK4 sono state riscontrate in casi di osteosarcoma, suggerendo il loro coinvolgimento nella patogenesi tumorale [Ragazzini P, 1999]. Il gene MDM2 codifica per una proteina responsabile del legame e della inattivazione di p53; la sua iper-espressione è stata dimostrata nel 5-10% degli osteosarcomi [Lonardo F, 1997] CDK4 è una chinasi ciclina-dipendente che può fosforilare ed inattivare pRb, la proteina prodotta dal gene RB [Benassi MS, 1999]. Anche la Ciclina D1 viene altamente espressa nell'osteosarcoma [Maelandsmo GM, 1995].

La più forte predisposizione genetica è stata rilevata in pazienti con retinoblastoma ereditario. Il gene oncosoppressore del retinoblastoma (RB), localizzato sul cromosoma 13q14, è

Introduzione

un importante regolatore del ciclo cellulare, durante il quale inibisce l'ingresso delle cellule nella fase S di replicazione del DNA. Nella transizione dalla fase G1 alla fase S, Rb viene fosforilato ed inibito, consentendo così l'attivazione di fattori trascrizionali E2F e promuovendo quindi il processo di sintesi del DNA. Il gene RB è coinvolto nell'insorgenza di un raro tumore infantile della retina, il retinoblastoma, nel quale è sempre presente una mutazione del gene RB. I pazienti affetti da retinoblastoma mostrano un aumentato rischio di incidenza di tumori extraoculari secondari e l'osteosarcoma è tra questi il più frequente. In questi pazienti, infatti, l'osteosarcoma insorge 500 volte più frequentemente che nella popolazione generale [Huvos AG, 1991] [Thomas DM, 2001].

Un altro gene oncosoppressore implicato nella predisposizione all'osteosarcoma è p16INK4a, codificato dal gene INK4A, che rientra nell'ampia famiglia dei regolatori del ciclo cellulare. Esso è in grado di indurre un arresto del ciclo in fase G1 attraverso l'inibizione della chinasi di regolazione delle cicline, la Cdk4. Deleto in circa il 10% degli osteosarcomi, la sua mancata espressione correla con una diminuita sopravvivenza nei pazienti pediatrici [Kansara *et al.*, 2007].

C-myc e C-fos sono due proto-oncogeni che giocano un ruolo importante nella regolazione del ciclo cellulare. Entrambi i geni codificano infatti per fattori trascrizionali che controllano la progressione del ciclo cellulare e il differenziamento di osteoblasti e condrociti. Questi geni risultano essere amplificati o over-espressi nelle cellule di osteosarcoma [Barrios H, 1994] [Van den Berg S, 1993]. Sebbene sia chiaro che le alterazioni a carico di oncogeni e geni onco-soppressori siano coinvolte nella genesi dell'osteosarcoma, non è ancora chiaro quale evento avvenga per primo nella cascata delle alterazioni [Bacci G, 2006].

Nell'osteosarcoma risultano de-regolate molte delle principali vie di segnalazione cellulare. Le proteine Wnt appartengono ad una famiglia di molecole secrete altamente conservata che ricoprono un ruolo fondamentale nell'embriogenesi e nella modulazione della proliferazione cellulare [Logan *et al.*, 2004]. Molte di esse, insieme ad i loro recettori, sono espresse in precursori dell'osso e l'attivazione della pathway di Wnt è associata allo sviluppo di numerosi tipi di tumori. La gran parte degli osteosarcomi mostra un'alta espressione citoplasmatica e/o nucleare di β -catenina [Haydon *et al.*, 2002] e questo sembra correlare con la capacità metastatica. Il 50%

Introduzione

dei campioni di osteosarcoma analizzati mostra anche alti livelli del co-recettore LRP5 e la sua espressione correla significativamente con la comparsa di eventi metastatici [Hoang *et al.*, 2004].

Membri della famiglia TGF β /BMP giocano un ruolo importante nella regolazione della crescita cellulare e nello sviluppo [Massague *et al.*, 1998] [Gobbi *et al.*, 2002]. Negli osteosarcomi, in particolare l'espressione del fattore β 3 è maggiore di quella degli altri membri della famiglia e risulta fortemente correlata alla progressione della malattia [Kloen *et al.*, 1997]. Anche il recettore del fattore di crescita dei fibroblasti, FGF2R, assolve funzioni importanti nello sviluppo osseo e la mutazione in eterozigosi di questo gene è stata osservata in osteosarcomi di alto grado [Mendoza *et al.*, 2005]. I fattori di crescita insulino-simili o IGF sono importanti regolatori della crescita e dello sviluppo osseo che agiscono su specifici recettori di superficie per attivare proliferazione e differenziamento. L'espressione dei fattori, IGF1 e 2, e del recettore, IGF1R, è stata identificata in numerose linee cellulari di osteosarcoma ed è funzionalmente correlata a crescita maligna e invasività. Polimorfismi del gene IGF2R sono stati significativamente associati a un aumentato rischio di sviluppare osteosarcomi [Savage *et al.*, 2007] e l'incidenza più alta osservata nelle razze canine è associata a più alti livelli sierici di IGF1 [MacEwen *et al.*, 2004].

Terapia

Fino agli anni '70 il trattamento dell'osteosarcoma prevedeva solo l'intervento chirurgico (per lo più risultante in amputazione) o la radioterapia. Sebbene si ottenesse un buon controllo locale della malattia, la gran parte dei pazienti decedeva in poco tempo a causa delle metastasi, localizzate in prima istanza a livello polmonare. Con l'impiego della sola chirurgia la sopravvivenza libera da malattia a 5 anni era del 12% circa. Per questa ragione fu introdotta la chemioterapia adiuvante e i primi farmaci impiegati con successo furono la Doxorubicina e il Metotrexate [Campanacci M, 1981] [Enneking WF, 1979] [Rosemburg SA, 1979]. Altri farmaci utilizzati furono la Vincristina, la Bleomicina e la Dactinomicina, ma il loro impiego fu sospeso a causa degli scarsi risultati [Meyers PA, 1992]. Attualmente il trattamento dell'osteosarcoma è costituito da protocolli che prevedono l'accostamento dell'approccio chirurgico, con interventi

Introduzione

conservativi volti all'asportazione della parte lesa e della chemioterapia neoadiuvante, che contempla l'impiego di terapie farmacologiche pre- e post- operatorie. La chemioterapia pre-operatoria si propone di ridurre il volume del tumore primario, diminuendone quindi i margini, e di valutare la risposta istologica ai chemioterapici. Con la chirurgia viene rimossa la massa neoplastica e l'ampiezza dei margini di tessuto sano esportato varia a seconda del sottotipo istologico del tumore primario. La chemioterapia post-operatoria ha l'obiettivo di eradicare invece le micrometastasi [Campanacci M, 1999]. I farmaci più utilizzati sono l'Adriamicina, il Metotrexate, il cis-Platino e l'Ifosfamide. Il tasso di mortalità associato all'osteosarcoma risultava molto elevato prima dell'avvento della chemioterapia, ma attualmente la combinazione dei trattamenti chemioterapici e chirurgici ha consentito di migliorare notevolmente le percentuali di sopravvivenza, che oggi si aggirano attorno al 65%. Ciò non toglie che l'individuazione di nuovi bersagli terapeutici sia necessaria per garantire ulteriori miglioramenti, soprattutto nei pazienti che mostrano chemioresistenza o che manifestano ricadute locali (35% dei pazienti) o metastasi polmonari (60% dei pazienti) [Marina N, 2009]. Uno studio del 2010 mette in evidenza come un recupero precoce dei linfociti dopo chemioterapia sia indice di un migliore *outcome* dei pazienti con osteosarcoma [Moore C, 2010]. Inoltre la ricostituzione del sistema immunitario successiva al trasferimento di cellule T *naive* in modelli murini di osteosarcoma riduce significativamente le ricorrenze metastatiche [Merchant MS, 2007]. Queste scoperte hanno messo in evidenza un ruolo importante del sistema immunitario nel controllo dell'osteosarcoma; pertanto l'immunoterapia, basata sull'up-regolazione della risposta immune dei pazienti, è un'attraente opportunità terapeutica per questa patologia.

L'approccio immunoterapico viene utilizzato in due forme: l'immunoterapia attiva con l'impiego delle citochine e l'immunoterapia passiva o adottiva con l'amministrazione di anticorpi e terapie cellulari adottive (ACT) [Marina N, 2009]. Nonostante le citochine vengano ampiamente utilizzate e studiate, il loro impiego in clinica è molto limitato a causa dei gravi effetti collaterali. Una delle molecole impiegate in combinazione ai tradizionali chemioterapici nella terapia sia contro l'osteosarcoma metastatico sia contro l'osteosarcoma non metastatico è il mifamurtide, un immunomodulatore che agisce attivando macrofagi e monociti [Frampton JE, 2010]. Il suo impiego ha portato ad un aumento della sopravvivenza del 8 e del 13%, rispettivamente a 5 e 6 anni [Anderson PM, 2010]. Attualmente sono stati sviluppati diversi anticorpi terapeutici, ma solo pochi di essi sono stati testati sull'osteosarcoma a causa della complessità genetica che contraddistingue questa neoplasia e del fatto che l'osteosarcoma

Introduzione

esprime molti recettori di superficie ma solo una minima parte sono caratteristici del tessuto tumorale e quindi distinguibili da quelli del tessuto normale [Gorlick R, 2003]. Una molecola i cui effetti sull'osteosarcoma sono stati recentemente dimostrati e' la baicaleina, un flavonoide bioattivo largamente utilizzato nella medicina orientale. Zhang e i suoi collaboratori hanno dimostrato l'effetto antiproliferativo e pro-apoptotico esercitato da questa molecola in cellule di osteosarcoma, la quale e' anche in grado di ridurre la capacita' di adesione, di migrazione e di invasione delle stesse cellule, indicandone un possibile effetto anti-metastatico e di conseguenza una nuova prospettiva terapeutica nel trattamento dell'osteosarcoma [Zhang Y, 2012].

E' quindi chiara la necessita' di individuare nuovi bersagli terapeutici e nuove molecole in grado di superare queste problematiche e la terapia contro IGF-1R potrebbe rappresentare una valida alternativa da esplorare.

OSTEOGENESI E DIFFERENZIAMENTO OSTEOBLASTICO

Aspetti generali

L'osso è un tessuto connettivo specializzato che si caratterizza per la durezza e la resistenza meccanica [Monesi V, 2008]. Nella sua conformazione si distinguono una parte esterna più compatta e una interna costituita da tessuto spugnoso, dalla caratteristica struttura trabecolare, leggera ma in grado di resistere a tensioni elevate. Non si tratta però di una struttura complessivamente rigida e statica poiché è soggetta ad un continuo rimodellamento e rinnovamento. Il tessuto osseo assolve diversi compiti: svolge una funzione di sostegno, offre supporto strutturale ai muscoli scheletrici permettendone il movimento e garantisce protezione fisica a organi vitali; esso rappresenta un'indubbia riserva di minerali quali calcio e fosfato; costituisce una continua fonte di cellule staminali emopoietiche per la rigenerazione delle cellule ematiche e del sistema immunitario.

Morfologicamente si distinguono tre principali tipi di ossa: lunghe, corte e piatte. Le ossa lunghe sono costituite da un corpo allungato, detto diafisi, e due estremità, chiamate epifisi. All'interno della cavità diafisaria è presente il midollo osseo. Le pareti della cavità sono formate da osso compatto. Le epifisi presentano tessuto osseo spugnoso, reso più resistente dalle trabecole ossee. Le ossa corte hanno invece una forma più o meno cuboide e sono costituite da tessuto osseo spugnoso ricoperto da un sottile strato di osso compatto. Le ossa piatte si caratterizzano per la presenza di uno strato di tessuto spugnoso allocato tra due lamine di tessuto compatto. Il periostio rappresenta il rivestimento superficiale esterno, di natura fibrosa e ampiamente vascolarizzato.

Componente cellulare e matrice

L'osso è costituito da cellule specializzate disperse in un'abbondante matrice extracellulare. La componente cellulare, parte fondamentale del tessuto osseo, è diretta responsabile della sintesi dei componenti della matrice ed è rappresentata dagli osteoblasti. Gli osteoblasti hanno forma tondeggianti e derivano dal differenziamento di cellule osteoprogenitrici, ossia di cellule staminali mesenchimali già *committed* verso il *lineage* differenziativo. In quanto cellule secernenti, gli osteoblasti sono caratterizzati dalla presenza di un reticolo endoplasmatico rugoso e di un apparato di Golgi molto estesi e responsabili, dal punto di vista istologico, della loro basofilia citoplasmatica. Come i fibroblasti (le cellule fondamentali del tessuto connettivo propriamente detto), gli osteoblasti sono responsabili delle fasi di formazione dell'osso, ossia della sintesi dei componenti molecolari che andranno poi a costituire sia le fibre che le glicoproteine della matrice. Questi composti vengono espulsi dalle cellule per esocitosi e successivamente vengono assemblati nella loro forma definitiva all'esterno della cellula. Completata la sintesi della matrice e avvenuta la sua calcificazione, gli osteoblasti si allocano in cavità ellissoidali non mineralizzate scavate nella matrice stessa, dette lacune ossee. In questa fase prendono il nome di osteociti e, pur restando cellule vitali, entrano in uno stato di quiescenza. Pertanto, gli osteociti rappresentano come i fibrociti un momento funzionale successivo di una stessa cellula, caratterizzati da Golgi e reticolo endoplasmatico granulare poco sviluppati. Queste cellule sono caratterizzate da lunghi prolungamenti citoplasmatici con cui attingono alle sostanze nutritive presenti all'interno di microgallerie definite *canalicoli ossei*: al microscopio elettronico si può osservare che tra la matrice calcificata e la membrana plasmatica è presente uno spazio occupato da glicoproteine e liquido interstiziale. I canalicoli possono intersecarsi tra loro consentendo a più osteociti di entrare in contatto e al liquido interstiziale di giungere a cellule poste lontano dalla sorgente nutritiva. Gli osteociti possono anche essere controllati dagli osteoblasti, mediante opportuni segnali, qualora vi sia bisogno di deporre matrice ossea. Avendo recettori di membrana per l'ormone paratiroideo (PTH), gli osteociti controllano anche l'azione degli osteoclasti. Un'ulteriore componente cellulare del tessuto osseo è rappresentata dagli osteoclasti. Contrariamente a osteoblasti e osteociti, gli osteoclasti derivano da precursori emopoietici del *lineage* monocitario-macrofagico; essi hanno notevoli dimensioni, sono multinucleati, presentano molte

Introduzione

estroflessioni e increspature nella membrana plasmatica chiamate orletto a spazzola. Gli osteoclasti si occupano della produzione e della secrezione di enzimi che agiscono degradando la matrice calcificata, permettendo così il riassorbimento dell'osso e collaborando al mantenimento dell'omeostasi di questo tessuto.

Oltre che dalla componente cellulare, l'osso è costituito anche da un'abbondante matrice di natura proteica prodotta dalle stesse cellule del tessuto e nella quale esse sono intersperse. Tale matrice proteica presenta una porzione di natura organica, simile a quella degli altri connettivi, e una componente minerale calcificata. La frazione organica è formata da una componente fibrillare costituita principalmente da collagene di tipo I. Le fibre di collagene I nell'osso adulto sono disposte secondo un'organizzazione precisa e ordinata, formando fasci che a loro volta danno origine a strutture a elica che aumentano la compattezza e la resistenza del tessuto. L'organizzazione tridimensionale dei fasci di fibre e delle cellule forma strutture lamellari. Glicoproteine di vario tipo costituiscono il resto della matrice ed hanno per lo più il ruolo di proteine di adesione; tra esse troviamo la fibronectina, la trombospondina e l'osteopontina, proteine che hanno il compito di ancorare le cellule alla matrice. Una proteina particolare è l'osteocalcina, coinvolta nella sintesi del tessuto osseo. L'osteonectina ha invece il compito di promuovere la mineralizzazione della matrice stessa. A differenza degli altri tipi di connettivo, il tessuto osseo possiede elementi minerali nella componente matriciale che costituiscono un'impalcatura dura e compatta, essenziale per le funzioni di sostegno e locomozione proprie dell'osso. Nei vertebrati il processo di mineralizzazione inizia già durante lo sviluppo embrionale, ma giunge al completamento solo durante lo sviluppo postnatale; il 65% del peso secco del tessuto osseo in un individuo adulto è rappresentato dalla componente minerale. Essa è costituita principalmente da calcio, combinato con ossigeno, fosforo e idrogeno a formare la molecola cristallina detta idrossiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), composto che forma sottili cristalli a forma di prisma. Le diverse componenti della matrice, organica e minerale, conferiscono proprietà diverse ed interconnesse al tessuto: la frazione calcificata è responsabile della durezza dell'osso, la frazione fibrillare è responsabile della flessibilità e dunque della sua resistenza alla trazione.

Processi di ossificazione intramembranosa ed endocondrale

La formazione dell'osso avviene durante lo sviluppo embrionale mediante due distinti processi. Un piccolo numero di elementi scheletrici, principalmente le ossa cranio-facciali, si forma grazie all'ossificazione intramembranosa (Fig. 5A). Gli osteoblasti differenziano dall'interno di un foglietto di tessuto connettivo di cellule mesenchimali condensate e cominciano a produrre matrice fibrillare, l'osteoido, priva di minerali. Si formano poi le prime trabecole nelle quali una parte del connettivo derivato dal mesenchima rimane bloccato e differenzia in midollo. Successivamente la matrice diventa mineralizzata e si organizza a formare l'osso compatto. Gran parte delle ossa (arti, bacino e colonna vertebrale) viene però generata tramite ossificazione endocondrale (Fig. 5B). In questo processo i condrociti si differenziano dal mesenchima condensato e formano uno stampo cartilagineo che prefigura il futuro elemento scheletrico. I condrociti al centro dello *scaffold* cessano di proliferare, diventano pre-ipertrofici e maturano in cellule ipertrofiche caratterizzate dall'aumento di dimensioni, vacuolizzazione e secrezione di matrice extracellulare. Le cellule mesenchimali che circondano lo stampo di cartilagine si compattano fino a formare un tessuto condensato multistrato, il pericondrio. Qui le cellule che si trovano nel versante cartilagineo ricevono dai condrociti pre-ipertrofici un segnale che induce il programma osteogenico. Nello strato più interno del pericondrio, vicino all'area dei condrociti ipertrofici, il periostio, comincia così ad essere depositata matrice ossea. La morte dei condrociti ipertrofici e l'invasione vascolare portano alla formazione di una nuova area di mineralizzazione, la spongiosa primaria, all'interno delle diafisi delle ossa lunghe. Il manicotto osseo forma tessuto compatto lamellare che produce più matrice e si estende a scapito della cartilagine. Mentre la cartilagine si ritira e il tessuto osseo compatto aumenta, si ha l'allungamento di diafisi ed epifisi. L'equilibrio finale si raggiunge quando rimane in quantità costante la cartilagine che, dopo l'età di sviluppo, scompare del tutto. Lo stesso processo si ha anche nelle ossa brevi, ma la cartilagine si irradia in tutte le direzioni e non solo verso le epifisi.

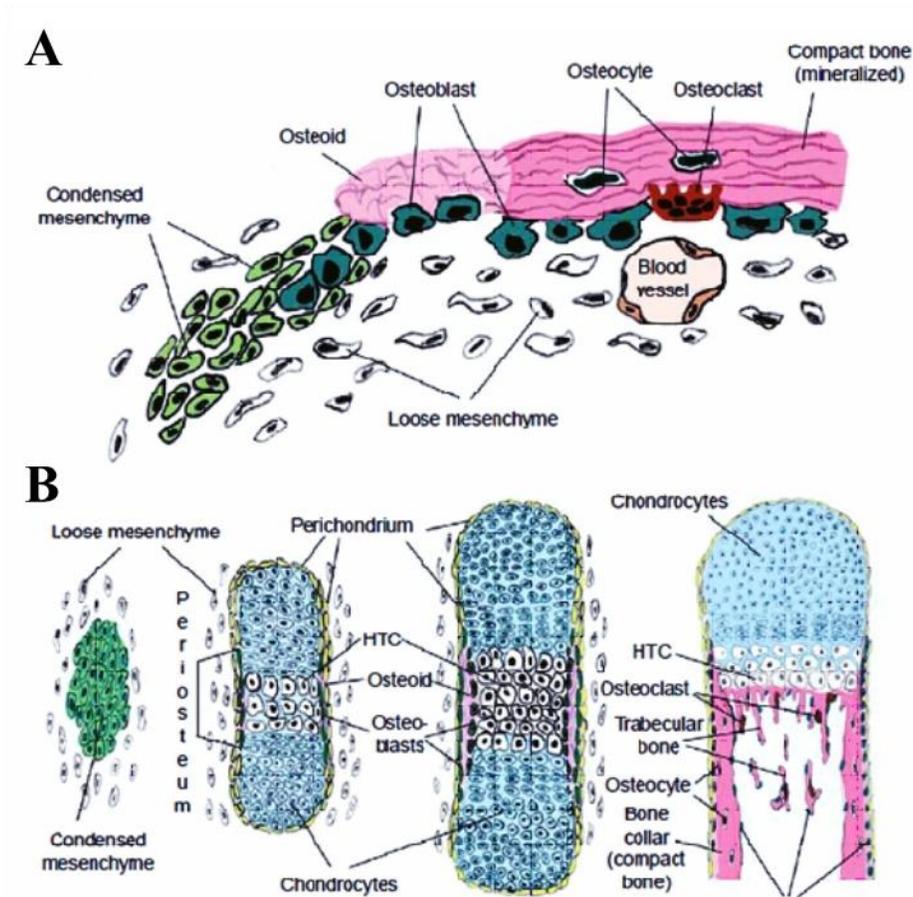


Figura 5. Processi di ossificazione (Hartmann, 2006). A. L'ossificazione intramembranosa comincia con il differenziamento osteoblastico all'interno della condensazione mesenchimale. Gli osteoblasti in prima battuta producono una matrice fibrillare non mineralizzata (osteoid) che comincia a organizzarsi in osso compatto. Gli osteoblasti intrappolati nella matrice ossea differenziano in osteociti. Gli osteoclasti, cellule del riassorbimento osseo, sono di origine ematopoietica. B. L'ossificazione endocondrale ha inizio con la formazione di mesenchima condensato in cui si sviluppano condrociti a costituire un abbozzo cartilagineo in sostituzione temporanea della struttura ossea. Le cellule mesenchimali che circondano questo abbozzo formano il pericondrio che consiste in cellule mesenchimali densamente impaccate. Nella zona del pericondrio adiacente ai condrociti ipertrofici (HTC), i primi precursori degli osteoblasti differenziano dopo aver ricevuto un segnale dai condrociti pre-ipertrofici e ipertrofici. Questa regione è nota anche come periostio. Gli osteoblasti secernono una matrice non mineralizzata fibrillare che infine si organizza in osso compatto mineralizzato. Il manicotto osseo e l'osso trabecolare sono di natura compatta. Durante il deposito dell'osso, gli osteoblasti rimangono intrappolati nella matrice ossea e differenziano in osteociti; la matrice viene, poi, riassorbita dagli osteoclasti. Questi sono necessari per la produzione dell'architettura cava delle ossa dei vertebrati e la loro attività è importante per il rilascio di minerali come calcio e fosfato.

Cellule del lineage osteoblastico: sviluppo osseo e differenziamento

Il processo di ossificazione intramembranosa viene finemente regolato ed è innescato dall'espressione coordinata di un ampio numero di fattori che dettano l'organizzazione spaziale e temporale delle cellule osteogeniche [Thomas et al., 2006] [Lian et al., 2004].

Il processo differenziativo ha inizio a partire da cellule staminali mesenchimali localizzate nello stroma del midollo osseo che, dopo un iniziale *commitment*, vanno incontro a una fase di espansione. La divisione iniziale è asimmetrica, da' origine a un'altra cellula staminale (*self-renewal*) e ad un osteoprogenitore *committed*. In seguito al *commitment*, la cellula staminale attiva un compartimento di amplificazione associato a un'intensa attività proliferativa.

Inizia poi la maturazione della matrice; in questa fase si ha la multistratificazione cellulare degli osteoblasti e il deposito della matrice di collagene che contribuisce al blocco della proliferazione attivando cascate di segnalazione tramite interazioni cellula-cellula e cellula-matrice. Viene così indotta l'espressione di geni specifici. Gli osteoblasti maturi esprimono fosfatasi alcalina (ALP), collagene e sialoproteine, si localizzano in posizione adiacente all'osteoidi di nuova produzione e sono caratterizzati da un limitato potenziale proliferativo [Stein G, 1996]. L'ultima fase dell'osteoblastogenesi porta all'inizio del differenziamento terminale e la permanente uscita dal ciclo cellulare delle cellule interessate. Nella matrice inizia il deposito di minerali e la mineralizzazione è segnata dall'*up*-regolazione di geni indicatori, quali l'osteopontina e l'osteocalcina. In questo contesto, l'osteocita si sviluppa durante l'impaccamento degli osteoblasti nell'osso mineralizzato. I meccanismi che portano ai cambiamenti morfologici dall'osteoblasto cuboide all'osteocita stellato restano ancora oggi poco noti. Le cellule che non differenziano in osteociti possono trasformarsi in *lining cells* che rimangono sulla superficie ossea inattive, proteggendo la matrice dagli osteoclasti e possono essere riattivate dagli stessi osteociti, grazie ai processi dendritici intracanalicolari, in caso della necessità di riparazione dei microdanni che si verificano nello scheletro. L'apoptosi rappresenta un'alternativa al processo di differenziamento [Jilka RL, 1998]. Il 70% circa degli osteoblasti segue questo percorso alternativo il cui ruolo consiste molto probabilmente nell'eliminare l'eccesso di cellule che non

Introduzione

sono necessarie né come osteociti né in qualità di *lining cells*, intervenendo nel regolare l'omeostasi del tessuto.

L'analisi del processo differenziativo mette in luce la proporzionalità inversa esistente tra proliferazione e differenziamento.

Controllo trascrizionale e segnali per il differenziamento

Le fasi dell'osteoblastogenesi, il *commitment*, la maturazione e la mineralizzazione, sono interamente regolate da una interconnessione finemente controllata di segnali di sviluppo, proteine, fattori di trascrizione e loro co-regolatori per indurre l'espressione di geni specifici e l'acquisizione del fenotipo osteoblastico [Komori T, 2006]. I regolatori trascrizionali più importanti sono stati identificati (Fig. 6).

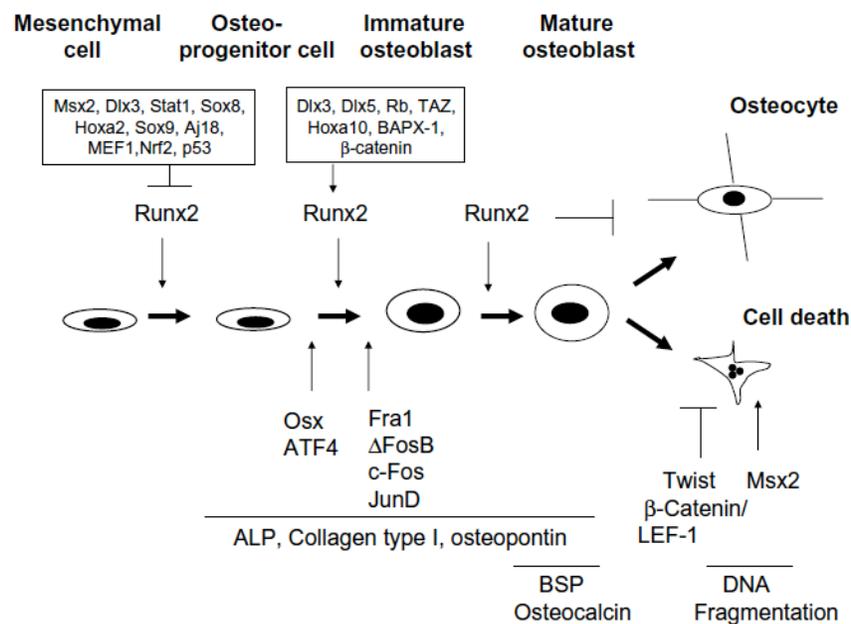


Figura 6. Controllo del differenziamento osteoblastico mediato dai fattori di trascrizione (Marie, 2008).

Introduzione

Runx2 è stato identificato come il principale elemento di controllo del *commitment* e del differenziamento osteoblastico [Komori T, 1997] [Otto F, 1997]. Membro della famiglia dei fattori di trascrizione Runt, presenta questo tipo di dominio richiesto per il legame con il DNA e per la dimerizzazione con la subunità β ; Runx2 costituisce infatti la subunità α di un fattore trascrizionale eterodimerico che forma insieme a CBF β . Nei mammiferi esistono tre differenti geni codificanti per la subunità α : Runx1, Runx2 e Runx3, che svolgono un ruolo fondamentale rispettivamente nell'ematopoiesi, nell'osteoblastogenesi e nello sviluppo neuronale oltre che nella regolazione della crescita delle cellule epiteliali gastriche; un solo gene, CBF β , codifica per la subunità β [Blyth K, 2005]. In quanto membro della famiglia di fattori trascrizionali Runx, Runx2 si lega ad una specifica sequenza consenso (PuACCPCA), denominata elemento specifico osteoblastico (OSE), che si trova nei promotori di gran parte dei geni osteoblastici, tra cui osteopontina, collagene di tipo I e osteocalcina, controllandone l'espressione e quindi l'instaurarsi del fenotipo osteoblastico. Runx2 è infatti presente negli osteoblasti durante tutto il processo differenziativo. Esso viene espresso nelle cellule mesenchimali all'inizio dello sviluppo scheletrico, tanto che cellule Runx2 *-/-* possono potenzialmente differenziare in adipociti e condrociti [Kobayashi H, 2000], confermando l'estrema importanza di Runx2 nelle cellule mesenchimali ai fini del programma osteogenico. Questo fattore possiede tutte le proprietà per essere definito un fondamentale fattore nell'osteogenesi. La sua espressione in cellule non osteoblastiche è sufficiente per indurre l'espressione di numerosi geni osteoblasto-specifici, quali l'osteocalcina [Ducy P, 1997]. Inoltre topi *knock out* per Runx2 mostrano una completa assenza di ossificazione intramembranosa ed endocondrale per la mancanza di differenziamento delle cellule mesenchimali in osteoblasti [Komori T, 1997].

Il funzionamento di Runx2 è complicato tanto quanto i meccanismi che contribuiscono alla sua regolazione. La sua localizzazione subnucleare contribuisce certamente al controllo dell'osteogenesi. Topi con una delezione in omozigosi nella sua porzione C-terminale non generano osso a causa di un arresto nella maturazione degli osteoblasti [Choi JY, 2001]; a causa della mutazione presente viene a mancare un segnale di indirizzamento alla matrice nucleare. La forma tronca di Runx2 penetra nel nucleo, conserva una normale capacità di legame al DNA, ma ha completamente perso il suo *homing* intranucleare che risulta quindi essere fondamentale per la sua completa attività trascrizionale. Runx2 interagisce con numerose proteine regolatorie a livello del nucleo, portando all'attivazione o repressione di geni che controllano il programma di

Introduzione

proliferazione e differenziamento osteoblastico. Nonostante questo suo importante ruolo nel *commitment* osteoblastico, Runx2 non sembra essere essenziale per il mantenimento dell'espressione dei geni responsabili della produzione delle principali proteine di matrice negli osteoblasti maturi [Maruyama Z, 2007]. Topi iper-esprimenti Runx2 esibiscono un fenotipo osteopenico, a causa di un ridotto numero di osteoblasti maturi [Liu W, 2001], indicando come Runx2 possa agire anche come repressore, regolando negativamente le fasi terminali del differenziamento osteoblastico.

L'attività di Runx2 e' a sua volta regolata da numerosi fattori trascrizionali che agiscono nelle interazioni proteina-DNA e proteina-proteina. Trascrizionalmente, Runx2 è controllato da Hoxa2, membro dei fattori di trascrizione Hox contenenti un omeodominio, che regola la segmentazione scheletrica. Hoxa2 inibendo l'espressione di Runx2, inibisce anche la formazione d'osso, mentre l'inibitore di Hoxa2, SATB2, ne attiva l'espressione [Dobrev G, 2006]. Sox8, regolatore della crescita ossea appartenente alla famiglia Sox, è un altro inibitore trascrizionale di Runx2, come dimostrato dall'osteoporosi che presentano topi transgenici in seguito all'espressione forzata di Sox8 negli osteoblasti [Schmidt K, 2005]. Anche Sox9, principale coordinatore del differenziamento condrogenico, interagendo con Runx2, ne blocca l'attività trascrizionale [Zhou G, 2006]. TLE2, un omologo nei mammiferi della proteina Groucho di *Drosophila*, viene espresso negli osteoblasti e inibisce l'attività trascrizionale di Runx2 interagendo con la sua regione C-terminale [Thirunavukkarasu K, 1998].

Molto interessante è l'opposta attività regolatoria che esercitano su Runx2 p53 ed Rb. p53 regola negativamente Runx2 [Lengner CJ, 2006] mentre Rb funziona da coattivatore trascrizionale, promuovendo il processo di differenziamento osteoblastico [Thomas DM, 2001]. Anche meccanismi post-trascrizionali possono contribuire alla regolazione della funzione di Runx2, che può essere fosforilato e attivato da MAP chinasi [Xiao G, 2000] dopo il legame del collagene di tipo I all'integrina $\alpha2\beta1$ sulla superficie degli osteoblasti, mentre la *pathway* dell'AMP ciclico porta a una riduzione dei livelli di Runx2 nella popolazione osteoblastica, attraverso una sua degradazione ubiquitina-dipendente [Tintut Y, 1999]. La degradazione da parte del proteasoma è un altro meccanismo di controllo della funzione di Runx2. L'ubiquitina ligasi Smurf1 interagisce con il motivo PY nel C-terminale di Runx2 promuovendone la degradazione proteosomale [Zhao M, 2004]. La proteina Schnurri-3 controlla i livelli proteici di Runx2,

Introduzione

promuovendone la degradazione attraverso l'ubiquitina ligasi WWP1; la delezione di Schnurri-3, in modelli murini, risulta in un incremento della massa ossea [Jones RA, 2006]. In ultima analisi, Runx2 prende contatti anche con proteine ad attività istone acetiltransferasi, come p300, consentendo un preciso controllo del differenziamento anche dal punto di vista epigenetico, mantenendo un idoneo bilanciamento tra cromatina acetilata e deacetilata; Runx2 interagisce inoltre con le istone deacetilasi (HDACs) che costituiscono un'importante classe di regolatori negativi dell'osteoblastogenesi [Westendorf JJ, 2006].

Oltre a Runx2, un ulteriore regolatore del differenziamento osteoblastico che merita attenzione è Osterix (Osx). E' un fattore di trascrizione a dita di zinco, specificatamente espresso negli osteoblasti di tutti i segmenti scheletrici [Nakashima K., 2002]. A differenza dei topi KO per Runx2, il cui scheletro è interamente non mineralizzato, i topi Osx-deficienti mancano di una matrice mineralizzata solamente nelle ossa derivate da processi di ossificazione intramembranosa, mostrando una matrice mineralizzata che ricorda la cartilagine calcificata, ma non la matrice ossea. Questi risultati mostrano come Osterix, a differenza di Runx2, non sia richiesto per l'induzione dell'ipertrofia dei condrociti rivelando il suo esclusivo coinvolgimento nel differenziamento osteoblastico e nella formazione di osso *in vivo*. Studi di ibridazione *in situ* hanno consentito di individuare una relazione gerarchica tra i due fattori. Mentre Osx non è espresso in embrioni Runx2-deficienti, Runx2 è presente in embrioni privi di Osx. Ciò dimostra che Osx agisce a valle di Runx2 nella cascata trascrizionale del differenziamento osteoblastico e che la sua espressione può essere direttamente regolata dal legame di Runx2 a un elemento di risposta presente nel promotore di Osx [Nishio Y., 2006]. A differenza di Runx2, non è stata identificata nell'uomo alcuna mutazione del gene Osx associata a una diminuzione della formazione di osso. L'azione molecolare del funzionamento di Osx negli osteoblasti è decisamente molto meno conosciuta. Osx è stato recentemente identificato in un complesso con il fattore nucleare NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) con la funzione di attivatore del promotore del collagene di tipo I [Koga T, 2005] nella regolazione di una delle vie non canoniche di Wnt. p53 è stato identificato come un repressore trascrizionale di Osx, confermando il suo ruolo di antagonista nel processo di differenziamento osteoblastico [Wang J, 2006]. Studi genetici hanno evidenziato l'importanza della via di Wnt nel controllo della formazione ossea [Hartmann C, 2006]. L'interazione delle proteine Wnt con i recettori Frizzled e i co-recettori LRP 5/6 portano all'inibizione della fosforilazione della β -catenina mediata dalla GSK-3, risultando in un

Introduzione

accumulo della stessa e in una sua traslocazione nucleare. In questa sede si lega ai fattori di trascrizione LEF/TCF attivando i geni sotto il suo controllo. L'inattivazione della β -catenina arresta il differenziamento degli osteoblasti a partire dai progenitori mesenchimali, sostenendo un suo ruolo nel differenziamento osteoblastico. Uno dei bersagli del *signalling* di Wnt è proprio Runx2 dato che la β -Catenina complessata a TCF1 promuove l'espressione di Runx2 e la sua attività [Gaur T, 2005]. Una delle proteine Wnt, Wnt10b, è stata descritta come coinvolta nell'induzione di espressione di Runx2, Osx e Dlx5, e capace di ridurre, per contro, fattori di trascrizione adipogenici come C/EBP α e PPAR γ nei topi, indicando, ancora una volta che il controllo dell'osteoblastogenesi si estrinseca su più bersagli e a più livelli.

Un altro fattore che sembra intervenire nelle fasi tardive del processo differenziativo è ATF4. Topi ATF4-deficienti mostrano uno sviluppo scheletrico ritardato associato ad una diminuzione della massa ossea. A livello molecolare, ATF4 è stato identificato come il fattore che si lega a un elemento specifico degli osteoblasti nel promotore dell'osteocalcina [Ducy P, 1995]. ATF4 sembra regolare la formazione dell'osso regolando la produzione del collagene di tipo I. ATF4 può poi essere fosforilato dalla chinasi Rsk2, controllando l'importazione amminoacidica negli osteoblasti; l'inattivazione di Rsk2 porta allo sviluppo della sindrome di Coffin-Lowry, evidenziando che il diminuito livello di fosforilazione di ATF4, in assenza di Rsk2, potrebbe essere responsabile delle anomalie scheletriche associate a questa sindrome [Yang X, 2004].

AP1 è un fattore trascrizionale composto da proteine eterodimeriche delle famiglie Jun (c-Jun, JunB e JunD) e Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra2). c-Fos è stato il primo membro di questa famiglia riconosciuto come regolatore del differenziamento osteoblastico: la sua delezione nei topi porta alla nascita di animali con grave osteopetrosi, mentre la sua iperespressione è coinvolta nello sviluppo dell'osteosarcoma [Grigoriadis AE, 1995]. Altre proteine della famiglia AP1 sono coinvolte nel controllo del programma osteogenico: la sovraespressione di Fra1 promuove il differenziamento, con un conseguente incremento della massa scheletrica dovuta all'aumentato numero di osteoblasti; la delezione di JunB si traduce fenotipicamente in una ridotta crescita ossea [Jochum W, 2000] [Kenner L, 2004]. Numerosi fattori trascrizionali appartenenti alla famiglia delle proteine con omeodominio, Msx1, Msx2, Dlx5, Dlx6, intervengono nel processo di differenziamento osteoblastico. Una mutazione attivante di Msx2 è responsabile della craniosinostosi di tipo Boston, caratterizzata da un incremento della formazione d'osso attorno

Introduzione

alla sutura craniale [Ma L, 1996], mentre l'inattivazione di Msx2 porta, nel topo, a un ritardo dell'ossificazione, associata ad un decremento dell'espressione di Runx2 [Satokata I, 2000]. Msx2 viene espresso prevalentemente in cellule osteoprogenitrici, dove promuove la proliferazione e il differenziamento delle cellule mesenchimali ma, poiché inibisce l'attività di Runx2 e di altri geni osteoblasto-specifici in osteoblasti maturi [Shirakabe K, 2001], potrebbe avere un ruolo specifico anche nella fase precoce del differenziamento. Proteine espresse in tutti gli stadi del differenziamento osteoblastico sono Dlx3 e Dlx5, che risultano però maggiormente espresse negli osteoblasti maturi; Dlx3 svolge un ruolo complesso, agendo sia come regolatore negativo che positivo della trascrizione dell'osteocalcina [Hassan MQ, 2004]. Dlx5 è, invece, in grado di attivare l'espressione di Runx2 e di alcuni marcatori del differenziamento, quali le sialoproteine e l'osteocalcina [Holleville N, 2007]. Il ruolo delle altre proteine Dlx è ancora sconosciuto.

L'induzione del fenotipo osteoblastico richiede che i fattori trascrizionali che agiscono come repressori della fase di maturazione vengano *down*-regolati. Due esempi sono le proteine Id e Twist, appartenenti alla famiglia elica-giro-elica, che risultano essere altamente espresse durante la fase proliferativa nei pre-osteoblasti, per poi essere repressi durante il differenziamento. L'espressione di Runx2 è associata alla repressione di Twist [Bialek P, 2004], mentre l'aploinsufficienza di Twist induce una fusione precoce della sutura craniale dovuta ad un prematuro differenziamento osteoblastico [Yousfi M, 2001].

Alcuni fattori trascrizionali rivestono un duplice ruolo nel differenziamento, agendo non solo in quello osteoblastico, ma anche in quello adipocitico. PPAR γ 2 (Peroxisome Proliferation-Activated Receptor γ 2) è coinvolto in entrambi i processi, agendo sulle cellule mesenchimali come repressore dell'osteogenesi e come induttore dell'adipogenesi. La sua delezione nei topi promuove il differenziamento osteoblastico e incrementa la massa ossea [Akune T, 2004]; PPAR γ 2 potrebbe agire legandosi a Runx2 e inibendone l'attività trascrizionale [Jeon MJ, 2003]. La famiglia dei fattori trascrizionali C/EBPs (CCAAT/Enhancer-Binding Proteins) è anch'essa implicata nella regolazione dello sviluppo osteoblastico e adipocitico. C/EBP δ modula l'espressione e l'attività di fattori di crescita coinvolti nell'osteogenesi; C/EBP δ e C/EBP β attivano la trascrizione dell'osteocalcina, agendo in sinergia con Runx2 [Gutierrez S, 2002].

Controllo dei fattori trascrizionali osteoblasto-specifici

I fattori trascrizionali che intervengono nella regolazione dell'osteoblastogenesi sono numerosi, di conseguenza il controllo della loro funzione ha un'importanza fondamentale ai fini della corretta progressione del processo di differenziamento osteoblastico. Nei processi di generazione ossea sono coinvolti molti fattori ormonali.

Gli estrogeni e i glucocorticoidi sono stati recentemente identificati come stimolatori dell'osteoblastogenesi agendo sull'attivazione di Runx2 e sui geni più a valle. Anche l'ormone della crescita è in grado di modulare l'attività trascrizionale di Runx2 nella popolazione osteoblastica promuovendone un'interazione inibitoria con la proteina STAT3 β . L'ormone paratiroideo (PTH) promuove la formazione d'osso in parte attraverso l'attivazione di Runx2, regolandone la fosforilazione o contribuendo ad inibirne la degradazione proteosomale. Il PTH aumenta l'espressione di Osx e riduce quella di PPAR γ 2 in cellule osteoprogenitrici indirizzandole verso il *lineage* osteoblastico. La vitamina D mostra un meccanismo d'azione simile a quello appena descritto, agendo su Runx2 e PPAR γ 2.

L'osteoblastogenesi è trascrizionalmente regolata da molti fattori di crescita [Hughes *et al.*, 2006]. Questi sono proteine solubili, quindi la loro modalità d'azione prevede l'interazione con recettori localizzati sulla superficie cellulare, influenzando funzioni critiche quali divisione, sintesi di matrice e differenziamento. Il fattore di crescita trasformante β (TGF- β) appartiene a una superfamiglia di proteine che regolano sia la proliferazione che il differenziamento. La maggior parte delle cellule risponde in modalità autocrina al TGF- β , ma alti livelli sono stati individuati nell'osso, nelle piastrine e nella cartilagine [Janssens *et al.*, 2005]. In seguito ad attivazione, il TGF- β interagisce con recettori serin-treonin chinasi, attivando le proteine Smad. Nelle fasi iniziali del differenziamento il TGF- β agisce nel reclutamento e nella stimolazione delle cellule osteoprogenitrici che induce a proliferare per formare la popolazione osteoblastica. Nelle fasi terminali il TGF- β ricopre, invece, un ruolo inibitorio, bloccando la mineralizzazione della matrice. Appartengono alla famiglia del TGF- β anche le proteine morfogeniche dell'osso, le BMPs. Queste proteine sono importanti regolatori della crescita, del differenziamento, della migrazione e dell'apoptosi, così come dello sviluppo e della funzionalità di molti organi e tessuti quali osso, cartilagine, cuore, cervello, pelle e reni [Chen *et al.*, 2004]. E' stato valutato l'utilizzo

Introduzione

terapeutico di queste proteine nel trattamento delle patologie ossee. Esistono più di 20 BMPs, con diversa attività biologica, ma il loro meccanismo d'azione è simile: si basa sull'interazione con due tipologie di recettori serin-treonin chinasi a diversa affinità. I recettori attivati trasmettono un segnale intracellulare che converge nella cascata degli Smad. L'effetto principale delle BMP viene esercitato sulle cellule mesenchimali indirizzandole verso l'osteoblastogenesi mediante l'attivazione di fattori trascrizionali quali Runx2, Osx e Dlx5 [Nakashima *et al.*, 2002]. I fattori di crescita fibroblastici (FGF) sono una famiglia di polipeptidi che svolgono un ruolo fondamentale nell'angiogenesi e nella mitogenesi delle cellule mesenchimali. Il fattore di crescita fibroblastico si lega a recettori tirosin chinasi (FGFR) attivando la via di segnalazione mediata dalle MAP chinasi. Le mutazioni di questi recettori sono associate ad anomalie nei processi di ossificazione e mutazioni attivanti FGFR2 sono state identificate in numerose sindromi di craniosinostosi [Ornitz *et al.*, 2002]. Sebbene gli FGFs siano coinvolti nello sviluppo osseo, non ne è ancora stato chiarito il ruolo a livello molecolare.

Anche il sistema IGF sembra avere un ruolo fondamentale ai fini dell'osteoblastogenesi così come dell'omeostasi dell'osso. Tuttavia non sono ancora stati individuati tutti i bersagli cellulari e i meccanismi molecolari responsabili del suo funzionamento [Clemens *et al.*, 2004]. IGF-1 e IGF-2 sono tra i fattori di crescita maggiormente prodotti dalle cellule dello scheletro e dagli osteoblasti *in vitro*. Essi sono coinvolti sia nelle fasi di proliferazione dei precursori degli osteoblasti negli stadi differenziativi precoci che nelle fasi più avanzate, durante il deposito di matrice. In particolare, IGF-1 interviene nelle fasi precoci del differenziamento osteoblastico, aumentando la trascrizione del collagene di tipo I e successivamente contribuendo al mantenimento di adeguati livelli di matrice ossea [Canals E, 2009].

Osteosarcoma e differenziamento osteoblastico

Sebbene gli osteosarcomi mostrino varie alterazioni genetiche e molecolari, buona parte di esse non viene rilevata nella maggioranza di queste neoplasie. Data la precoce età di insorgenza, è poco probabile che la trasformazione tumorale sia associata all'accumulo sequenziale di eventi mutazionali come avviene invece nei carcinomi. Alcuni studi ridefiniscono l'osteosarcoma come una patologia legata al differenziamento, nella quale i cambiamenti di natura genetica ed

Introduzione

epigenetica interrompono il normale andamento del processo differenziativo a partire dalle cellule staminali mesenchimali (Fig. 7).

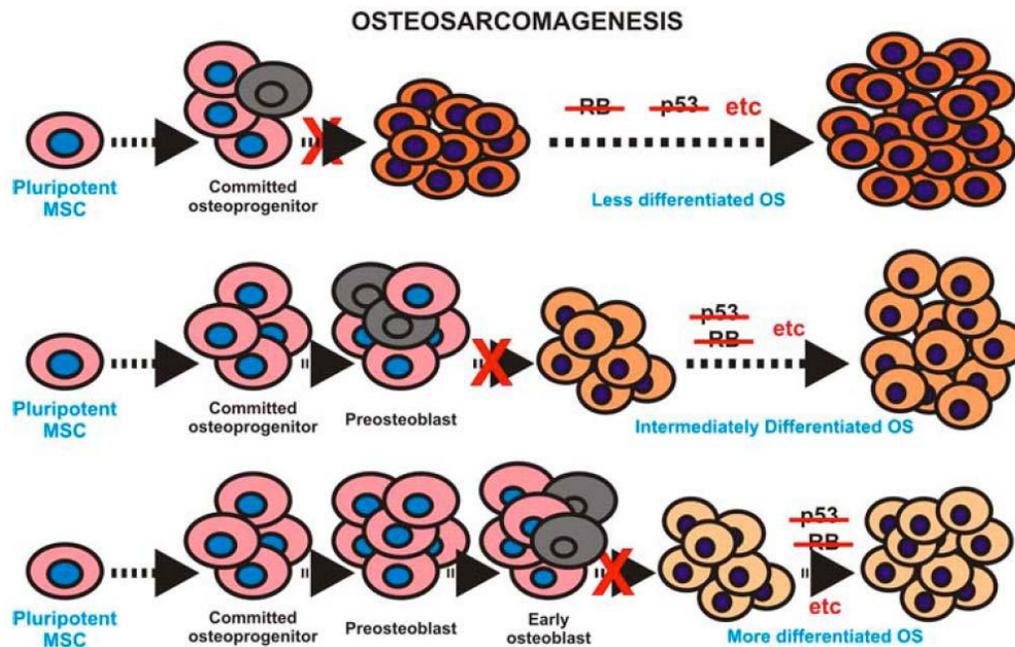


Figura 7. La de-regolazione del differenziamento osteoblastico, dovuta a cambiamenti genetici o epigenetici, potrebbe portare all'insorgenza di osteosarcomi. Difetti negli stadi precoci possono portare allo sviluppo di osteosarcomi meno differenziati e più aggressivi e viceversa. Le cellule in nero rappresentano le cellule iniziatrici del tumore [Tang *et al.*, 2008].

E' plausibile che per un sottogruppo degli osteosarcomi le cellule che danno inizio allo sviluppo tumorale presentino aspetti comuni agli osteoprogenitori *committed* dato che molti dei marcatori precoci, come la fosfatasi alcalina, e la capacità di produrre matrice ossea vengono conservati [Campanacci M, 1999]. A supporto di questa ipotesi si pone l'elevata frequenza di questi tumori durante l'adolescenza in cui la rapida crescita e l'attivo rimodellamento dello scheletro sono indice dell'intensa attività osteoblastica. La tumorigenesi può coinvolgere una de-regolazione della capacità proliferativa da parte delle cellule tumorali staminali che danno origine a una progenie osteoblastica differenziata in modo aberrante [Gibbs *et al.*, 2005]. Le somiglianze tra le

Introduzione

cellule staminali e quelle trasformate sono rilevanti dato che entrambe mostrano capacità di autorinnovamento, esprimono la telomerasi e si trovano a uno stadio indifferenziato. Una piccola popolazione di cellule tumorali di osteosarcoma si è mostrata in grado di formare colonie sferiche in sospensione e le stesse cellule esprimono marcatori di cellule staminali embrionali come Nanog e Oct 3/4. Dato il ruolo di Runx2 come mediatore trascrizionale cardine dell'osteoblastogenesi indispensabile per l'espressione dei geni associati al differenziamento osteoblastico, e' plausibile che anomalie nella sua regolazione possano giocare un ruolo importante nello sviluppo dell'osteosarcoma. Negli ultimi anni il legame tra differenziamento osteoblastico ed osteosarcoma è diventato più chiaro ma resta ancora da chiarire, tuttavia ne restano da chiarire i mediatori molecolari ed i meccanismi.

IL SISTEMA IGF

Il ruolo dei fattori di crescita nella patogenesi delle neoplasie umane è ben documentato. Diversi studi suggeriscono la dipendenza delle neoplasie dai fattori di crescita e dai loro recettori [Baserga R, 1994]. Tra questi, il sistema dei fattori di crescita insulino-simili (IGF) e la via di segnalazione mitogenica da essi regolata sembrano avere particolare importanza. Il sistema IGF, infatti, risulta essere coinvolto nella crescita e nella proliferazione cellulare, poichè ha un ruolo fondamentale nella progressione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare.

Il sistema IGF è composto dai due ligandi IGF-1 e IGF-2 e da tre recettori di membrana: il recettore di IGF-1 (IGF-1R), il recettore di IGF-2 (IGF-2R) e il recettore insulinico (IR). Esistono poi 6 proteine che legano IGF con alta affinità, le IGF-Binding Proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5, -6).

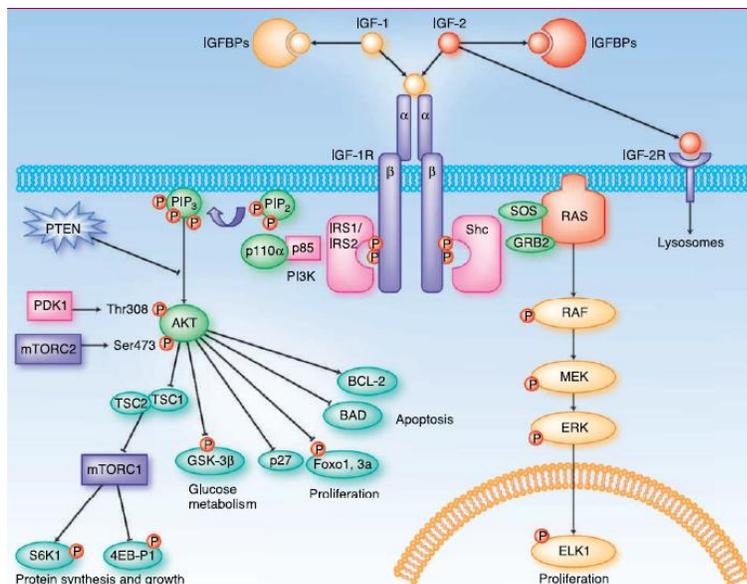


Figura 8. Componenti chiave della via di segnalazione di IGF-1R (Zha J, 2010).

I ligandi

I fattori di crescita insulino-simili 1 e 2 (IGF-1 e 2) sono piccoli polipeptidi appartenenti ad una famiglia di proteine strettamente correlate che comprendono anche l'insulina. L'insulina viene prodotta principalmente dalle cellule β -pancreatiche e tramite il sistema circolatorio raggiunge i vari tessuti dove esplica il proprio effetto. L'IGF-1 circolante è prodotto principalmente nel fegato in risposta alle stimolazioni ormonali; IGF-2 viene prodotto in età fetale da una grande varietà di tessuti, mentre nell'individuo adulto si trova prevalentemente come molecola circolante e può essere over-espresso da cellule neoplastiche [Furstenberger G, 2002]. Oltre che dal fegato IGF-1 e IGF-2 vengono prodotti anche da altri tessuti, quali il muscolo-scheletrico, l'osso e la cartilagine. Il cambiamento della concentrazione sanguigna di tali fattori dipende comunque dalla sintesi e secrezione epatica, responsabile di circa l'80% dell'IGF-1 presente nel siero.

La regolazione della produzione di IGF-1 a livello epatico è complessa e l'ormone della crescita (GH) riveste un ruolo importante in questo processo, dirigendo l'aumento dell'espressione del gene *IGF-1* nel fegato. A sua volta, la regolazione della produzione di GH avviene ad opera dell'ipofisi sotto lo stimolo dei fattori ipotalamici somatostatina e ormone di rilascio della somatotropina (GHRH), che rispettivamente ne reprimono e inducono il rilascio. All'interno di osso, tessuto muscolo-scheletrico e cartilagine, IGF-1 può avere sia funzione autocrina, legando e stimolando la crescita delle stesse cellule che l'hanno prodotto, oppure funzione paracrina, legandosi ai recettori delle cellule vicine quali le cellule epiteliali che normalmente non lo producono. L'espressione di IGF-1 varia in relazione all'età dell'individuo, aumentando dalla nascita alla pubertà e mostrando un progressivo decremento a partire dall'età adolescenziale; IGF-1 svolge quindi un ruolo importante nella regolazione della crescita dei tessuti mesenchimali, compresi il tessuto osseo e la cartilagine.

A differenza di quanto avviene per IGF-1, IGF-2 viene prodotto anch'esso dal fegato ma non subisce una regolazione di tipo ormonale; la sua produzione viene regolata dall'imprinting genomico ed è dettata dall'espressione del solo allele paterno. Inoltre, il livello di espressione di IGF-2 è pressochè costante durante la vita e risulta essere superiore di circa 7 volte rispetto ai livelli di IGF-1 [Krassas et al.,2003].

Le IGFBPs

La biodisponibilità di entrambi i ligandi IGF-1 e IGF-2 viene modulata anche dal loro legame alle IGFBP, che ne prevengono così la degradazione e ne aumentano l'emivita. Il legame tra i fattori IGF e le IGFBP può essere scisso da una famiglia di proteine dette IGFBP-proteasi [Zha J, 2010]. La famiglia di proteine cui appartengono le IGFBP mostra due caratteristiche chiave: sono ricche in cisteine e possiedono una struttura terziaria che ne consente il legame con IGF ad alta affinità. Tra le IGFBP IGF-3 è quella predominante nel siero e IGF-1 ed IGF-2 sono prevalentemente legate ad essa in un complesso ternario con la subunità ALS (acid-label subunit), una glicoproteina di 85kDa sintetizzata dal fegato, in un rapporto molare di 1:1:1. La concentrazione di IGF-1 libero nel sangue è meno dell'1% della concentrazione totale, pertanto la formazione di questo complesso ternario fa sì che la maggior parte dell'IGF-1 e IGF-2 secreti siano presenti come riserva stabile [Frystyk et al., 2004]. Anche IGFBP-5 forma lo stesso tipo di struttura con ALS e i ligandi del sistema IGF. Mentre le IGFBP da 1 a 4 mostrano la stessa affinità per IGF-1 e IGF-2, IGFBP-5 e IGFBP-6 hanno una affinità rispettivamente 10 e 100 volte superiore per IGF-2 rispetto ad IGF-1. Le proteine IGFBP non legano l'insulina. Queste proteine controllano l'azione dei fattori IGF aumentandone l'emivita e controllandone la disponibilità per il legame con i recettori. Ognuna delle IGFBP è soggetta e potenzialmente regolata dalla proteolisi effettuata da diverse proteasi. Pertanto le interazioni ligando-recettore nel sistema IGF sono soggette a complessi meccanismi di regolazione come risultato dei livelli di IGFBP, del loro profilo di espressione, del grado di associazione alla superficie cellulare e certamente della regolazione proteolitica [Clemmons D.R., 2001]. Una serie di studi ha stabilito che alcune azioni delle IGFBP sono IGF-indipendenti. In particolare, IGFBP-3 e IGFBP-5 hanno mostrato avere effetti sulla proliferazione, la migrazione e la sensibilità all'apoptosi indipendentemente dai loro effetti sul *signaling* di IGF. Alcuni di questi effetti IGF-indipendenti vengono comunque indirettamente modulati dal legame dei fattori IGF alle IGFBP; le molecole della superficie cellulare e/o intracellulari che partecipano all'esplicarsi di questi effetti non sono ancora state ben caratterizzate, ma l'esposizione a IGFBP-3 e 5 ricombinanti esogeni ha indotto la localizzazione nucleare di tali proteine. Una migliore caratterizzazione delle azioni IGF-indipendenti delle IGFBP metterebbe in luce una nuova dimensione nella comprensione del *signaling* di IGF in generale.

Il Recettore per IGF-1 (IGF-1R)

Il recettore IGF-1R è un recettore tirosin-chinasico (RTK) eterodimerico composto da due subunità α e due subunità β . Sia IGF-1 che IGF-2 sono in grado di indurre la *clusterizzazione* e l'autofosforilazione del recettore, portando all'attivazione della via di segnalazione sottostante. Al contrario, il recettore IGF-2R, conosciuto anche come recettore del mannosio-6-fosfato, non sembra in grado di regolare questo signaling, assolvendo solo alla funzione di sequestrare l'IGF-2 circolante, regolandone i livelli attraverso un'endocitosi recettore-mediata che porta alla degradazione di IGF-2 mediata dai lisosomi [Braulke T, 1999]. IGF-1R mostra un'omologia dell'84% con il dominio chinasico del recettore insulinico IR. Inoltre l'isoforma A di questo recettore (IR-A) è in grado di legare IGF-2 con alta affinità e di mediare il signaling mitogenico e di sopravvivenza cellulare [Sciaccia L, 2002]. IGF-1R è in grado di formare anche eterodimeri con il recettore insulinico, mostrando attività molto simile a quella del recettore omodimerico [Pandini G, 1999].

Una volta attivato dal legame con IGF-1, IGF-1R recluta ed attiva proteine adattatrici che portano alla regolazione di diversi processi cellulari, sia fisiologici, sia patologici. IGF-1R è infatti in grado di stimolare la proliferazione, la crescita cellulare, il differenziamento e di inibire il processo apoptotico, nonché di indurre la trasformazione neoplastica.

Andando più in dettaglio, dopo il legame con IGF-1, IGF-1R subisce la fosforilazione delle 3 tirosine del dominio tirosina chinasico, cui segue la fosforilazione di una tirosina della regione juxtamembrana, la tirosina 950. Tale tirosina viene utilizzata come punto di ancoraggio per numerosi substrati, tra cui i più importanti sono le proteine IRSs (Insulin receptor substrates) e Shc, che legano la tirosina fosforilata attraverso il dominio PTB (Phosphotyrosine Binding). Alcuni studi suggeriscono come l'attivazione di IRS-1 sia principalmente richiesta per un segnale di tipo mitogenico, mentre IRS-2 giochi un ruolo chiave nella motilità cellulare [Byron SA, 2006]. La via di segnalazione mediata da IRS-1 e quella mediata da Shc sono le principali vie di trasmissione del segnale regolate da IGF-1R.

Il reclutamento delle proteine IRS1-4 presso il recettore porta alla fosforilazione di uno o più residui specifici che fungono poi da punti di attacco per le proteine contenenti i domini SH2

Introduzione

(Src-homology 2), come PI3-K (phosphoinositide-3-kinase); in particolare legano la subunità regolatoria di PI3-K, p85. Il legame con p85 favorisce la traslocazione della subunità catalitica p110 sulla membrana cellulare, dove andrà a fosforilare il fosfatidilinositolo-(4,5)-bisfosfato (PIP2) in fosfatidilinositolo-(3,4,5)-trifosfato (PIP3). Questo evento consente il reclutamento della proteina chinasi B (AKT) e della proteina ribosomiale p70 S6 chinasi. AKT viene reclutata presso la membrana grazie all'interazione tra PIP3 e il suo dominio PH (plekstrin homology domain); l'interazione genera un cambiamento conformazionale di AKT cui segue la sua fosforilazione sui residui Ser473 e Thr308 da parte del complesso formato da PDK1 e da mTOR (mammalian target of Rapamycin) che ne porta all'attivazione [Guertin DA, 2005]. L'attivazione di AKT porta alla fosforilazione ed attivazione di diverse proteine i cui effetti principali sono l'aumento della sintesi proteica tramite l'attivazione di mTOR e l'inibizione dell'apoptosi generata dalla fosforilazione inibitoria di fattori pro-apoptotici come Bad e membri della famiglia di fattori trascrizionali Foxo, così come dall'aumento dell'espressione e dell'attivazione di proteine anti-apoptotiche quali Bcl-2, BCL-XL e il fattore nucleare kappa-B (NF- κ B). Il signaling di AKT influenza anche il metabolismo del glucosio attraverso la regolazione dell'attività di GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3) e assume un ruolo chiave nella sintesi proteica e nella crescita cellulare, regolando l'attività del complesso CRTC-1 (CREB-regulated transcription coactivator-1) attraverso una serie di eventi intermedi [Efeyan A, 2009].

Al contrario, l'attivazione di Shc stimola l'attivazione della pathway di Ras/MAP chinasi e la trasduzione di segnali mitogenici attraverso l'attivazione nucleare di ELK1 [Pollak M, 2008]. Ras è una proteina ad attività GTPasica associate alla membrana plasmatica che si trova in forma inattiva legata al GDP e viene attivata dal legame con il GTP, processo catalizzato dal fattore Sos (Son-of-sevenless). L'associazione tra Sos e il suo substrato viene mediata dalla proteina adattatrice Grb2, che lega specifiche fosfotirosine del recettore e viene attivata dall'interazione con Shc [Ravichandran KS, 2001]. Ras recluta in membrana e attiva la serina/treonina chinasi Raf, che è in grado di attivare a sua volta una cascata di proteine tirosin-chinasiche appartenenti alla famiglia delle MAP chinasi (Mitogen Activate Protein Kinase), tra cui MEK. Questi eventi portano all'attivazione di Erk1/2 (Extracellular signal-regulated kinase), tramite la doppia fosforilazione sui residui di tirosine e treonine. ERK è in grado di fosforilare diversi bersagli, sia in membrane che a livello citoplasmatico. La stessa proteina può anche traslocare nel nucleo e

Introduzione

attivare fattori trascrizionali specifici, tra cui Fos ed ELK1, implicati nella promozione della proliferazione cellulare.

IGF-1R può anche attivare SAPK (stress activated protein kinase) e JAK (Janus kinase). Le proteine SAPK, di cui fanno parte p38 e JNK (Jun N-terminal kinase), sono associate alla regolazione della risposta al danno al DNA e alla sopravvivenza cellulare. JAK-1 e JAK-2 sono invece coinvolte nella trasmissione del segnale mediate da citochine. La fosforilazione delle proteine JAK porta alla fosforilazione e dimerizzazione delle proteine STAT (Signal Transducers and Activator of Transcription), che andranno poi ad agire a livello nucleare come fattori trascrizionali.

Il controllo negativo della via di segnalazione di IGF-1R può avvenire sia attraverso la repressione dei componenti della cascata, sia interferendo con l'assemblaggio del complesso formato dal recettore e dal suo ligando. Un esempio è la repressione della via di segnalazione mediate da PI3-K attraverso l'aumentata espressione della fosfatasi PTEN, che agisce sul PIP3 defosforilandolo e impedendo un corretto reclutamento di Akt sulla membrana. La repressione della formazione del complesso ligando-recettore può invece avvenire ad opera della stimolazione di specifiche fosfatasi di membrane, tra cui SHP-2 (Src-homology 2 domain tyrosine phosphatase) e PTP-1B (protein tyrosine phosphatase 1B), che legano IGF-1R e ne modulano l'attività defosforilando specifici residui. In molti casi tale defosforilazione è legata all'internalizzazione del recettore stesso tramite endocitosi. Una volta all'interno del compartimento endosomico, il recettore può andare incontro a dissociazione dal ligando e taglio proteolitico. L'azione di due ligasi E3: Nedd4 e MDM2 (mouse double minute 2) presiede, invece, la degradazione tramite ubiquitazione del recettore internalizzato.

Il sistema IGF e lo sviluppo tumorale

Il crescente consenso che la fisiologia del sistema IGF sia rilevante nelle neoplasie origina da risultati convergenti ottenuti in modo indipendente da diverse linee di ricerca. Studi di popolazione hanno fornito evidenze della relazione esistente tra i livelli circolanti dei ligandi di questo sistema, così come variazioni polimorfiche di geni importanti, ed il rischio di insorgenza

Introduzione

del cancro e la prognosi dei pazienti. Tale correlazione risulta evidente sia da studi di laboratorio che dalla validazione di diverse terapie target [Pollak M, 2008]. Alterazioni del sistema IGF sono state riportate in diversi tipi di tumori, compresi l'osteosarcoma, il cancro ai polmoni, alla prostata e tumori gastrointestinali. Studi in vivo hanno dimostrato che un IGF-1R funzionante è necessario alla trasformazione cellulare operata da diversi oncogeni virali e cellulari e sembra essere importante anche nell'espressione di geni che regolano il ciclo cellulare, la sopravvivenza, la motilità, l'ancoraggio e il potere metastatico di queste cellule [Gallagher EJ, 2011]. Sebbene mutazioni di IGF-1R non siano state descritte in nessun tumore, numerosi polimorfismi genetici sono stati identificati nei geni codificanti IGF-1 o IGFBP3 e potrebbero svolgere un ruolo importante come fattore di rischio nel tumore al seno, al polmone e alla prostata [Habuchi T, 2006]. Un polimorfismo rilevato nella regione del promotore di IGF-1, caratterizzato da ripetizioni di citosine e adenine potrebbe essere associato a cambiamenti nei livelli di IGF-1 circolanti; l'allele contenente tali ripetizioni è presente con una maggiore frequenza in pazienti con cancro alla prostata e può essere utilizzato come fattore prognostico in pazienti affetti da cancro alla prostata con metastasi ossee [Tsuchiya N, 2006]. Modificazioni a carico di IGF-2 sono state associate allo sviluppo dell'osteosarcoma: l'ipometilazione del promotore P3 di IGF-2 correla con l'espressione del trascritto di P3 nell'osteosarcoma; l'elevata espressione di IGF-2-P3 nei campioni di osteosarcoma è dovuta all'ipometilazione di P3, che può rappresentare un evento precoce nella progressione della patologia [Li Y, 2009]. L'alterata metilazione delle isole CpG porta ad una disregolazione della trascrizione e dell'espressione di IGF-2 anche nel cancro alla mammella, dove si ipotizza l'utilizzo dell'analisi del profilo di metilazione a fini prognostici. [Shetty PJ, 2011]. Jones et al. hanno mostrato come l'espressione di IGF-1R induca la crescita tumorale e la metastatizzazione e come la diminuzione della sua espressione porti ad un decremento della crescita tumorale nella maggior parte dei tumori [Jones RA, 2009]. IGF-1R risulta essere fortemente over-espresso nelle cellule tumorali rispetto alle cellule normali ed è ubiquitariamente espresso nei tessuti cancerosi [Ouban A, 2003].

Da diversi anni è noto come l'azione trasformante di numerosi geni sia facilitata dal sistema IGF, mentre altre evidenze suggeriscono che le variazioni dei livelli di IGF circolante siano in grado di influenzare la crescita tumorale: in topi transgenici TRAMP, utilizzati per lo studio del tumore alla prostata, l'over-espressione del DNA dell'IGF-1 umano nelle cellule

Introduzione

epiteliali della prostata comporta un aumento dei livelli di IGF-1R e l'insorgenza spontanea del cancro [DiGiovanni J, 2000].

Dal punto di vista biologico, nelle prime fasi del processo di cancerogenesi, l'accumularsi di diverse mutazioni somatiche porta ad un aumento del danno al DNA nelle cellule a rischio, che normalmente verrebbero indirizzate alla morte cellulare dipendente da p53. L'aumentata attività del sistema IGF nel microambiente cellulare potrebbe svolgere un ruolo cruciale nell'influenzare il destino di queste cellule, sostenendone la proliferazione, inibendone l'apoptosi e promuovendone l'evoluzione in cellule maligne. L'incremento anche minimo della concentrazione locale di IGF così come l'over-espressione del recettore potrebbe portare all'inibizione dei processi apoptotici. Questi sono solo alcuni esempi poichè i fattori che influenzano il processo di cancerogenesi sono numerosi, ma se si considera la complessità del corpo umano e dei processi biologici, anche variazioni piccole in questa via di segnalazione potrebbero contribuire ad aumentare la sopravvivenza cellulare e a spiegare l'associazione esistente tra IGF e rischio di insorgenza del cancro. Sebbene l'over-espressione delle proteine IGFs e di IGF-1R siano state riconosciute tra i maggiori fattori promuoventi la crescita tumorale, negli anni è divenuto chiaro che questo sistema può essere alterato a diversi livelli. Queste modificazioni possono esplicarsi a livello genetico, epigenetico, di sintesi proteica o di modificazioni proteiche post-traduzionali di diverse proteine che influenzano la funzione di IGF-1R [Samani A.A., 2007]. L'over-espressione di IGF-2 in seguito a perdita dell'imprinting materno è stata rivelata in numerosi tumori, tra cui i carcinomi coloretali e il tumore di Wilms. Le cellule che invece esprimono entrambi gli alleli di IGF-2 possiedono un'aumentata produzione della proteina e questo potrebbe costituire uno dei meccanismi principali della tumorigenesi. Molti dei geni appartenenti al sistema IGF ed in grado di regolare la biodisponibilità di IGF-1 presentano polimorfismi che sembrano essere associate ad un maggior rischio di sviluppare il cancro [Le Marchand L, 2002]. Anche le variazioni di espressione delle proteine IGFBP correlano con la possibile deregolazione della disponibilità dei ligandi di IGF-1R ed anche questi fenomeni possono portare alla crescita neoplastica.

Un altro fenomeno legato all'over-espressione dei proto-oncogeni associate alla trasformazione cellulare e alla progressione tumorale è l'amplificazione genica; anche l'amplificazione del gene IGF-1R, per quanto rara, sembra essere identificata in melanomi

Introduzione

maligni, seppur con una frequenza molto bassa [Hartog H, 2007]. Anche le pro-proteine convertasi (PC) sono implicate nell'over-espressione di IGF-1 e del suo recettore; nei mammiferi sono state identificate 7 pro-proteine, esse hanno il compito di mediare il processamento dei precursori polipeptidici. La furina è implicata specificatamente nel processamento di IGF-1R, IR e dei legandi del sistema IGF, mentre numerose convertasi sono responsabili del processamento tessuto-specifico di altre proteine del sistema [Duguay SJ, 1997]. L'aumento dell'espressione delle convertasi può costituire un mezzo alternativo per l'aumento dell'attività del sistema IGF.

Nelle cellule tumorali si ritrovano spesso processi di glicosilazione aberranti che portano alla produzione di proteine non funzionali. L'alterata glicosilazione di IGF-1R è stata dimostrata in numerosi tumori, tra cui il glioma, in cui questa modificazione potrebbe svolgere un ruolo importante nella tumorigenesi [Gammeltoft S, 1988].

L'attivazione costitutiva insieme all'over-espressione di intermedi della via di segnalazione di IGF-1R, quali IRS-1 ed ERK1/2, rappresenta un altro meccanismo mediante cui un tumore può ridurre la propria dipendenza da fonti esogene di IGFs e dai livelli di espressione di IGF-1R. L'espressione di IGF-1R viene determinata principalmente a livello trascrizionale; il suo promotore è ricco di sequenze CG e contiene numerosi siti di attacco per i membri della famiglia di fattori trascrizionali Sp1. Oltre ad essi sono stati identificati nel promotore di IGF-1R e IGF i potenziali siti di legame per AP2, famiglia di fattori trascrizionali implicata nel normale processo di crescita e di sviluppo nei mammiferi, di conseguenza l'over-espressione di tali fattori potrebbe contribuire ad una migliore attività del sistema. A sostegno di questa ipotesi è stata riscontrata una forte associazione tra l'aumento dell'espressione di AP-2 e l'incremento di IGF-1R nei carcinoma mammari [Turner BC, 1998].

I geni onco-soppressori contribuiscono alla regolazione dell'espressione di IGF-1R. La perdita di tali geni, come p53, BRCA1 o WT1, risulta nell'aumento dell'espressione di IGF-1R, conseguenza della perdita del controllo trascrizionale. Al contrario, diversi oncogeni quali *c-myc* e la *proteina X* del virus dell'epatite B ne stimolano la trascrizione. p53 viene attivato in seguito a stress genotossico e ipossia ed agisce modulando negativamente il sistema IGF, tramite la repressione dell'espressione di IGF-1R, IGF-2 e IRS-1 [Werner H, 1996] e l'aumento della sintesi di IGFBP-3, riducendo così la disponibilità di IGF-1 [Buckbinder L, 1995]. L'elevata frequenza di mutazioni di p53, presente in più del 50% dei tumori, e la sua conseguenziale perdita di attività

Introduzione

repressiva, porta alla mancata repressione del sistema IGF, con il conseguente aumento di espressione delle componenti di questa via di segnalazione che porta alla progressione neoplastica. La forte relazione esistente tra p53 e IGF-1R viene confermata anche dall'attività di MDM2, coinvolta nell'ubiquitinazione di entrambe le molecole. L'attivazione di IGF-1R induce la modulazione positiva dell'espressione di MDM2, favorendo la degradazione di p53 [*Heron-Milhavet L, 2002*].

Tra le proteine spesso mutate nei tumori coinvolte nella trasduzione del segnale troviamo la fosfatasi PTEN, che regola negativamente la risposta d IGF-1. La sua perdita di funzionalità può provocare l'aumento dell'attività del sistema IGF attraverso diversi meccanismi: essa può aumentare il segnale derivante da PI3-K, può aumentare l'espressione di IGF-1R e dei suoi ligandi o, ancora, può ridurre l'espressione di IGFBP-3 [*Yi HK, 2005*].

Nelle cellule tumorali risulta essere frequentemente mutato anche IGF-2R. Questo recettore mostra un' affinità per IGF-2 di circa 10 volte maggiore rispetto a quella per IGF-1, ma non essendo provvisto di un dominio catalitico non può trasdurre il segnale. La sua funzione principale sembra essere quindi la regolazione della disponibilità di IGF-2. Nonostante questa sua funzione possa sembrare secondaria, mutazioni, perdita di eterozigosi e instabilità dei microsatellite riguardanti IGF-2R, sono spesso identificati nei tumori primary e l'espressione forzata di questo recettore si è mostrata responsabile della riduzione della capacità proliferativa in cellule di tumore della prostata [*Schaffer BS, 2003*].

Di particolare interesse è l'attenzione posta recentemente sul ruolo di IGF-1 nella patogenesi dell'osteosarcoma, derivata dalla descrizione di IGF-1 come un fattore che media gli effetti dell'ormone della crescita sull'accrescimento scheletrico. IGF-1 è infatti un potente agente mitogenico per le cellule di osteosarcoma umano [*Pollak M, 1990*] mentre la crescita di cellule di osteosarcoma murino è inibita in animali ipofisectomizzati, poichè la produzione di IGF-1 è stimolata dalla produzione dell'ormone della crescita ad opera della ghiandola pituitaria [*Pollak M, 1992*].

Strategie terapeutiche per colpire il sistema IGF

Alla fine degli anni '80 Arteaga e i suoi collaboratori provarono che la repressione di IGF-1R potesse consentire il controllo della crescita tumorale [Arteaga CL, 1989]. Tuttavia negli anni successivi tutti i tentativi di colpire questo sistema si limitarono a studi di laboratorio, poichè questo tipo di terapie venne surclassato dalla strategie per il controllo del recettore EGF (epidermal growth factor).

In tempi più recenti sono state proposte terapie basate sull'utilizzo degli inibitori tirosin-chinasici, gli RTKI (Receptor Tyrosin Kinase Inhibitor), che si sono dimostrati efficaci in diversi studi clinici e alcuni di essi sono stati approvati, ad esempio, nella terapia del cancro ai polmoni, al fegato e ai reni. Gli RTKI sono piccole molecole che competono per il legame dell'ATP all'apposito sito di legame sul recettore per IGF-1. Essi inibiscono il cambiamento conformazionale del dominio tirosin-chinasico e pur essendosi dimostrati efficaci, mostrano una scarsa specificità, poichè non sono in grado di discriminare tra IGF-1R e IR, a causa dell'alta omologia strutturale esistente tra i due recettori e della loro capacità di formare recettori ibridi. Tuttavia questo potrebbe rappresentare un vantaggio nella terapia delle tipologie di cancro in cui l'attività del sistema IGF risulta essere fondamentale per lo sviluppo tumorale. Studi clinici di fase I e fase II vengono attualmente condotti su AVE1642, BMS754807, OSI-906 e AXL1717. I risultati preliminari sono incoraggianti in diverse tipi di tumori solidi [Heidegger I, 2011]. Da non sottovalutare poi la possibilità che questi farmaci attraversino la barriera emato-encefalica, con possibili effetti neurotossici. D'altro canto, però, questi composti presentano anche il vantaggio di poter essere somministrati oralmente e di essere maggiormente bio-disponibili [D'Ercole AJ, 2008]. I primi tentativi utilizzati invece per ridurre la disponibilità del ligando utilizzavano analoghi della somatostatina, ma i trial clinici furono fallimentari, poichè non si ottenne l'abbassamento dei livelli circolanti di IGF-1. Sono in fase di studio pre-clinico strategie che utilizzano le IGF-BPs per sequestrare IGF-1 e anticorpi che agiscono più a monte, inibendo il GH, ma i risultati sono ancora da valutare.

Lo sviluppo di anticorpi umanizzati, i progressi in materia di topi geneticamente ingegnerizzati a la disponibilità di librerie fagiche di anticorpi umani, ha portato alla creazione di

Introduzione

una classe di prodotti innovativa: gli anticorpi monoclonali umanizzati e completamente umani, in grado di ovviare ai problemi di immunogenicità provocati dagli anticorpi murini [Corvaia N, 2009]. Le terapie che prevedono l'impiego degli anticorpi monoclonali sono diverse, ma il meccanismo di funzionamento è ricorrente: devono inibire il legame di entrambi i ligandi IGF-1 e IGF-2 al recettore, devono indurre la down-regolazione dello stesso recettore, ma devono anche essere in grado di non interferire con il funzionamento del recettore insulinico. Ad oggi sono però pochi i composti che soddisfano questi criteri. L'esperienza migliore si è ottenuta con l'anticorpo CP-751871 prodotto dalla Pfizer, che sembra aumentare anche l'effetto dei farmaci chemioterapici normalmente utilizzati nella terapia dei tumori squamosi. Si apre quindi una nuova prospettiva nel trattamento combinato delle neoplasie [Gualberto A, 2008]. Molti altri anticorpi sono ancora in fase di studio clinico, ma sembra abbiano effetto solo in pochi pazienti. La sfida più importante è legata all'espressione del recettore per IGF-1, presente in molti tessuti: sarebbe importante riuscire a definire le tipologie di tumori che potrebbero risentire maggiormente di questo tipo di trattamento, anche tenendo conto dell'attuale mancanza di marcatori molecolari che possano essere in grado di predire la resistenza o la sensibilità a queste terapie. Un primo tentativo potrebbe essere fatto nei pazienti affetti da tipologie neoplastiche in cui è nota la correlazione tra l'aumento dell'espressione di IGF-1R e la prognosi, come nel caso del tumore ovarico [Spentzos D, 2007].

Attualmente sono in corso moltissimi trials clinici con anticorpi contro IGF-1R, anche in combinazione con farmaci tradizionali. Essi si pongono anche l'obiettivo di identificare e validare nuovi marcatori che possano predire la risposta alle terapie contro il recettore di IGF-1; un'altra necessità è certamente quella di chiarire il ruolo delle varie componenti del signaling di IGF-1R nell'insorgenza dei tumori resistenti alla terapia. A questo proposito è possibile che la perdita di funzionalità di PTEN porti all'attivazione della cascata del segnale a valle del recettore, rendendo inefficace il trattamento contro IGF-1R; in questo caso le mutazioni inattivanti di PTEN potrebbero essere considerate marcatori di resistenza. Un esempio di anticorpo contro il recettore di IGF-1 è l'IMC-A12 (cixutumumab) somministrato sia da solo che in combinazione con altri farmaci come erlotinib o gemcitabina in diversi tipi di tumori neuroendocrini, nel tumore alla prostata, nel cancro alla mammella, al colon, al pancreas e al fegato e nel sarcoma di Ewing. Tra gli altri ricordiamo AMG-479 (ganitumab) e MK 0646 (dalotuzumab) [Scartozzi M, 2011]. Quest'ultimo inibisce l'attivazione del recettore provocata sia da IGF-1 che da IGF-2, esercitando

Introduzione

un significativo effetto sulla fosforilazione di IRS-1/2 e Shc. Sono attualmente in corso dei trials clinici per valutarne l'efficienza in combinazione ad altri farmaci, poiché i risultati ottenuti in monoterapia non hanno dato esiti soddisfacenti [Corvaia N, 2009] [Reidy-Lagunes DL, 2012].

Anche nel trattamento dell'osteosarcoma sono stati ottenuti risultati incoraggianti con le terapie anti-IGF-1R che includono l'utilizzo di anticorpi e inibitori dell'attività chinasi del recettore, interferendo sia con l'attività del recettore che con la biodisponibilità dei suoi ligandi [Picci P, 2008]. Uno dei più promettenti anticorpi monoclonali contro IGF-1R è l'R1507 (Roche). Gli studi inerenti questo anticorpo sono stati condotti su diverse linee di osteosarcoma, utilizzandolo sia da solo che in combinazione con l'inibitore di mTOR rapamicina. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'anticorpo R1507 è in grado di reprimere l'attivazione di Akt IGF-1R-dipendente in tutte le linee di osteosarcoma analizzate [Kolb EA, 2010], interferendo con l'attività anti-apoptotica esercitata da Akt. Sono attualmente in atto studi clinici di fase I e II [Seccareccia E, 2012]. Anche il targeting di IGF-1R con AG1024 in concimitanza all'utilizzo della doxorubicina ha mostrato effetti benefici su alcune linee di osteosarcoma, riducendo la proliferazione cellulare ed aumentandone l'apoptosi [Luk F, 2011].

Tuttavia gran parte degli anticorpi monoclonali aventi come target IGF-1R non inibiscono la trasduzione del segnale mediata dal recettore ibrido; le uniche eccezioni sono il figitumumab e SCH717454 (Schering-Plough). Quest'ultimo inibisce la fosforilazione di IGF-1R mediata sia da IGF-1 che da IGF-2, ma non l'attività di IR stimolata da IGF-2 [Feng Y, 2012]. Le stesse osservazioni sono state effettuate nel sarcoma di Ewing utilizzando gli anticorpi AVE1642 e NVP-AEW541 [Garofalo C, 2011].

E' chiaro quindi che gli anticorpi contro IGF-1R non sono in grado di reprimere completamente il segnale trasmesso da questo recettore, poiché non influenzano il legame di IGF-2 al recettore insulinico o al recettore ormonale HR. Pertanto una terapia combinata con anticorpi specifici per IGF-1R e per IGF-2 potrebbe avere maggiore effetto, portando ad una più consistente inibizione della tumorigenesi dovuta al sistema IGF. E' altresì importante sottolineare come l'effetto degli anticorpi utilizzati in monoterapia abbia come effetto principale la stabilizzazione della malattia, mentre quando associati ad altre terapie danno effetti di maggior rilievo [Scartozzi M, 2011].

Introduzione

Un'altra strategia terapeutica in sperimentazione è quella che utilizza oligonucleotidi antisenso (ASO) contro IGF-1R. Gli ASO sono corte molecole di DNA o RNA a singolo filamento complementari al target prescelto; vengono introdotti nella cellula e si legano alla sequenza complementare nel trascritto target, questo risulta nel blocco, nella degradazione e nella riduzione della traduzione del gene target [Di Cresce C, 2010]. Modelli preclinici hanno mostrato come il targeting dell'mRNA per IGF-1R tramite gli ASO porti ad una riduzione dei livelli del recettore con conseguente riduzione della crescita cellulare, induzione dell'apoptosi e inibizione della trasduzione del segnale di IGF-1R in diversi modelli di cancro, quali il cancro al polmone, alla mammella e al pancreas [Shen YM, 2008]. A livello clinico la loro efficacia è stata dimostrata, ad oggi, solo nell'astrocitoma [Heidegger I, 2011].

Le molecole che inibiscono IGF-1R e gli altri elementi di superficie del sistema IGF costituiscono una promettente classe di farmaci nel trattamento del cancro. Tuttavia, visto il forte cross-talk esistente tra IGF-1R ed IR, una terapia basata su target più specifici potrebbe dare migliori risultati e ridurre gli effetti indesiderati. In particolare, nel caso dell'osteosarcoma, visto il legame esistente tra il grado di differenziamento delle cellule e la severità della patologia, il circuito del recettore di IGF-1, coinvolto nei processi differenziativi di varie tipologie cellulari, potrebbe essere utilizzato per promuovere il differenziamento osteoblastico e migliorare la prognosi.

IRS-1 (Insulin receptor substrate-1)

La famiglia di proteine IRS

I membri appartenenti alla famiglia di proteine adattatrici IRS sono 6 (IRS-1-6). IRS-1 e IRS-2 sono largamente espresse in diversi tessuti, inclusi cervello, muscoli, cuore, tessuto adiposo, reni, ovaio e ghiandola mammaria [Wu X, 2000], mentre l'espressione di IRS-4 è limitata solo al timo e al cervello. IRS-3 è espresso nei roditori e non ne è ancora stato trovato un omologo nell'uomo [Lavan BE, 1997]. Gli altri due membri della famiglia IRS-5 e IRS-6 sono considerati parenti lontani e sono più simili tra loro che non agli altri membri della famiglia [Cai D, 2003]. A causa della loro vasta espressione tissutale nei roditori e nell'uomo, IRS-1 e IRS-2 sono le componenti di questo gruppo di proteine più studiate; la loro struttura proteica è molto simile: entrambe contengono un dominio N-terminale altamente conservato, con i domini PH (plestrin homology) e PTB (phosphotyrosine binding) che mediano il legame al recettore insulinico IR e al recettore per IGF-1 [White MF, 2002] [He W, 1996]. Pur essendo strutturalmente molto simili, IRS-1 e IRS-2 non hanno una funzione ridondante, infatti topi privi di IRS-1 si presentano di piccole dimensioni alla nascita e restano nani durante tutta la vita, dimostrando il coinvolgimento di IRS-1 nella regolazione della crescita somatica. Topi deficienti per IRS-1 sviluppano resistenza all'insulina ma non progrediscono ad uno stadio di diabete conclamato, poiché mantengono il normale numero di cellule β -pancreatiche. I topi totalmente privi di IRS-2 sono invece di dimensioni normali ma mostrano difetti cerebrali, risultato di una riduzione della proliferazione neuronale pari al 50%, e sviluppano il diabete [Araki E, 1994] [Schubert M, 2003]. Nella porzione C-terminale le proteine IRSs contengono numerosi residui di tirosina e serina che fungono da siti di attracco per le proteine contenenti domini SH2, come PI3-K, Grb2, SHP2 ed altre. In seguito alla fosforilazione dei residui di tirosina e serina le proteine adattatrici a valle vengono reclutate ed attivate. Gli effettori meglio caratterizzati sono PI3-K ed ERK1/2. I recettori IR e IGF-1R e le loro vie di segnalazione, che prevedono il binding delle proteine IRS, sono conosciute come pathway canoniche di queste proteine, ma ciò non toglie che esse siano coinvolte anche in altre pathway non canoniche indipendenti dal legame con i recettori del sistema IGF, incluse le

Introduzione

pathway stimulate dalle citochine (come IL-4) o dagli ormoni (prolattina e GH). Ad esempio, i recettori citochinici possono attivare la tirosin-chinasi citoplasmatica JAK che fosforila e attiva le proteine IRSs [Burfoot MS, 1997]. Il contenuto cellulare delle proteine IRSs viene regolato a diversi livelli. Tra questi troviamo la modulazione della sua trascrizione genica e la regolazione della sua degradazione.

IRS-1

Il gene per IRS-1 è localizzato sul cromosoma 2q36. IRS-1 è stato a lungo considerato un tipico esempio di molecola citosolica coinvolta nella trasduzione del segnale a partire da due tirosin-chinasi di membrana, IR ed IGF-1R. Questa fosfoproteina idrofila è il principale substrato di risposta all'insulina, ma può essere attivato da molti altri sistemi, incluso, appunto, il recettore per IGF-1, molte interleuchine (IL-2, IL-4, IL-9, IL-13 ed IL-15), l'ormone della crescita, la leptina, il VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), membri della famiglia delle integrine e l'interferone (INF- α - β e INF- γ). A causa della sua sensibilità allo stimolo insulinico è implicato anche nel controllo del glucosio, della deposizione dei lipidi e della sintesi del glicogeno.

Sun et al. nel 1991 la descrissero come una proteina citosolica con peso molecolare predetto di 131 kDa, ma che sull'SDS-PAGE migrava ad un'altezza compresa tra 170 e 185 kDa, da qui il nome con cui fu indicata, pp185. La differenza di peso riscontrata è dovuta alle molteplici fosforilazioni che la proteina subisce sui residui di serina e tirosina a seguito dell'attivazione del recettore insulinico [Sun XJ, 1991]. IRS-1 contiene infatti 21 potenziali siti di fosforilazione in tirosina, con 6 di essi nel motivo YMXM e 3 nel dominio YXXM, così come 30 potenziali siti di fosforilazione in serina/treonina riconosciuti da varie chinasi e attraverso i quali viene modulato il segnale insulinico [Whitehead JP, 1998]. La fosforilazione di IRS-1 in tirosina è funzionale al ruolo di ancoraggio multi-sito svolto da questa proteina con i motivi della sequenza amminoacidica attorno ai residui di fosfotirosina che fungono da siti di legame specifici per le proteine contenenti i domini SH2 [Krook A, 1996]. Tra queste troviamo le proteine adattatrici Grb2, Nck e Crk II, la tirosin-fosfatasi SHP2, la tirosin-chinasi Fyn e PI3-K. Oltre ad esse anche 14-3-3 e gli antigeni del poliomavirus possono legarsi ad IRS-1, contribuendo alla

Introduzione

trasformazione maligna e associandosi alla proteina in maniera indipendente dalla fosforilazione in tirosina.

Il ruolo di IRS-1 è proprio quello di fungere da supporto per il legame e l'attivazione di altre proteine ed enzimi: non è nota per IRS-1 un'attività di tipo enzimatico [Reiss K, 2012].

I due principali domini di IRS-1, PH e PTB, mostrano funzioni distinte: il dominio PH contiene una tasca di legame carica positivamente che media l'interazione con fosfolipidi e proteine contenenti un motivo acidico [Myers MG, 1995]; il dominio PTB ha invece la capacità di riconoscere residui tirosinici fosforilati attraverso il dominio NPXY, fornendo un meccanismo di accoppiamento tra IRS-1 e le tirosine 950 e 960 della regione juxtamembrana di IGF-1R e IR rispettivamente [Craparo A, 1995] [Eck MJ, 1996].

IRS-1 partecipa anche alla regolazione dei processi di riparo del danno al DNA, infatti il legame e la ritenzione citoplasmatica della proteina legata alla riparazione del danno al DNA, Rad51, da parte di IRS-1 in forma ipofosforilata viene inibito in cellule stimulate con IGF-1, indicando fortemente un'implicazione dell'asse IGF-1R/IRS-1 nel riparo al danno al DNA tramite ricombinazione omologa (HRR) [Trojanek J, 2003].

Una delle vie di segnalazione mediata da IRS-1 e più studiate è certamente la via della PI3-K. Come precedentemente ricordato, l'associazione della subunità regolatoria p85 del PI3-K con IRS-1 fosforilato in tirosina, porta alla localizzazione in membrana e attivazione della subunità catalitica p110 di PI3-K, generando il fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato e 3,4-bifosfato. Questi prodotti lipidici inducono l'attivazione di una serie di segnali chinasi, inclusa quella della serin-treonina chinasi Akt [Lawlor MA, 2001]. L'attivazione di Akt e delle molecole *downstream* mediano diverse azioni metaboliche dell'insulina, quali la traslocazione del GLUT-4 e il trasporto di glucosio, la fosforilazione di GSK-3 e la sintesi di glicogeno, l'attivazione di mTOR e l'attivazione della sintesi proteica [Mendez R, 2001]. Altri effetti dell'insulina, come ad esempio il suo segnale mitogenico, sono mediati dall'associazione di Grb2 con Shc e IRS-1/2 fosforilati in tirosina, che portano all'attivazione di MAPK [Ogawa W, 1998]. Possono però partecipare all'esplicarsi di questi effetti anche altre cascate di segnale. Sia nella pathway di IR che in quella di IGF-1R, esistono molti meccanismi a feedback, ad esempio l'attivazione di MAPK può anche provocare un aumento nella fosforilazione di IRS-1 in serina 616 [De Fea K, 1997], mentre

Introduzione

L'attivazione di JNK porta alla stimolazione della fosforilazione di IRS-1 in serina 322. Un altro aspetto importante della regolazione di IRS-1 è infatti la sua fosforilazione sui residui di serina che, al contrario di quanto avviene con le fosforilazioni in tirosina, sembrano inattivare alcune delle più importanti funzioni di questa proteina di ancoraggio e potrebbero essere responsabili dello sviluppo dell'insulino-resistenza mediata da TNF- α [Hotamisligil GS, 1996]. I residui di serina meglio caratterizzati sono il 307 (nel topo)/312 (uomo), fosforilati in seguito all'attivazione di PI3-K, PKC, JNK e TNF- α ; la serina 612 viene invece fosforilata dalle MAPK; la fosforilazione del cluster di serine 632, 662 e 731, fosforilate da parte di Akt/mTOR, può portare alla degradazione di IRS-1. L'attivazione della serina 789 che segue la fosforilazione mediata da AMPK, può avere come conseguenza un'aumento dell'associazione di IRS-1 al recettore insulinico [Schmitz-Peiffer C, 2003]. Curiosamente, elevati livelli di fosforilazione dei residui serinici di IRS-1 facilitano l'interazione con le integrine, anche se sono le stesse fosforilazioni in serina ad inibire il binding tra IRS-1 e l'antigene-T di JCV [Lassak A, 2002].

Esistono molti potenziali meccanismi tramite cui l'iperfosforilazione delle proteine IRS in serina/treonina può bloccare il segnale generato dall'insulina. Tra questi il disaccoppiamento delle proteine IRS dal citoscheletro e/o dalle componenti di membrana, che provoca la traslocazione di IRS-1 nel citosol [Clark SF, 2000], l'inibizione dell'interazione IR/IRS, l'inibizione dell'associazione delle proteine contenenti domini SH2/IRS, quali PI3-K e l'inibizione dell'attività fosfotrasferasica di IR [Li J, 1999].

Diversi studi hanno dimostrato il ruolo di IRS-1 nella regolazione delle dimensioni cellulari, nella promozione della proliferazione e del differenziamento, soprattutto quando attivato dal segnale proveniente da IGF-1R [Valentinis B, 1999] [Valentinis B, 2000] [Chang Q, 2002] [Cristofanelli B, 2000].

IRS-1 trasloca nel nucleo e nei nucleoli dopo stimolazione con IGF-1 o tramite interazione con l'antigene T del virus SV40 o il suo equivalente umano. Nel nucleo IRS-1 lega il fattore UBF1 (Upstream Binding Factor), una proteina coinvolta nella regolazione della sintesi dell'RNA ribosomale e quindi nella regolazione delle dimensioni cellulari. Questa scoperta costituisce una spiegazione molecolare al fatto che sia nel topo che nella *Drosophila* IRS-1 e il suo omologo controllano il 50% delle dimensioni del corpo [Pete G, 1999]. La localizzazione nucleare di IRS-1 è stata riscontrata in sezioni di cancro alla mammella umano, di medulloblastoma umano e nel

Introduzione

fegato di ratti adulti. Insieme ad IRS-1 sono state ritrovate nel nucleo anche altre proteine della pathway di IGF-1R, come PI3-K e Akt, PTEN ed ERK. La localizzazione nucleare di PTEN non sopprime la crescita e questo spiega perchè IRS-1 nucleare stimola c-myc e i promotori dell'RNA ribosomiale non richiedono l'attività di PI3-K. La traslocazione di IRS-1 richiede il dominio PTB dopo la stimolazione di IGF-1 o il dominio PH per la traslocazione dell'antigene T, una proteina nucleare. Il dominio PTB è anche il dominio richiesto per l'interazione con IGF-1R e IR, come precedentemente detto. Anche quando IRS-1 è traslocato nel nucleo, la stimolazione da parte di IGF-1 è ancora richiesta per l'occupazione del promotore. IRS-1 non viene ritrovato sul promotore di cellule in fase G0. L'occupazione del promotore è accompagnata da un aumento dell'attività trascrizionale. Quindi IRS-1 può anche agire come co-fattore trascrizionale. Una possibilità è che IRS-1 nel nucleo agisca come facilitatore trascrizionale, attraverso il legame all'istone H1 [Baserga R, 2009].

IRS-1: degradazione

La degradazione di IRS-1 avviene tramite l'azione del proteasoma, che degrada gran parte delle proteine cellulari con breve emivita e per questo gli sono state attribuite molte funzioni biologiche, incluso il controllo del ciclo cellulare, la regolazione della morte programmata e la presentazione dell'antigene [Ciechanover A, 1994].

Il meccanismo di degradazione di questa proteina è stato oggetto di molti studi. In diversi sistemi gli inibitori selettivi di PI3-K ed mTOR inibiscono la degradazione di IRS-1 stimolata dall'insulina, confermando l'ipotesi che la degradazione di IRS-1 sia iniziata dall'asse PI3-K/Akt/mTOR [Berg CE, 2002]. Ad ogni modo, siccome questi inibitori potrebbero avere effetti addizionali sconosciuti, sarebbe importante confermare ulteriormente questi risultati. A questo proposito, una scoperta importante è stata quella di Takano et al., che afferma che l'espressione di PI3-K costitutivamente attiva legata alla membrana, p110_{CAAX}, induce la degradazione di IRS-1 e la sua iperfosforilazione in serina-treonina. Questi risultati suggeriscono come l'over-espressione della cascata di PI3-K guidi la degradazione di IRS-1 [Takano A, 2001]. Ad oggi non ci sono studi che confermino la capacità dell'insulina di indurre la degradazione di IRS-1 in modelli in cui PI3-K venga persa, o anche altre componenti a valle della stessa pathway. Prove a

Introduzione

sostegno di questo modello includono la scoperta che specifici inibitori della subunità 26S del proteasoma bloccano la degradazione di IRS-1 ma non la sua fosforilazione in serina-treonina. Più recentemente, un mutante temperatura-sensibile dell'attività ubiquitina-attivante dell'enzima E1 è stato in grado di bloccare completamente la degradazione di IRS-1 stimolata dall'insulina. Oltre a questo, numerosi studi riportano come l'insulina stimoli l'ubiquitinazione di IRS-1 [Zhande R, 2002]. La fosforilazione in serina-treonina correla con la degradazione di IRS-1, suggerendo che essa porti poi alla sua degradazione. L'identificazione di siti di fosforilazione regolatori richiesti per la degradazione di IRS-1 e della chinasi che fosforila questi siti è un presupposto necessario per comprendere meglio questo meccanismo. Nel 2003 Greene et al., mostrarono come l'inibizione della degradazione di IRS-1 tramite l'utilizzo di inibitori della cascata di segnalazione PI3-K/Akt/mTOR correli con l'inibizione della fosforilazione in Ser312 di IRS-1. Inoltre, la degradazione stimolata dall'insulina della proteina mutata in Ser312 risultava diminuita rispetto all'inibizione della degradazione della proteina wild-type (wt); al contrario, un mutante di IRS-1 in cui Ser616 venne sostituita con un residuo di Alanina, mostrava lo stesso livello di degradazione della proteina wt. Lo stimolo alla degradazione risulta essere parzialmente bloccato con molecole inibitorie di JNK. Tuttavia, la fosforilazione in Ser312 stimolata dall'insulina potrebbe non essere dovuta a JNK, poiché altri inibitori, come LY294002, sono in grado di bloccare questo processo senza perturbare l'attività di JNK. Questo studio indica quindi che la fosforilazione in Ser312 è necessaria affinché IRS-1 venga degradato e suggerisce che la fosforilazione in Ser312 possiede un doppio meccanismo di regolazione del segnale proveniente dalla stimolazione esercitata dall'insulina: inibisce l'interazione del recettore con IRS-1 e indirizza IRS-1 verso la degradazione [Greene MW, 2003].

Studi successivi affermano, invece, un ruolo preponderante di mTOR nella regolazione della degradazione di IRS-1, affidandogli la direzione di tale processo insieme a JNK, ma in maniera indipendente da quest'ultima. I residui fosforilati in questo caso sono Ser307 e Ser636/639.

Un altro regolatore comprovato della degradazione di IRS-1 è la caveolina 1 (cav1). Entrambe queste molecole interagiscono con una moltitudine di proteine e non è quindi sorprendente che interagiscano anche tra loro, ma lo è invece il fatto che si stabilizzino a vicenda. L'espressione della caveolina 1 stabilizza quella sia di IRS-1 che di IRS-2, ma Akt, S6K ed ERK

Introduzione

risultano espressi a livelli normali in cellule KO (Knock-out) per questi due effettori di IGF-1R. La loro fosforilazione risulta però inibita [Salani B, 2008]. La stabilizzazione di cav1 e IRS-1 è reciproca e tale correlazione è valida in diverse linee cellulari e in selezionati modelli murini. La down-regolazione di una delle due porta alla down-regolazione dell'altra e la down-regolazione di entrambe porta alla loro degradazione. Non è noto quale dei due processi avvenga prima, è noto solo che le sequenze richieste per l'interazione IRS-1/cav1, e la conseguente stabilizzazione, sono la Tyr14 per cav1 e il dominio PTB per IRS-1. Questo conferma l'intuizione di Lee et al. che la Tyr14 di cav1 sia un sito di ancoraggio per molecole con siti di legame fosforilati in tirosina. L'interazione protegge entrambe le proteine dalla degradazione proteasomica. La capacità che l'espressione di IRS-1 e/o IRS-2 aumenti la capacità di adesione delle cellule potrebbe essere un effetto dell'espressione di cav1, poiché questa proteina è nota essere coinvolta nell'adesione cellulare [Parton RG, 2007] [Lee H, 2000]. Questa spiegazione potrebbe anche dar conto della paradossale situazione di alcune cellule neoplastiche metastatiche che mostrano livelli di espressione molto bassi di IRS-1, come le LnCaP e le BT-20 [DeAngelis T, 2006] [Reiss K, 2001]. Fisiologicamente, alcuni degli effetti di IRS-1 sulla proliferazione, l'adesione e la motilità cellulare potrebbero essere spiegati dal suo effetto sui livelli di cav-1 [Chen J, 2008].

IRS-1 e lo sviluppo tumorale

Come precedentemente riportato, il recettore IGF-1R agisce tramite diverse vie di segnalazione ma le sue pathway mitogeniche sono essenzialmente due: PI3-K ed ERK [O'Connor R, 2003]. L'attivazione della pathway di PI3-K da parte di IGF-1 è mediata proprio da IRS-1 ed IRS-2. IRS-1, soprattutto quando attivato da IGF-1R, trasmette un forte segnale mitogenico, anti-apoptotico e proliferativo [Baserga R, 2000]. L'espressione di IRS-1 risulta essere spesso aumentata nei tumori umani quali cancro alla mammella, alla prostata, al pancreas e al fegato e per questo ne è stato postulato un ruolo cruciale nello sviluppo delle neoplasie [Chang Q, 2002]. L'over-espressione di questa proteina causa infatti la trasformazione cellulare, incluse le capacità di formare colonie in soft agar e dare tumori in modelli murini [Valentinis B, 1999]. Esistono comunque linee cellulari di cancro che non esprimono IRS-1, come nel caso delle BT-20, cellule di carcinoma mammario che esprimono IRS21 ma non IRS-1 e non sono in grado di formare

Introduzione

colonie in soft agar, se non quando esprimono IRS-1 in maniera ectopica. Tuttavia possono formare tumori nei topi anche quando non esprimono IRS-1 e questo non è sorprendente, infatti ogni *gain* nelle funzioni a valle di IRS-1 può provocare la trasformazione cellulare anche in assenza di IRS-1 o di IGF-1R. In cellule che non esprimono o esprimono IRS-1 a livelli molto bassi, come nel caso delle cellule mieloidi e delle cellule neuronali, l'attivazione di IGF-1R porta al differenziamento. Infatti IRS-1 è solitamente assente o espresso a bassi livelli nelle cellule che sono in grado di differenziare; ad esempio la linea precursore mieloide 32D non esprime IRS-1 e quando sottoposta allo stimolo di IGF-1 è indotta a differenziare. L'espressione ectopica di IRS-1 in queste cellule provoca una riduzione della capacità differenziativa e stimola la formazione di tumori nei topi [Valentinis B, 1999]. Allo stesso modo la regolazione negativa di IRS-1 tramite, ad esempio, l'utilizzo di siRNA o molecole antisense provoca la reversione del fenotipo maligno. La capacità di IRS-1 di provocare la trasformazione cellulare e la tendenza di perdere il fenotipo trasformato da parte di cellule che lo esprimono a bassi livelli o che ne subiscono la down-regolazione suggerisce che l'importanza di IGF-1R nello sviluppo tumorale possa dipendere da IRS-1 oltre che dal recettore stesso [Baserga R, 2009]. Infatti l'utilizzo di un anticorpo contro IGF-1R si è rivelato inutile sulla linea di cancro alla mammella T47D-YA quando le proteine IRS non risultavano espresse [Byron S.A, 2006].

Per quanto sin ora detto IRS-1 è una proteina multifunzionale coinvolta nella trasformazione del fenotipo. E' plausibile che esso assuma un ruolo fondamentale in tutte le tipologie di cancro in cui risulta essere coinvolto il recettore IGF-1R e potrebbe essere quindi considerato un biomarcatore per quei tumori che possono essere obiettivo di anticorpi contro IGF-1R. Molto probabilmente la trasformazione tumorale mediata da IRS-1 è dovuta alla sua traslocazione a livello del nucleo e dei nucleoli, dove IRS-1 può agire come co-fattore trascrizionale e facilitare la trascrizione, come la nucleolina e alcune proteine istoniche [Angelov D, 2006].

IRS-1 è importante nella trasformazione cellulare attraverso la regolazione degli oncogeni come l'antigene T del virus SV40 e v-src e può essere attivato da altri recettori per fattori di crescita, come EGFR. Negli embrioni di topo l'espressione di IRS-1 inibisce il differenziamento [Rubin R, 2007]. Naturalmente quanto detto sin ora riguardo l'importanza di IGF-1R e di IRS-1 nello sviluppo del cancro può essere vero per alcuni casi ma non per altri. Quando IGF-1R è una

Introduzione

componente significativa nella crescita della popolazione cellulare, come nel caso delle cellule di cancro al colon metastatizzante, allora IRS-1 potrebbe essere un fattore cruciale. In altre situazioni dove il ruolo del recettore per IGF-1 è ridotto o interamente assente, allora l'importanza di IRS-1 può essere minore. Non dovrebbe essere difficile poter validare IRS-1 come marcatore biologico del cancro, poichè la sua localizzazione sub-nucleare è facilmente dimostrabile in sezioni tissutali. Koda et al., hanno dimostrato su campioni cancro alla mammella come i livelli di IRS-1 possono predire la gravità della patologia [Koda M, 2005]. Più problematico è invece avere delle prove inerenti la fosforilazione di IRS-1, poichè gli anticorpi esistenti sono notoriamente poco specifici nelle sezioni tissutali.

IRS-1 e il differenziamento

Il ruolo di IRS-1 nel differenziamento è quanto mai controverso, anche a causa del fatto che questo tipo di studi non sono numerosi. La letteratura si divide, infatti, tra studi che riportano un'attività di IRS-1 come promotore del differenziamento ed altri che ne descrivono la funzione inibitoria nell'ambito differenziativo in diversi contesti neoplastici.

I fattori IGF e l'attivazione dei loro recettori sono importanti per la miogenesi. In particolare, l'attivazione sostenuta del segnale di IGF, tramite espressione costitutiva di IRS-1, provoca una riduzione della miogenesi, mentre l'inibizione di IRS-1 e la successiva mancata attivazione di Akt promuovono il differenziamento e l'ipertrofia delle cellule muscolari [Lee CS, 2010]. Hakuno et al. propongono un duplice ruolo di IRS-1 nel differenziamento mioblastico, in relazione alle fasi di realizzazione di tale processo: nelle fasi precoci si ha l'inibizione della cascata IRS-1/PI3-K/Akt, mentre nelle fasi successive questa via di segnalazione è attiva e promuove il differenziamento mioblastico. Questo tipo di differenziamento risulta quindi legato ad una fine regolazione dell'attivazione della cascata del segnale di IGF-1R [Hakuno F, 2011].

IRS-1 è implicato anche nel differenziamento di altre tipologie cellulari, quali quelle del tessuto adiposo. Pre-adipociti in cui IRS-1 è stato artificialmente inattivato non riescono a

Introduzione

differenziare in adipociti maturi, indicando che IRS-1 ha un ruolo critico nella trasduzione del segnale generato da IR e IGF-1R nella maturazione di queste cellule [Cypess AM, 2011].

Il gruppo di Baserga diversi anni fa dimostrò come cellule ematopoietiche 32D del *lineage* mieloide stabilmente trasfettate con cDNA per IRS-1 perdano la capacità di differenziare e proliferino indefinitamente, formando tumori negli animali [Valentinis B, 2001]. Studi successivi consentirono di collocare IRS-1 in un quadro più complesso riguardante la regolazione del differenziamento di tali cellule, poichè fu dimostrato che se la sovra-espressione di IRS-1 provoca un arresto del differenziamento, la sovra-espressione dell'altro maggiore substrato di IGF-1R, Shc, promuove il differenziamento delle cellule 32D, così come l'utilizzo di una forma dominante negativa della stessa proteina lo inibisce parzialmente, facendo pensare ad un modello in cui il processo differenziativo viene regolato attraverso la modulazione dei livelli di entrambe le proteine considerate e facendo intendere la complessità del ruolo che IRS-1 riveste in questo contesto.

IRS-1 è implicato anche nella carcinogenesi intestinale, sotto il diretto controllo del complesso TCF/LEF- β -catenina ed in particolare regola il differenziamento delle cellule epiteliali intestinali. I risultati ottenuti da Esposito et al. hanno mostrato come i livelli di IRS-1 vengano modulati, insieme a quelli di IR- β , IGF-1R e β -catenina, durante il differenziamento delle linee cellulari Caco-2 e HT29. La sua presenza è associata al cancro del colon-retto e l'aumento di IRS-1 nelle metastasi epatiche lascia pensare ad un suo possibile ruolo anche nella metastatizzazione epatica [Esposito DL, 2012].

Alcune linee di ricerca suggeriscono che l'insulina e i fattori IGF siano implicati nello sviluppo e nella fisiologia dell'osso regolando la funzione osteoblastica. Un recettore insulinico funzionale è espresso dagli osteoblasti e l'esposizione di osteoblasti primari o cellule osteoblasto-simili a livelli fisiologici di insulina aumenta l'espressione dei marcatori anabolici dell'osso, inclusa la sintesi del collagene [Pun KK, 1989], la produzione di fosfatasi alcalina e l'up-take di glucosio [Kream BE, 1985]. Pazienti con diabete di tipo 1 sviluppano osteopenia o osteoporosi e mostrano un aumentato rischio di fratture [Janghorbani M, 2006], così come una scarsa capacità dell'osso di rigenerarsi in seguito a danno. Il trasporto locale di insulina accelera il processo di riparazione in questi modelli aumentando l'osteogenesi [Gandhi A, 2005]. In relazione al recettore di IGF-1 non è nota una sua relazione diretta con il differenziamento di cellule stromali in cellule

Introduzione

del *lineage* osteoblastico, ma sappiamo che esso aumenta la funzionalità degli osteoblasti maturi [Walsh S, 2003]. IGF-1 è anche un fattore importante nella regolazione del differenziamento condrocitario e promuove la crescita longitudinale dell'osso aumentando l'ipertrofia condrocitica [Wang J, 1999]. La down-regolazione di IRS-1 in cellule HPDL (human periodontal ligament-derived cells) provoca una riduzione dei livelli di mRNA dei geni relativi ai marcatori di differenziamento [Ochiai H, 2012], sottolineando ancora una volta l'importanza di IRS-1 nei processi differenziametivi.

Come emerge dalla letteratura, la funzione di IRS-1 di regolatore del processo differenziativo può dipendere anche dalla sua localizzazione subcellulare. Alcuni studi, infatti, attribuiscono ad IRS-1 il ruolo di promotore del differenziamento condrocitario solo quando localizzato a livello citoplasmatico, mentre quando si trova nel nucleo la proliferazione cellulare prevale sul differenziamento [Longobardi L, 2009]. La stessa osservazione era stata fatta da Baserga e i suoi collaboratori alcuni anni prima su cellule ematopoietiche ed in quel caso fu ipotizzata per IRS-1 anche una funzione di *shuttle* per la traslocazione nucleare di β -catenina [Chen J, 2005].

Per quanto sin ora riportato possiamo concludere che IGF-1R invia segnali sia di differenziamento che proliferazione cellulare, accentuando in quest'ultimo caso le caratteristiche tumorali delle cellule, a seconda delle situazioni e della disponibilità dei substrati. In questo contesto IRS-1 assume un ruolo centrale e contrastante e data la sua importanza sia nel processo tumorigenico sia in quello differenziativo sarebbe opportuno riuscire a delucidarne la funzione, soprattutto in un campo nel quale il grado di differenziamento risulta essere fondamentale ai fini prognostici, quale è quello dell'osteosarcoma.

Scopo della tesi

L'osteosarcoma è il più comune tumore osseo riscontrato in età pediatrica ed adolescenziale. E' caratterizzato da una forte instabilità genetica, ma gran parte delle anomalie genetiche ad esso correlate non sono spesso rilevate nei pazienti affetti da questa neoplasia.

Dati recenti e meno recenti suggeriscono che questa forma tumorale possa essere identificata come una patologia del differenziamento, legata all'interruzione del processo cui vanno incontro i precursori osteoblastici per trasformarsi in osteoblasti maturi.

Nello sviluppo tumorale il sistema IGF riveste un ruolo fondamentale nella promozione della proliferazione cellulare e per questa ragione numerose terapie mirate contro di esso sono oggetto di studio. Nell'ambito dell'osteosarcoma il sistema IGF ricopre funzioni anti-apoptotiche e proliferative, rafforzando l'ipotesi della possibilità di impiego di terapie anti-IGF-1R nel trattamento di questa patologia.

Non si può non considerare la relazione esistente tra lo sviluppo dell'osteosarcoma e il mancato completamento del processo di differenziamento osteoblastico, così come non è possibile tralasciare le evidenze che legano il sistema IGF allo stesso processo. In particolare una delle proteine responsabili della propagazione del segnale di IGF-1R, IRS-1, è oggetto di studio, ormai da alcuni anni, nell'ambito delle ricerche effettuate sui processi tumorali e differenziativi.

I risultati sin ora ottenuti da diversi gruppi di ricerca mettono in evidenza il ruolo contrastante di questa proteina nello sviluppo tumorale e nel processo di metastatizzazione ad esso correlato. Infatti, IRS-1 è stato identificato come un fattore promuovente la crescita e la proliferazione e inibente i processi apoptotici e differenziativi in diverse linee cellulari [Baserga R, 2000]. Altri studi mettono in relazione IRS-1 con la promozione del differenziamento delle MSCs e delle cellule del tessuto adiposo [Cypess AM, 2011]. IRS-1 è il presunto responsabile

Scopo della tesi

anche del differenziamento dei precursori osteoblastici, come appunto le MSCs, in osteoblasti maturi [Ochiai H, 2012].

In questo quadro, lo scopo dello studio è stato quello di verificare e delucidare il coinvolgimento ed il ruolo svolto da IRS-1 nel differenziamento osteoblastico di cellule di osteosarcoma ed MSCs, con l'intento di comprendere se e come la sua presenza possa influenzare il completamento del processo differenziativo, la cui interruzione è fortemente correlata allo sviluppo della neoplasia.

A tale fine è stato indotto il differenziamento osteoblastico in modelli cellulari di osteosarcoma e in MSCs derivate da midollo osseo. La via di segnalazione di IGF-1R è stata inibita attraverso l'utilizzo di un anticorpo neutralizzante diretto contro il recettore con lo scopo di confermare il coinvolgimento di questa pathway nel processo di differenziamento osteoblastico. Una volta verificata la capacità delle linee cellulari prese in esame di differenziare in senso osteoblastico in risposta a stimoli specifici presenti nel terreno ed il coinvolgimento di IRS-1 nella realizzazione del processo differenziativo, tramite la valutazione della formazione di matrice mineralizzata e analisi di RT-PCR e Western blot, le linee cellulari sono state trasfettate o infettate con plasmidi in grado di modificare i livelli di espressione della proteina, over-esprimendola o down-regolandola. Sono poi state valutate le caratteristiche di malignità sviluppate dalle cellule in seguito alla sovra-espressione della proteina, sia *in vitro* che *in vivo*.

L'indagine dello stato di fosforilazione di IRS-1 e l'utilizzo dell'inibitore del proteasoma MG-132 sono stati effettuati al fine di valutare come la quantità di IRS-1 presente nelle cellule possa essere in grado di determinare e modificare la loro capacità differenziativa.

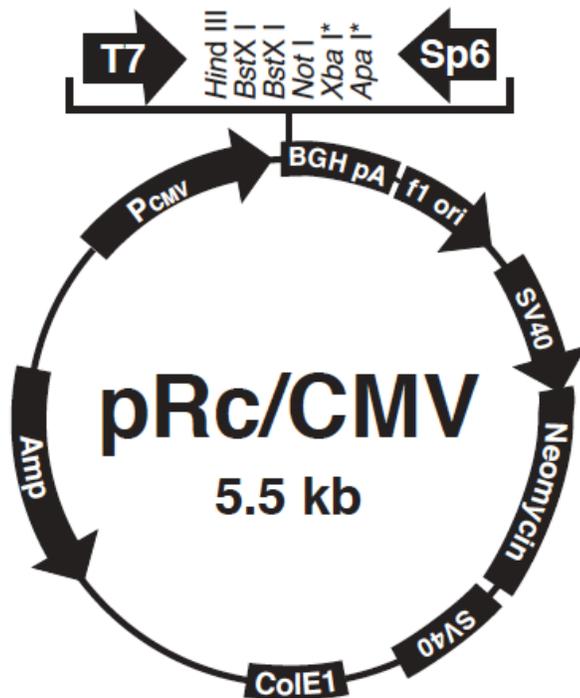
Materiali e Metodi

Linee cellulari

Le linee cellulari SaOS-2 ed MG-63 sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA), mentre OS-7, OS-9 e SARG sono state stabilizzate e precedentemente caratterizzate presso il CRS Sviluppo di Terapie Molecolari, Laboratorio di Oncologia Sperimentale dell' Istituto Ortopedico Rizzoli.

Le cellule sono state coltivate in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) contenente 10% di siero fetale bovino inattivato (FBS Cambrex-Biowhittaker), 20 unita/mL di penicillina e 100 µg/mL di streptomicina (Invitrogen), mentre le cellule staminali mesenchimali murine (MSCs) sono state ottenute dal midollo osseo di topi wild type C57BL/6, utilizzando la procedura di Peister *et al.* e sono state mantenute in terreno di crescita α MEM al 10% FBS (Atlanta Biologicals, Lawrenceville, GA) e 1% penicillina/streptomicina [Peister A, 2004]. La linea di osteosarcoma murino 8086 è stata ottenuta da un tumore primario di topi eterozigoti per p53, precedentemente irradiati, in cui il midollo osseo è stato ricostituito come precedentemente descritto [Sangaletti S, 2003]. Anche in questo caso il terreno di coltura utilizzato è stato IMDM 10%FBS.

Le cellule di osteosarcoma umano SaOS-2 e OS-7 sono state precedentemente trasfettate in modo stabile con pCMV IRS-1 per over-esprimere la proteina [D'Ambrosio C, 1995], mediante la metodica del calcio-fosfato. I pool di cellule trasfettate sono stati selezionati in IMDM 10% FBS contenente 500 µg/mL di neomicina (Sigma-Aldrich) e mantenuti in terreno selettivo.



CMV promoter: bases 209-864
T7 promoter: bases 865-883
Polylinker: bases 890-995
Sp6 promoter: bases 1008-1017
BGH poly A signal: bases 1019-1250
f1 origin: bases 1306-1828
SV40 Promoter: bases 1890-2215
SV40 origin of replication: bases 2084-2169
Neo ORF: bases 2251-3045
SV40 poly A: bases 3219-3348
ColE1 origin: bases 3728-4400
Ampicillin resistance gene: bases 5406-4546
(complementary strand)

Crescita in monostrato

I tempi di raddoppiamento delle linee analizzate sono stati determinati tramite la raccolta giornaliera delle cellule dopo la semina di 5×10^5 delle stesse in fiasca da 25cm^2 , in IMDM 10% FBS. La vitalità cellulare è stata determinata tramite conta in trypan blu.

Crescita in condizioni di ancoraggio-indipendenza

La crescita ancoraggio-indipendente è stata determinata mediante coltura in petri 60-mm su agar 0.5% (Sigma, Rockville, MD), su uno strato inferiore di agar allo 0.33%. La sospensione cellulare (1×10^4 – 3.3×10^4 cellule per petri) è stata seminata in mezzo semisolido (IMDM 10% FBS + agar 0.33%) e incubate a 37°C in atmosfera umida al 5% CO_2 . Le colonie sono state contate a distanza di almeno 10 giorni.

Test di migrazione in trans-well chambers (Motility Assay)

Il test è stato effettuato utilizzando le Transwell chambers (Corning, NY) con inserti di 6.5 mm di diametro e membrana di policarbonato con pori di 8 μm . Le cellule (1×10^5) in terreno IMDM 10% FBS sono state seminate nel compartimento superiore della chamber, mentre nel compartimento inferiore della chamber è stato posto normale terreno di coltura (IMDM 10% FBS). Circa 18 ore dopo è stato rimosso il compartimento superiore. Le cellule sono state fissate 4 ore dopo in metanolo assoluto per 15 minuti; successivamente sono state colorate per 20 minuti con Giemsa 1:10 in acqua e contate al microscopio invertito.

Stimolazione con IGF-1

Le linee cellulari OS-7 e OS-7/pool IRS-1 sono state seminate in IMDM 10% FBS. Il giorno successivo sono state sottoposte a starvation *overnight* e successivamente sono state stimolate con IGF-1 (UpState) 50ng/ml per 5,15 e 45 minuti in terreno privo di FBS.

Western blotting

I lisati cellulari sono stati preparati con buffer contenente Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, NP-40 1%, NaF 1 mM, EGTA 1 mM, Na deossicolato 0.25%, inibitori delle proteasi e delle fosfatasi (aprotinina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Na ortovanadato 0.2 mM, PMSF 1 mM, Pepstatina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e Leupeptina 100 μM). La concentrazione delle proteine è stata determinata tramite Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.) e lettura allo spettrofotometro. Uguali quantità di lisati cellulari (40 μg) sono stati separati tramite SDS-PAGE 7.5% in condizioni denaturanti e trasferite su membrane di nitrocellulosa. Mediante colorazione con Ponceau (Sigma) si è valutato il corretto trasferimento delle proteine su filtro che è stato poi incubato per 1 h con una soluzione TBST 1x (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM e Tween20 0.1%) al 5% di *non-fat dry milk* per saturare i siti di legame aspecifici. Le membrane sono state poi incubate *overnight* a 4°C con i seguenti anticorpi: anti-phosphorylated IRS-1 Tyr⁶¹² (1:1000; Invitrogen), anti-IRS-1 polyclonal antibody (1:1000; Millipore), anti-phospho-p44/42 Thr202/Tyr204 (diluito 1:1000,

Materiali e Metodi

Covance). anti-p44/42 (diluito 1:3000), anti-phospho-Akt Ser473 (1:1000), anti-Akt (1:800), anti-phospho-GSK-3 β Ser9 (1:1000), anti- GSK-3 β (1:1000), anti-phospho-mTOR Ser2448 (1:1000), anti-mTOR (1:1000) tutti Cell Signaling. anti-Shc (1:1000), IGF-1R (1:1000), Lamin-B (1:2000) a Actina (1:50000) tutti prodotti dalla Santa Cruz Biotechnology. Dopo una serie di lavaggi con buffer salino TBST 1x, le membrane sono state incubate con l'anticorpo secondario anti-*mouse*, anti-*goat* o anti-*rabbit* (GE Healthcare), per poi rilevare l'attività delle perossidasi coniugate allo stesso secondario con reazione chemiluminescente mediante *Western Blotting Detection Reagents* (ECL - Euroclone).

Induzione del differenziamento osteoblastico

Le cellule sono state seminate in normale terreno di coltura (IMDM 10% FBS o α MEM 10% FBS) e dopo 4 giorni è stato indotto il differenziamento osteoblastico mediante specifico terreno osteogenico (addizionato con acido ascorbico 50 μ g/mL, β -glicerofosfato 5 mM e 1% di penicillina/streptomina) contenente tra il 2 e il 5% FBS. Dove indicato, l'anticorpo monoclonale α IR-3, gentilmente donato dal Dr. J. D'Ercole (University of North Carolina at Chapel Hill, USA), è stato aggiunto a concentrazione 150 ng/mL in terreno differenziativo privo di siero, dopo aver lavato le cellule con PBS 1X in agitazione per 30 minuti, così da evitare il legame al recettore da parte dei fattori contenuti nel siero. Due ore dopo aver incubato le cellule con l'anticorpo, l' FBS è stato aggiunto alle concentrazioni precedentemente specificate. Il terreno osteogenico è stato sostituito ogni 3 giorni per 3 settimane. Negli esperimenti in cui è stato utilizzato l'inibitore del proteasoma MG-132 (Selleck Chemicals) è stato seguito lo stesso protocollo di differenziamento ed è stato aggiunto nello stesso mezzo di coltura MG-132 a concentrazione 10 μ M per 1 ora. Successivamente il terreno è stato sostituito con mezzo di coltura fresco.

Alizarin red staining

Il saggio del rosso di Alizarina (AR) è stato effettuato a 0, 7, 14 e 21 giorni, a seconda delle linee cellulari considerate, dopo l'induzione del differenziamento osteoblastico. Il terreno è

Materiali e Metodi

stato rimosso dalle piastre e le cellule state lavate con PBS 1X, fissate in etanolo 70% per 1 ora a temperatura ambiente e colorate per 10 minuti in agitazione lenta con la soluzione di Alizarin Red 40 mM a pH 4.2. Successivamente, l'eccesso di colorante è stato rimosso con PBS 1X. Il colorante è stato poi estratto incubando le piastre per 15 minuti con cloruro di cetilpiridinio 10% disciolto in sodio fosfato 10mM a pH 7.0. La quantificazione del colorante è stata effettuata tramite lettura spettrofotometrica a 550 nm.

Studi in vivo per la valutazione della capacita' tumorigenica e metastatica

I topi BALB- Rag2^{-/-};γ_c^{-/-} sono stati gentilmente forniti dal Central Institute for Experimental Animals (CIEA), Kawasaki, Giappone. I topi sono stati accoppiati presso il Dipartimento di Medicina Diagnostica e Specialistica, Università di Bologna, in condizioni sterili. In seguito all'inoculo sottocute di 10⁷ SaOS-2, Sa/pool IRS-1, OS-7 e OS-7/pool IRS-1 è stato valutato il potenziale tumorigenico delle cellule, mentre la formazione di metastasi sperimentali è stata valutata utilizzando l'inoculo endovena di 2x10⁶ SaOS-2 e Sa/pool IRS-1. La crescita tumorale è stata valutata una volta a settimana misurando i volumi tumorali [Scotlandi K, 2005]. Le metastasi polmonari ed epatiche sono state valutate a due mesi dall'inoculo, (dopo staining con black India ink per le metastasi polmonari), tramite stereomicroscopio o mediante la valutazione del peso degli organi freschi quando le metastasi non potevano essere contate. Gli esperimenti sono stati autorizzati dal comitato etico di Bologna, seguendo le norme di utilizzo degli animali italiane ed europee.

Infezioni retrovirali con shRNA

Le cellule di packaging 293 Phoenix Amphotrophic (ATCC) sono state trasfettate con vettori pRFP-C-RS contenenti short-hairpin RNA contro l'mRNA di IRS-1, il vettore pRFP-C-RS contenente shRNA scramble non-effettivo di 29-mer o il vettore vuoto pMSCV (OriGene Technologies, Rockville, MD) utilizzando Lipofectamine LTX (Invitrogen), seguendo il protocollo fornito dal kit, per produrre i retrovirus. A 16 ore dalla trasfezione è stato cambiato il mezzo di coltura e il surnatante contenente i virus è stato raccolto a 24 e 48 ore dalla trasfezione.

Materiali e Metodi

Lo stesso surnatante è stato poi aggiunto alle cellule SaOS-2, MSCs e 8086 ad 1 giorno dalla semina, utilizzando polibrene 4 µg/mL preparato fresco (Sigma, Rockville, MD). L'infezione retrovirale è stata ripetuta 24 ore dopo e a distanza di altre 24 ore le cellule infettate sono state poste in selezione con puromicina 2.5 µg/mL per le 8086 e 2 µg/mL nel caso di SaOS-2 ed MSCs. La puromicina è stata mantenuta nel terreno di coltura durante la propagazione delle cellule e rimossa durante gli esperimenti di differenziamento osteoblastico.

Estrazione dell'RNA e analisi di espressione dell' mRNA

A 14 e 21 giorni dall'induzione del differenziamento osteoblastico, l'RNA messaggero è stato isolato utilizzando il kit µMacs mRNA Isolation (Milteny Biotec, Auburn CA), le tracce di DNA sono state rimosse utilizzando la DNAsi I (New England Bio Labs, Ipswich, MA) e l'mRNA estratto è stato convertito in cDNA tramite il kit µMacs One-step cDNA (Milteny Biotec). Per determinare i livelli di espressione di IRS-1, osterix ed osteocalcina, il primo filamento di DNA è stato sottoposto a Real Time PCR utilizzando i primers riportati in tabella. I risultati sono stati normalizzati utilizzando i valori relativi alla gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) umana per le SaOS-2 e di β-actina murina per 8086 ed MSCs. Il livello di espressione dei geni analizzati ai diversi tempi è stato poi rapportato a quello degli stessi geni nei campioni indifferenziati o non trattati. L'analisi dei risultati è stata eseguita secondo il metodo comparativo con valutazione del ciclo soglia (Ct), cioè il numero di cicli in cui il prodotto specifico di PCR in fluorescenza inizia ad essere rilevato. Il Ct della GAPDH o della β-actina, geni di riferimento per la normalizzazione, è stato sottratto al Ct dei geni d'interesse in tutti i campioni, ottenendo così il ΔCt:

$$Ct \text{ GENE } X - Ct \text{ GAPDH} = \Delta Ct$$

Ogni ΔCt (ΔCt CAMPIONE) ricavato per ciascuno dei campioni viene a sommarsi algebricamente a quello del calibratore (ΔCt CALIBRATORE), cioè quello ricavato dal campione indifferenziato o non trattato usato come controllo:

$$\Delta Ct \text{ CAMPIONE} - \Delta Ct \text{ CALIBRATORE} = \Delta \Delta Ct$$

L'espressione relativa di ogni gene viene espressa come:

Materiali e Metodi

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

che indica quante volte, in più o in meno, il gene d'interesse è espresso nel campione analizzato rispetto al calibratore.

Proteina	Sequenza Forward	Sequenze Reverse
GAPDH umana	5' gagtcaacggatttgctcg 3'	5' gctctagggaggttttagtt 3'
β -actina murina	5' acccactgtgccatctacg 3'	5' gccacgctcggcaggactcttc 3'
IRS-1 umano	5' acagaaggaaagcgtggaga 3'	5' aacttcgtaaaacagtcgc 3'
IRS-1 murino	5' ccagcctggctatttagctg 3'	5' tcaccacctcaactcaacc 3'
Osterix umano	5' gccagaagctgtgaaacctc 3'	5' ccaatacctctcgacgctcg 3'
Osterix murino	5' actcatccctatggctcgtg 3'	5' ggtagggagctgggtaagg 3'
Osteocalcina umana	5' gactgtgacgagttggctga 3'	5' gtctctccttagacacccg 3'
Osteocalcina murina	5' caagtccacacagcagctt 3'	5' aaagccgagctgccagagtt 3'

Analisi statistiche

I dati sono espressi come media \pm SD. Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il test di Student, tramite il software Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). La significatività statistica è stata settata a $p \leq 0.05$.

Risultati

L'osteosarcoma è stato definito come una patologia da de-differenziamento nella quale il differenziamento degli osteoblasti a partire da cellule staminali mesenchimali viene interrotto, portando alla formazione di cellule indifferenziate che possono diventare tumori. Nei pazienti affetti da questa patologia, tanto più il tumore è indifferenziato, tanto peggiore sarà la prognosi [Tang N., 2008].

Risultati preliminari

Dati preliminarmente ottenuti hanno mostrato come 5 di 12 linee di osteosarcoma umano fossero in grado di differenziare in senso osteoblastico in risposta a stimoli specifici presenti nel terreno di coltura. Le cellule sono quindi state tenute in coltura per 21 giorni con acido ascorbico 50µg/ml e β-glicerofosfato 5mM in basso siero, allo scopo di valutarne la capacità di formare matrice ossea mineralizzata utilizzando la colorazione del rosso di Alizarina (AR). Il colorante utilizzato è in grado di legare gli ioni Ca^{2+} , uno dei maggiori componenti della matrice ossea, formando precipitati di colore rosso. E' stato così possibile discriminare tra linee cellulari a fenotipo differenziante (Figura 9A) e linee cellulari a fenotipo non differenziante (Figura 9B).

Risultati

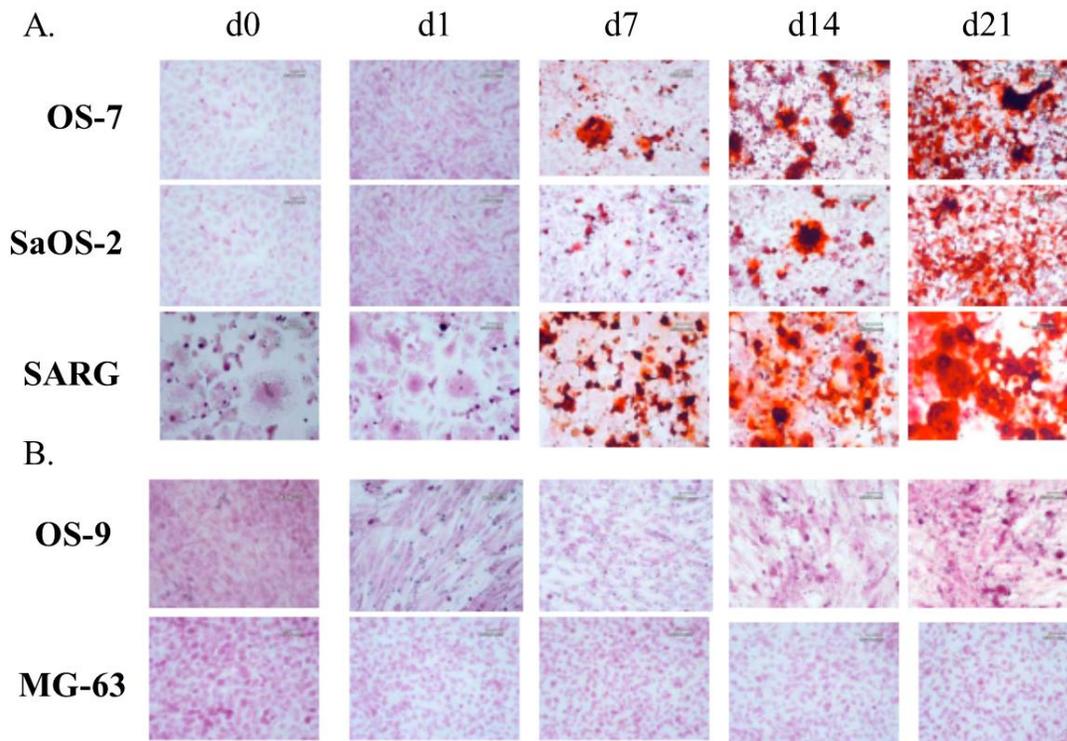


Figura 9. Induzione del differenziamento osteoblastico in linee cellulari di osteosarcoma umano. La mineralizzazione della matrice ossea è stata valutata tramite il saggio del rosso di Alizarina a vari time points. A. Linee cellulari a fenotipo differenziante (OS-7, SaOS-2 e SARG). B. Linee cellulari a fenotipo non differenziante (OS-9 e MG-63).

In Tabella 1 sono riassunti i risultati dell'AR sulle 12 linee di osteosarcoma analizzate.

Fenotipo differenziante	Fenotipo non differenziante
SaOS-2	MG-63
OS-7	MOS
OS-14	OS-17
OS-20	OS-18
SARG	OS-19
	OS-9
	U2OS

Tabella 1. Risultati dell'AR sulle linee cellulari analizzate.

Risultati

L'analisi del sistema IGF, messo in relazione con lo sviluppo del cancro e con l'aumento della crescita e della sopravvivenza delle cellule tumorali da numerosi studi [Yu H, 1999], ha messo in evidenza come non ci fossero differenze nei livelli di espressione di IGF-1 ed IGF-2 tra cellule a fenotipo differenziante (linee riportate in rosso) e cellule a fenotipo non differenziante (linee riportate in nero). Successivamente sono stati analizzati tramite Western blot i livelli proteici del recettore IGF-1R e dei due principali mediatori della sua via di segnalazione, IRS-1 e Shc. Da tale analisi è emerso come l'espressione di IRS-1 correlasse con la capacità differenziativa delle linee cellulari prese in considerazione: 4 linee cellulari su 5 del gruppo a fenotipo differenziante esprimevano bassi livelli di IRS-1, mentre 4 delle 5 linee che non differenziano esprimevano alti livelli di IRS-1. Non è emersa invece alcuna correlazione tra i livelli di espressione di IGF-1R e Shc e la capacità differenziativa delle cellule (Figura 10).

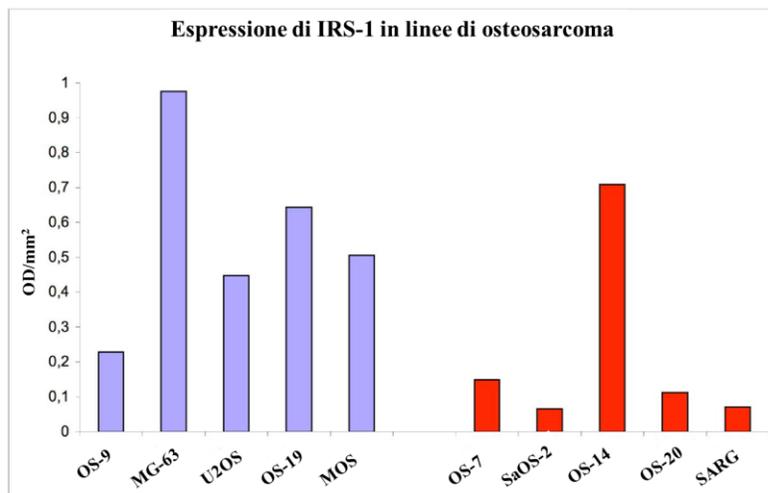


Figura 10. Analisi densitometrica dell'espressione di IRS-1 effettuata sul pannello di 10 linee di osteosarcoma. In rosso le linee a fenotipo differenziante. Coefficiente di correlazione di Spearman: -0.900; $p=0.0833$.

Risultati

Allo scopo di identificare eventuali variazioni nel sistema IGF durante il processo di differenziamento osteoblastico sono state analizzate varie componenti di questa via di segnalazione. L'andamento dell'espressione delle molecole a monte del recettore IGF-1R, IGF-1 e IGF-2 e IGFBP3 durante il differenziamento, è stato analizzato mediante Real Time PCR (RT-PCR). Non è stata rilevata alcuna differenza in relazione ai trascritti dei tre geni analizzati tra i due fenotipi.

IGF-1R trasduce il segnale mediante il reclutamento in membrana e l'attivazione di due mediatori, IRS-1 e Shc. I livelli di espressione di queste due proteine e di IGF-1R, durante il differenziamento osteoblastico, sono stati valutati mediante Western blot. E' stata osservata una drastica diminuzione dei livelli di espressione di IRS-1 a partire dal settimo giorno di differenziamento nelle linee a fenotipo differenziante OS-7, SaOS-2 and SARG. Tale diminuzione non è stata identificata nelle linee cellulari a fenotipo non differenziante OS-9 ed MG-63. Sono stati valutati anche i livelli di espressione di IGF-1R che risultano variare tra le linee durante i 21 giorni di differenziamento. Allo stesso modo sono stati analizzati anche i livelli di Shc, i quali mostrano un andamento variabile, ma restano tuttavia elevati se rapportati ad IRS-1 nelle linee a fenotipo differenziante. Nelle linee OS-9 ed MG-63, appartenenti al fenotipo non differenziante, la quantità totale di Shc diminuisce. I cambiamenti inconsistenti riscontrati nell'espressione di IGF-1R e Shc comparati a quelli relativi ad IRS-1 suggeriscono l'importanza di IRS-1 durante il differenziamento osteoblastico delle linee di osteosarcoma analizzate.

La sovra-espressione di IRS-1 riduce la capacità delle cellule di differenziare in senso osteoblastico e ne aumenta la tumorigenicità.

I dati preliminari sin qui illustrati hanno consentito di focalizzare l'attenzione su IRS-1. Allo scopo di studiare in modo più approfondito il ruolo della proteina IRS-1 nel contesto del differenziamento osteoblastico, le linee cellulari SaOS-2 e OS-7, che mostrano un basso livello di espressione della proteina di interesse, sono state scelte come rappresentative delle linee a fenotipo differenziante, per valutare gli effetti dell'overespressione di IRS-1 sul differenziamento osteoblastico. La sovra-espressione della proteina è stata ottenuta trasfettando stabilmente le due linee cellulari, mediante il metodo del calcio-fosfato, con il plasmide pCMV/IRS-1 [D'Ambrosio

Risultati

et al. 1995], contenente la sequenza codificante per IRS-1 posta sotto il controllo del promotore virale CMV, così da ottenere una forte espressione della proteina. La selezione dei trasfettanti è stata effettuata in terreno contenente neomicina, sfruttando la resistenza all'antibiotico presente nel plasmide. Due settimane dopo, le linee cellulari ottenute Sa/pool IRS-1 ed OS-7/pool IRS-1 sono state testate in Western blot, confermando l'over-espressione di IRS-1. Sono stati verificati anche i livelli di Shc, mostrando come i livelli di questa proteina non subiscano alcuna variazione in seguito alla trasfezione (Figura 11).

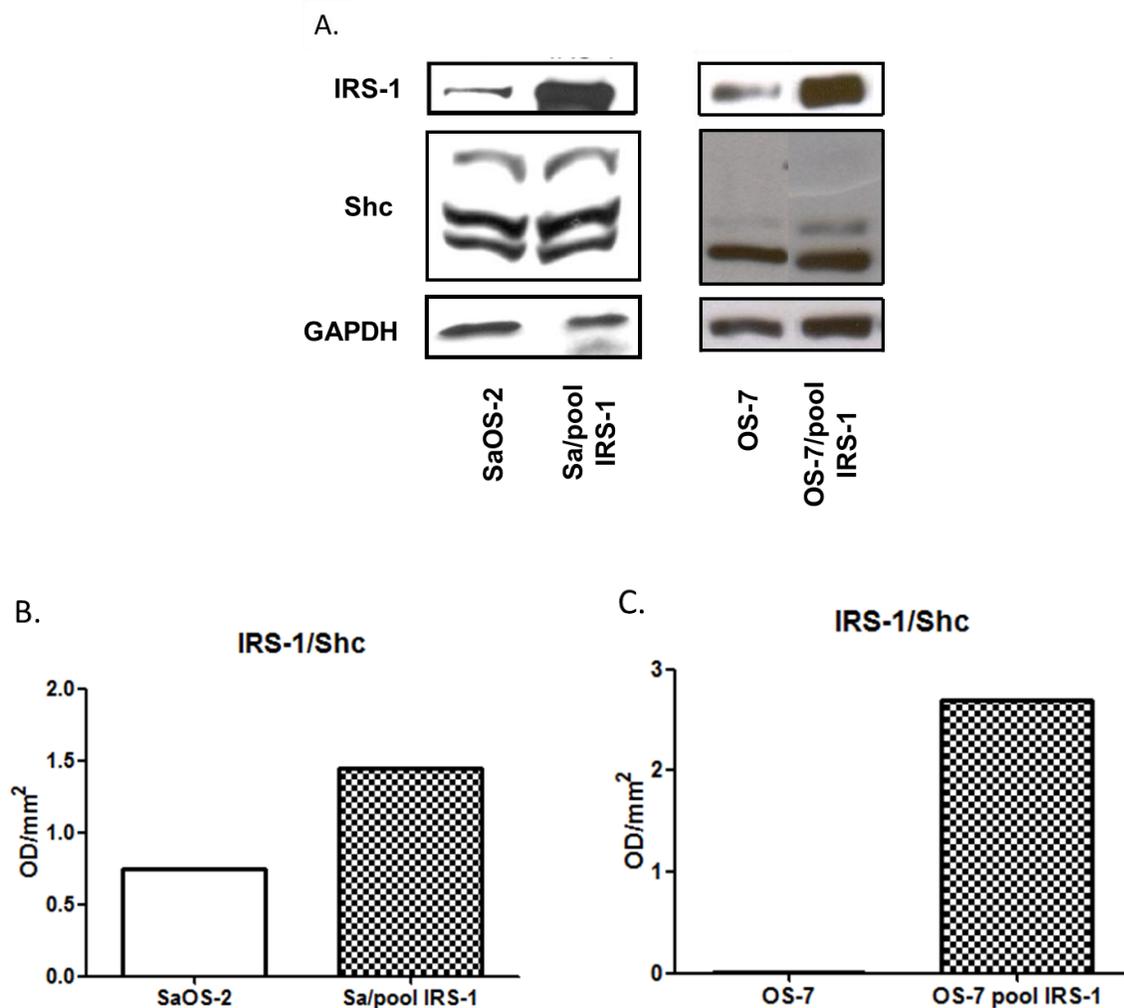


Figura 11. A. Analisi al Western blot dell'over-espressione di IRS-1 nelle linee cellulari SaOS-2 e OS-7. B. e C. Analisi densitometrica del rapporto IRS-1/Shc.

Risultati

La stimolazione della linea OS-7 e del suo pool over-esprimente IRS-1 con IGF-1 ha consentito di verificare l'attività della pathway di IGF-1R e quindi di convalidare la funzionalità dei modelli creati (Figura 12).

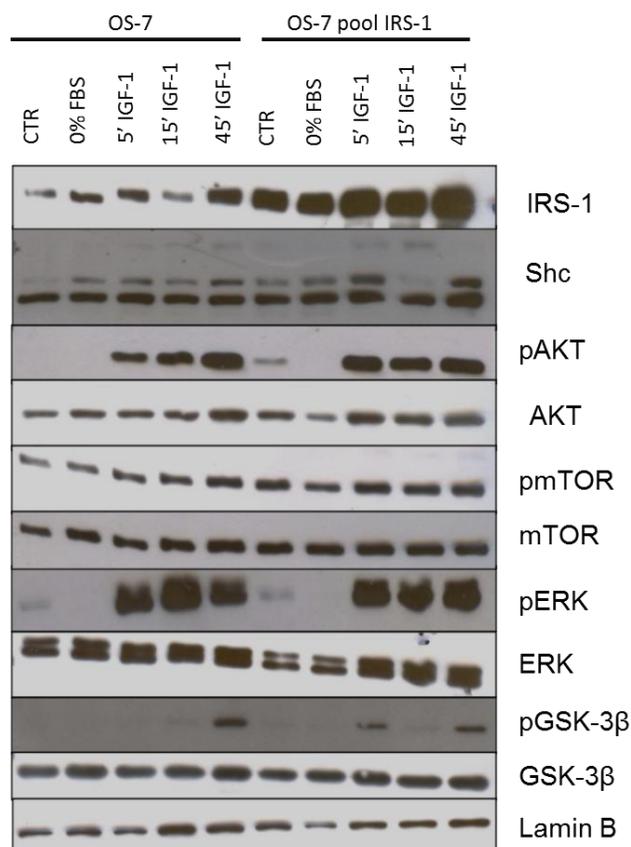


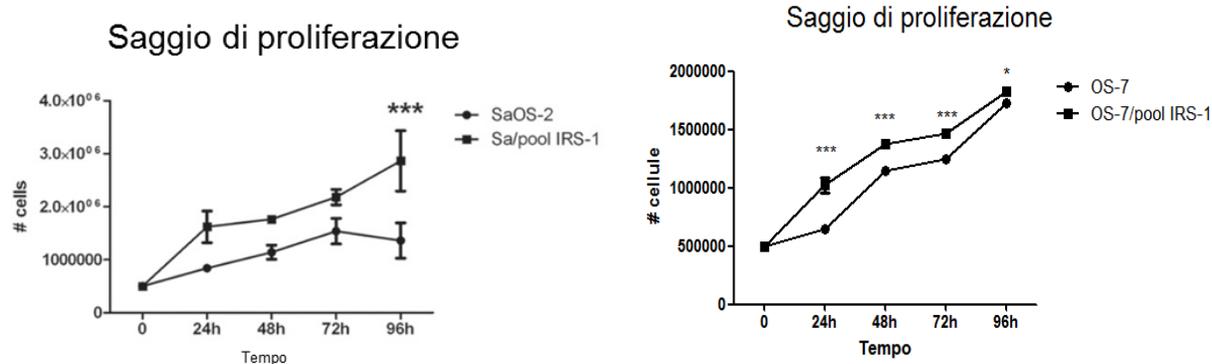
Figura 12. Stimolazione di OS-7 e OS-7/pool IRS-1 con IGF-1.

Successivamente le linee cellulari Sa/pool IRS-1 e OS-7/pool IRS-1 sono state caratterizzate per il potenziale tumorigenico, poichè solitamente cellule meno differenziate risultano essere più maligne di cellule meglio differenziate. Come controllo sono state utilizzate le linee parentali da cui derivano, SaOS-2 e OS-7. Le linee Sa/pool IRS-1 e OS-7/pool IRS-1 hanno mostrato un aumento statisticamente significativo della capacità proliferativa rispetto alle linee wild-type (Figura 13A), così come una maggiore capacità di formare colonie in condizioni di

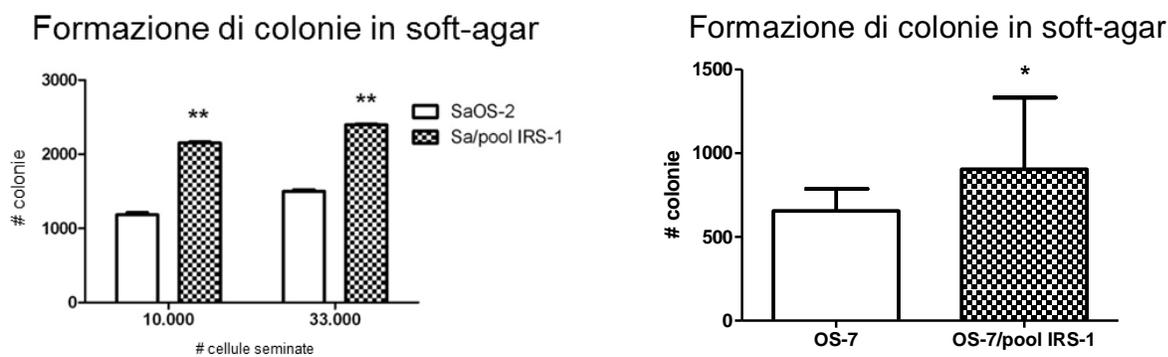
Risultati

ancoraggio indipendenza e una maggiore capacità migratoria rispetto alle linee parentali SaOS-2 e OS-7 (Figura 13B e 13C).

A



B



C

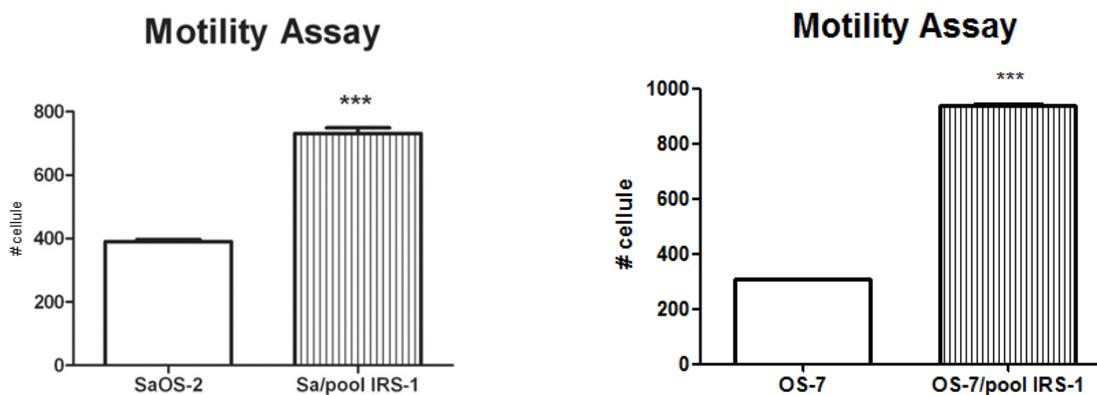
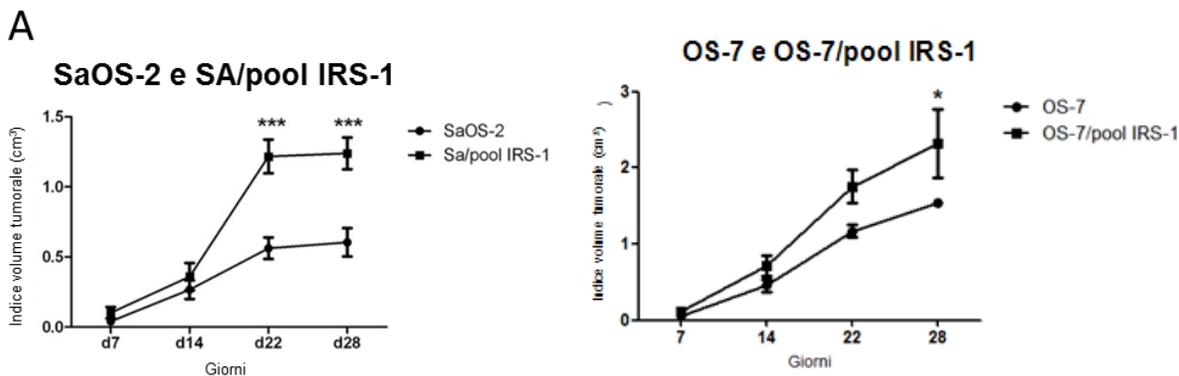


Figura 13. A. Valutazione della proliferazione cellulare mediante conta in trypan blu. Le conte sono state effettuate ogni 24 ore per 96 ore (***, $p \leq 0.001$). B. Valutazione della capacità di

Risultati

formare colonie in condizioni di ancoraggio-indipendenza effettuata a due diverse densità di semina (**, $p \leq 0.005$). C. Valutazione della capacità migratoria di SaOS-2, Sa/pool IRS-1, OS-7 e OS-7/pool IRS-1(***, $p \leq 0.001$).

Tramite gli esperimenti *in vivo* è stato possibile confermare i dati ottenuti dagli esperimenti *in vitro*. SaOS-2, OS-7 e i loro pool over-esprimenti IRS-1 sono state inoculate sottocute in topi BALB-Rag2^{-/-};γc^{-/-} (topi privati dei linfociti B, T e delle cellule Natural Killer). Le linee cellulari Sa/pool IRS-1 e OS-7/pool IRS-1 hanno generato tumori di dimensioni significativamente maggiori rispetto a quelli dati dalle linee parentali (Figura 14A). Il potenziale metastatico è stato valutato tramite l'inoculo endovenoso. La linea Sa/pool IRS-1 ha mostrato una capacità di formare colonie significativamente maggiore rispetto alla linea parentale, sia a livello dei polmoni (principale sito di metastatizzazione nell'osteosarcoma) sia a livello epatico. Non essendo stato possibile contare le metastasi sviluppatesi nei polmoni, ne sono stati valutati i pesi (Figura 14B e 14C). Questi risultati mostrano un aumento della malignità della linea cellulare over-esprimente IRS-1, la quale aveva mostrato anche una minore capacità di differenziare in senso osteoblastico.



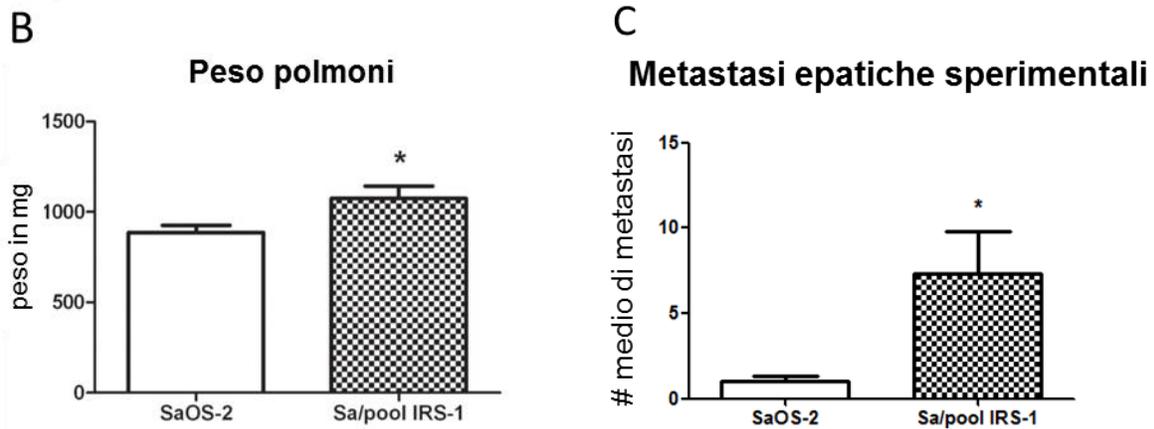


Figura 14. A. Volumi tumorali rilevati dopo l'inoculo sottocute di 10^7 SaOS-2, Sa/pool IRS-1, OS-7 e OS-7/pool IRS-1 (*, $p \leq 0.05$, ***, $p \leq 0.001$, $n=5$). Metastasi sperimentalmente indotte tramite inoculo endovena di 2×10^6 SaOS-2 e Sa/pool IRS-1 misurate come peso dei polmoni (B; *, $p \leq 0.05$, $n=10$) e noduli al fegato (C; *, $p \leq 0.05$, $n=9$) dopo 2 mesi.

Analizzando tramite il saggio AR la capacità della linea cellulare Sa/pool IRS-1 di differenziare in senso osteoblastico in relazione alla linea parentale SaOS-2, quantificando il colorante e valutando in RT-PCR l'espressione di alcuni marcatori di differenziamento dopo l'induzione del differenziamento tramite terreno osteogenico, è stato possibile osservare una riduzione dei noduli di matrice mineralizzata, così come la diminuzione dell'espressione di osterix al giorno 14 e dell'osteocalcina al giorno 21 (Figura 15). In questo modo è stato dimostrato che la sovra-espressione di IRS-1 porta ad una riduzione della capacità delle linee analizzate di differenziare in senso osteoblastico.

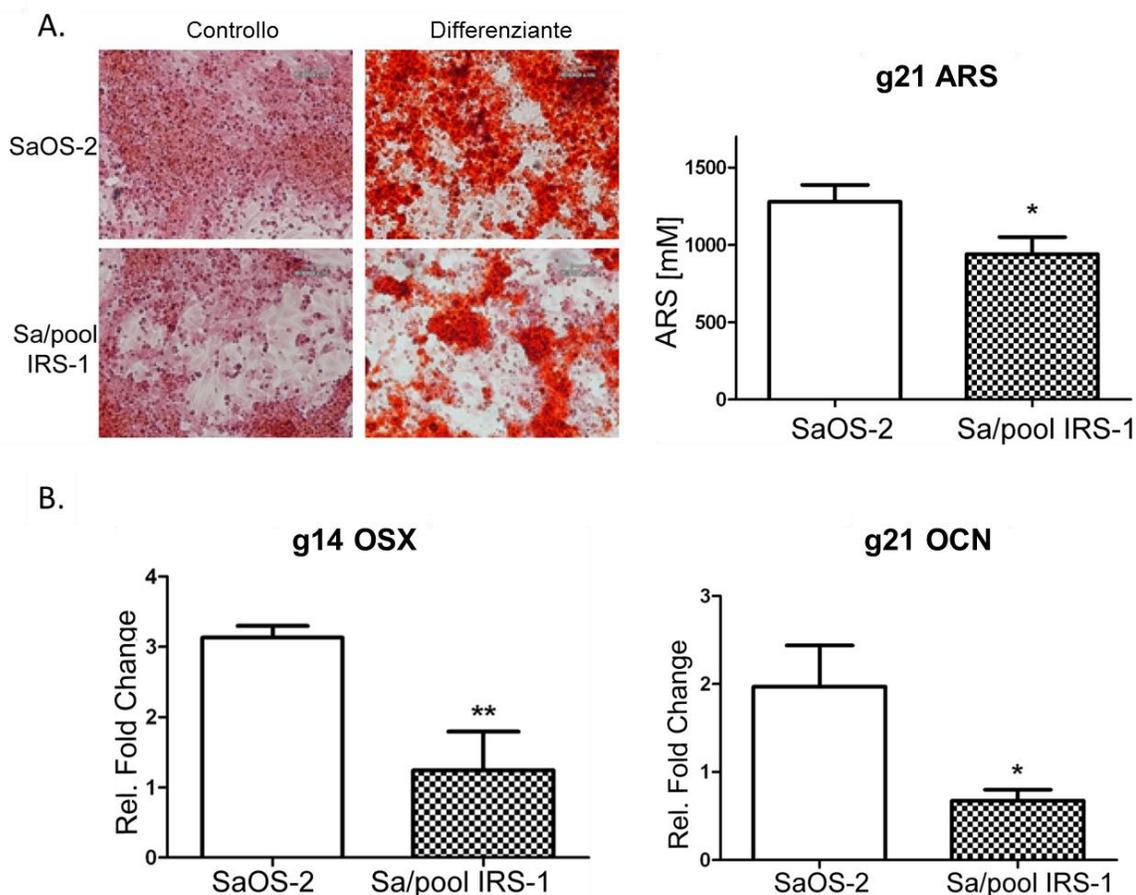


Figura 15. Effetti dell'over-espressione di IRS-1 sul differenziamento osteoblastico. A. Colorazione AR in SaOS-2 e Sa/pool IRS-1 dopo 21 giorni di differenziamento e quantificazione del colorante (*, $p \leq 0.05$). B. Espressione dei marcatori di differenziamento osteoblastico osterix al giorno 14 (**, $p \leq 0.005$) e osteocalcina al giorno 21 (*, $p \leq 0.05$), misurati mediante RT-PCR e comparati con i campioni indifferenziati.

Una volta analizzati gli effetti dell'over-espressione di IRS-1 nella linea cellulare di osteosarcoma SaOS-2, è stata valutata la modulazione della stessa proteina in un contesto "normale", utilizzando cellule staminali mesenchimali murine derivate da midollo osseo (MSCs). La Figura 16 dimostra che i livelli di IRS-1 diminuiscono in MSCs differenzianti, similmente a quanto avviene nella linea cellulare di osteosarcoma SaOS-2 e nelle altre linee in grado di differenziare in senso osteoblastico.

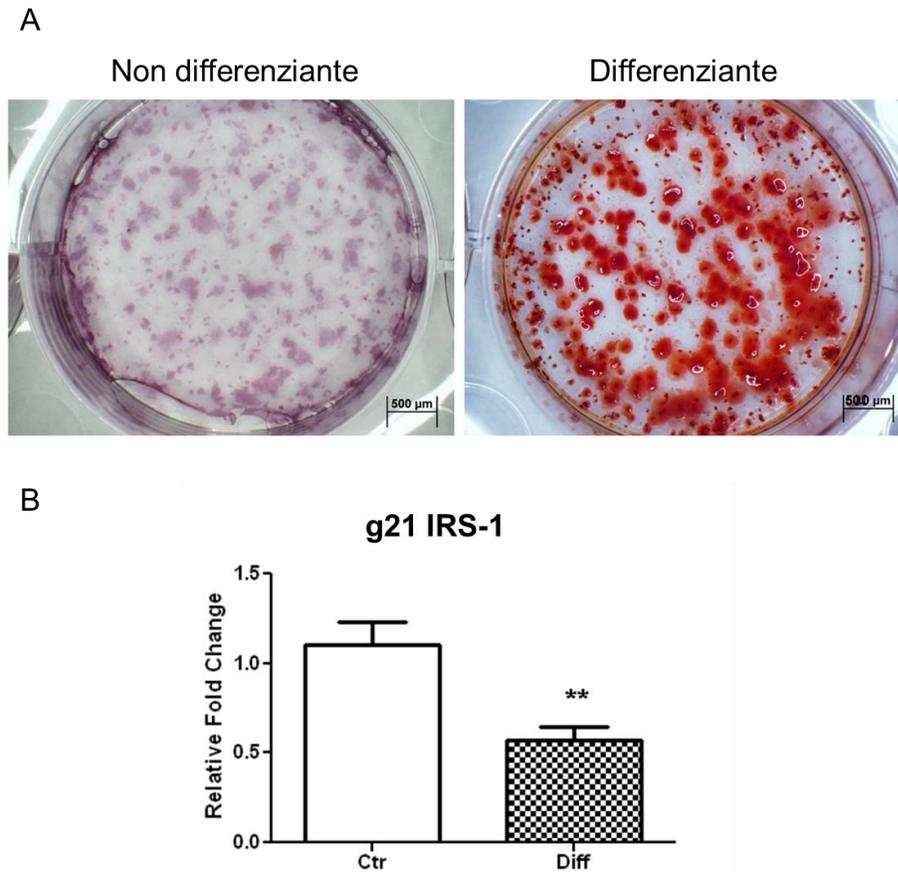


Figura 16. A. Valutazione tramite AR della capacità di differenziare in senso osteoblastico di cellule staminali mesenchimali murine derivate da midollo osseo. B. Riduzione dei livelli di mRNA di IRS-1 al giorno 21 in MSCs (**, $p \leq 0.005$).

Allo scopo di confermare l'importanza della via di segnalazione di IGF-1R durante il differenziamento osteoblastico, è stata inibita l'interazione tra IGF-1 ed il suo recettore utilizzando l'anticorpo monoclonale α IR-3, che ha consentito di reprimere l'attività tirosin-chinasica IGF-1 ed IGF-2-dipendente del recettore [Steele-Perkins G, 1990]. L'effetto dell'anticorpo è stato testato nella linea di osteosarcoma umano SaOS-2 e nelle MSCs murine. In presenza dell'anticorpo neutralizzante utilizzato durante i 21 giorni di differenziamento osteoblastico, è stata osservata una riduzione della formazione di matrice mineralizzata in entrambe le linee cellulari. Tale dato è stato confermato dai risultati ottenuti in RT-PCR, che mostrano la riduzione a 14 giorni di osterix (62% per SaOS-2 e 48% per MSC) e a 21 giorni

Risultati

dell'osteocalcina (68% per SaOS-2 e 96% per MSC) nelle linee parentali SaOS-2 ed MSCs (Fig 17).

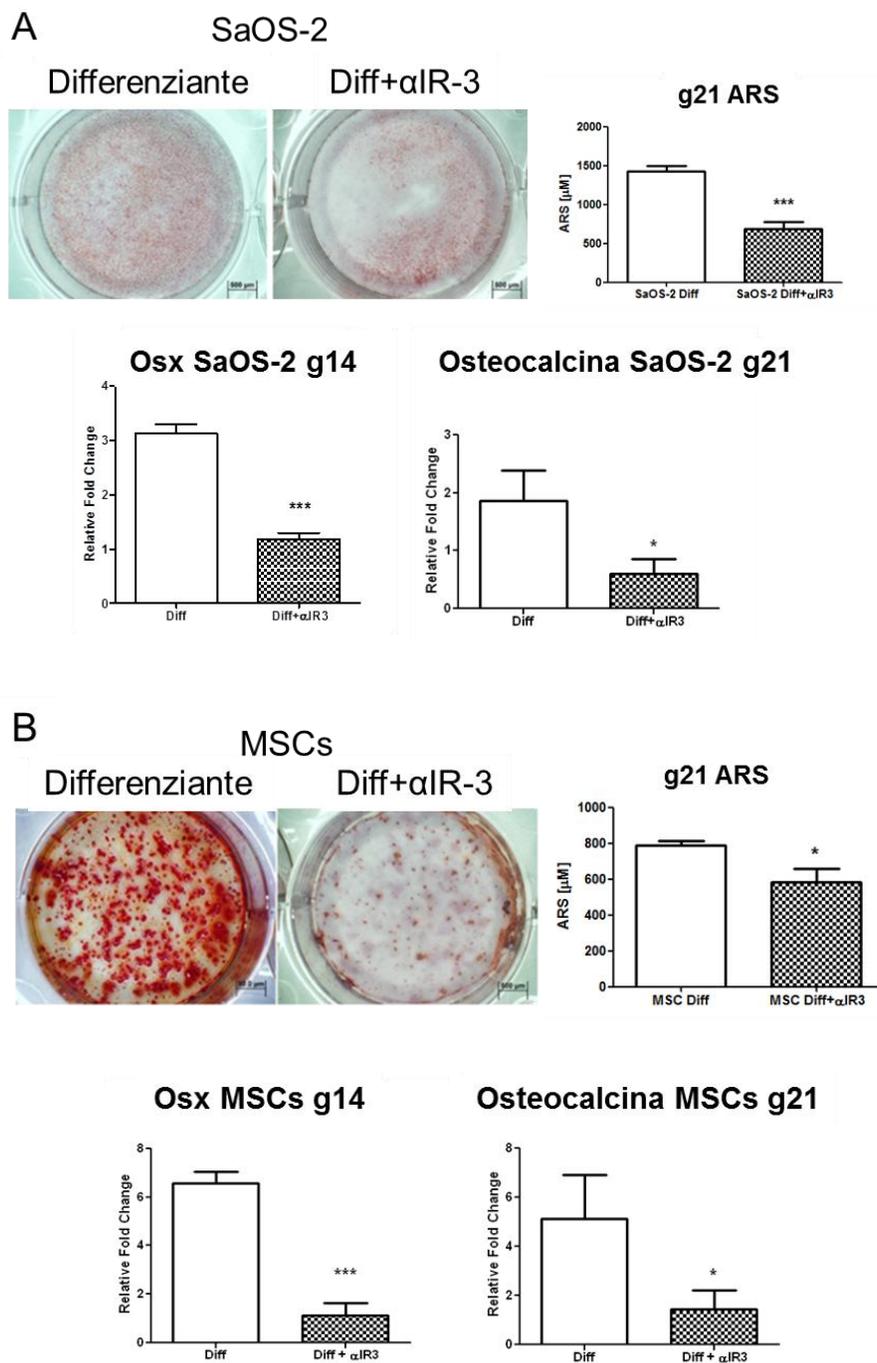


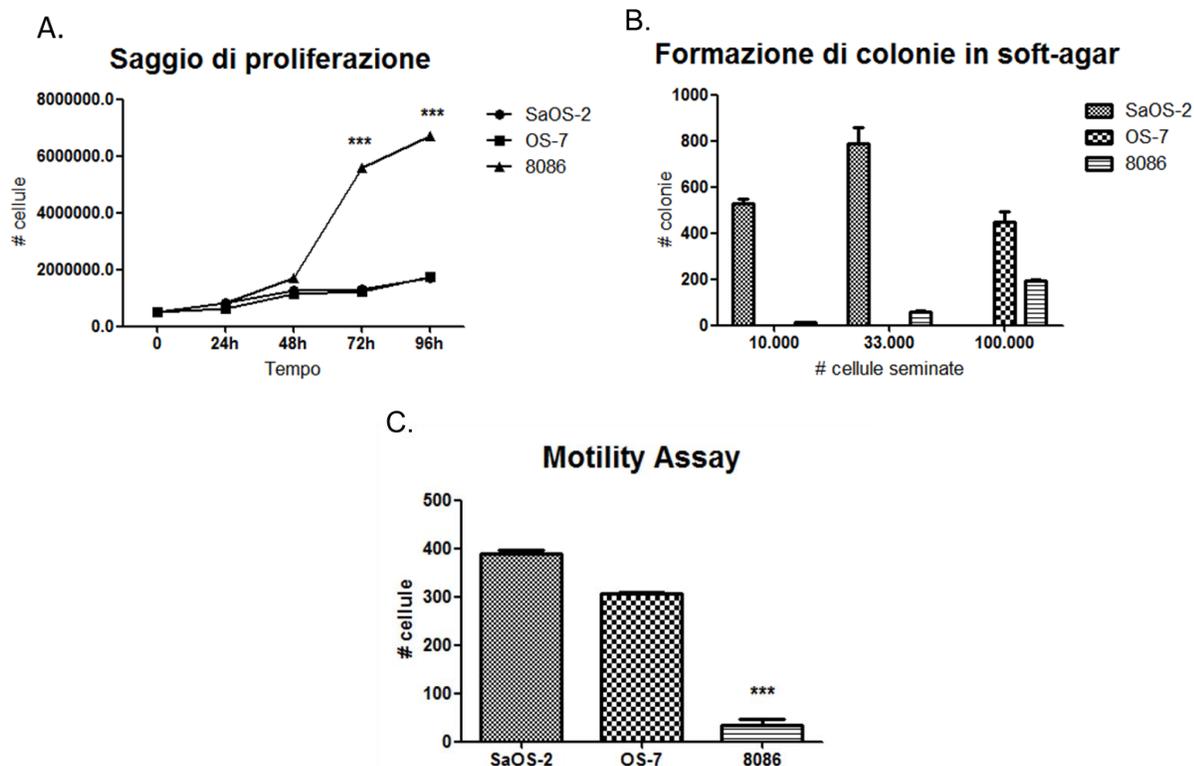
Figura 17. Effetti dell'inibizione della pathway di IGF-1R ottenuta tramite l'utilizzo dell'anticorpo α IR-3. La colorazione AR e l'estrazione del colorante insieme alle analisi di RT-PCR, a 14 giorni per osterix e a 21 giorni per osteocalcina, sono state utilizzate per misurare il

Risultati

differenziamento osteoblastico di SaOS-2 (A) ed MSCs (B) dopo l'utilizzo dell'anticorpo (*, $p \leq 0.05$; ***, $p \leq 0.001$).

Importanza di IRS-1 durante il differenziamento osteoblastico.

La modulazione dell'espressione di IRS-1 riscontrata durante il processo di differenziamento osteoblastico nella linea cellulare SaOS-2 e nella linea di MSCs, ha suggerito che la down-regolazione della stessa proteina potesse promuovere il programma differenziativo. A questo scopo è stata utilizzata un'infezione retrovirale per trasportare 4 diversi shRNAs (short-hairpin RNA) contro IRS-1 nelle cellule di osteosarcoma umano SaOS-2, nella linea murina di MSCs e nella linea di osteosarcoma murino 8086. La linea 8086 deriva da un tumore murino primario; la sua caratterizzazione ha mostrato una maggiore capacità proliferativa di queste cellule rispetto alle due linee di osteosarcoma umano utilizzate (Figura 18A) ma anche una minore capacità clonogenica e migratoria (Figura 18B e C).



Risultati

Figura 18. A. Valutazione della proliferazione cellulare mediante conta in trypan blu. Le conte sono state effettuate ogni 24 ore per 96 ore (***, $p \leq 0.001$). B. Valutazione della capacità di formare colonie in condizioni di ancoraggio-indipendenza effettuata a diverse densità di semina. C. Valutazione della capacità migratoria di SaOS-2, OS-7 e 8086 (***, $p \leq 0.001$).

Le 8086 esprimono alti livelli di IRS-1 sia basalmente che in differenziamento, pur essendo in grado di formare matrice ossea mineralizzata e di esprimere i marcatori di differenziamento osteoblastico (Figura 19).

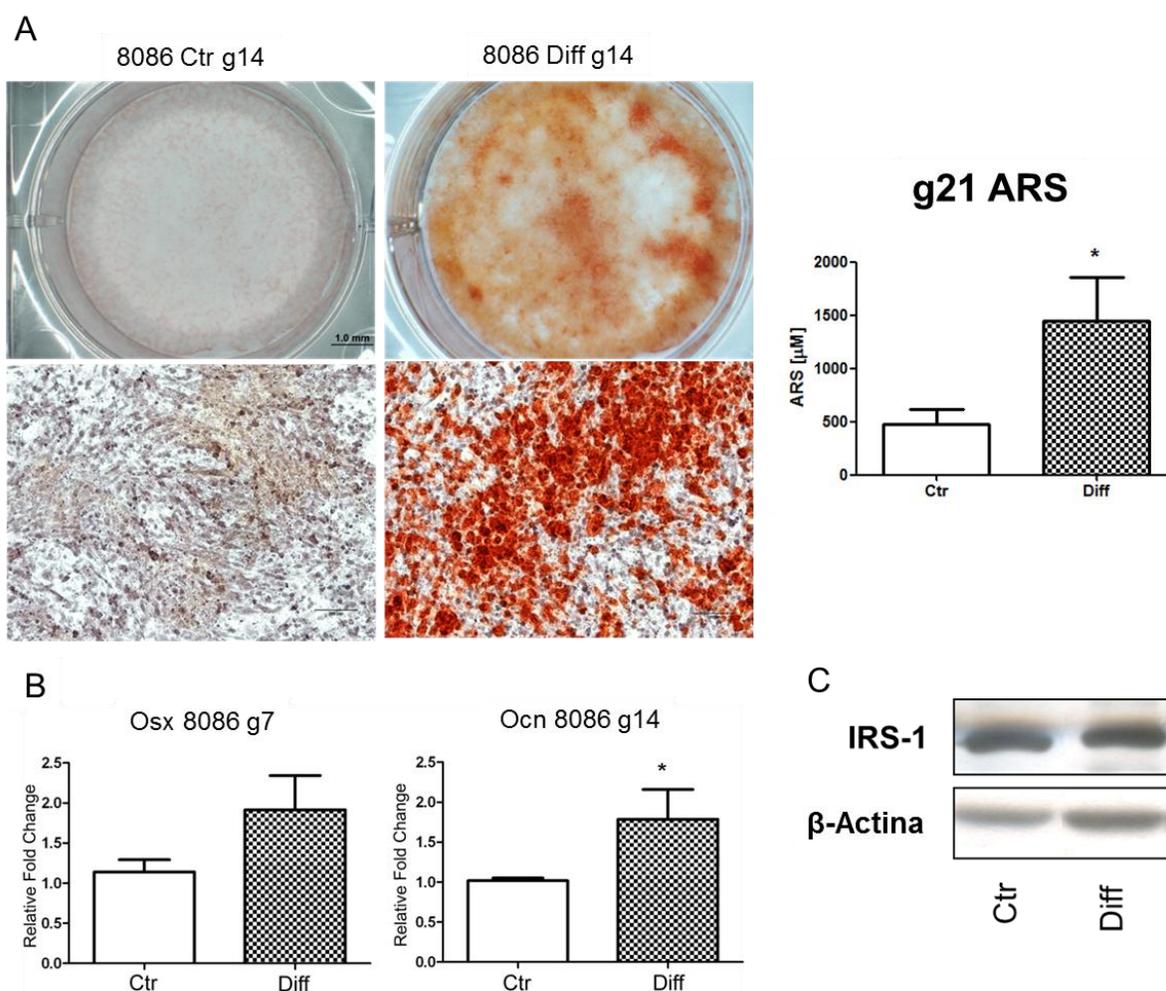


Figura 19. Differenziamento osteoblastico della linea di osteosarcoma murino 8086. A. Formazione di matrice ossea mineralizzata determinata tramite AR dopo 14 giorni di differenziamento e visualizzata con obiettivo 10X o ingrandita a 40X. Quantificazione del colorante estratto *, $p \leq 0.05$. B. Espressione dei marcatori di differenziamento osteoblastico osterix a 7 giorni (ns) e osteocalcina a 14 giorni (*, $p \leq 0.05$) misurati in RT-PCR. C. Immunoblot rappresentativo dei livelli di IRS-1 in cellule controllo e differenzianti a 14 giorni.

Risultati

La diminuzione dei livelli di espressione di IRS-1 in seguito all'infezione retrovirale è stata verificata tramite analisi di Western blot (Figura 20). Valutando al densitometro le differenze rilevate tra le linee infettate con i vettori controllo e quelle infettate con gli shRNAs funzionali si rileva una riduzione dell'espressione della proteina pari al 95% nella linea cellulare SaOS-2, al 66% nelle MSCs e al 51% nelle 8086.

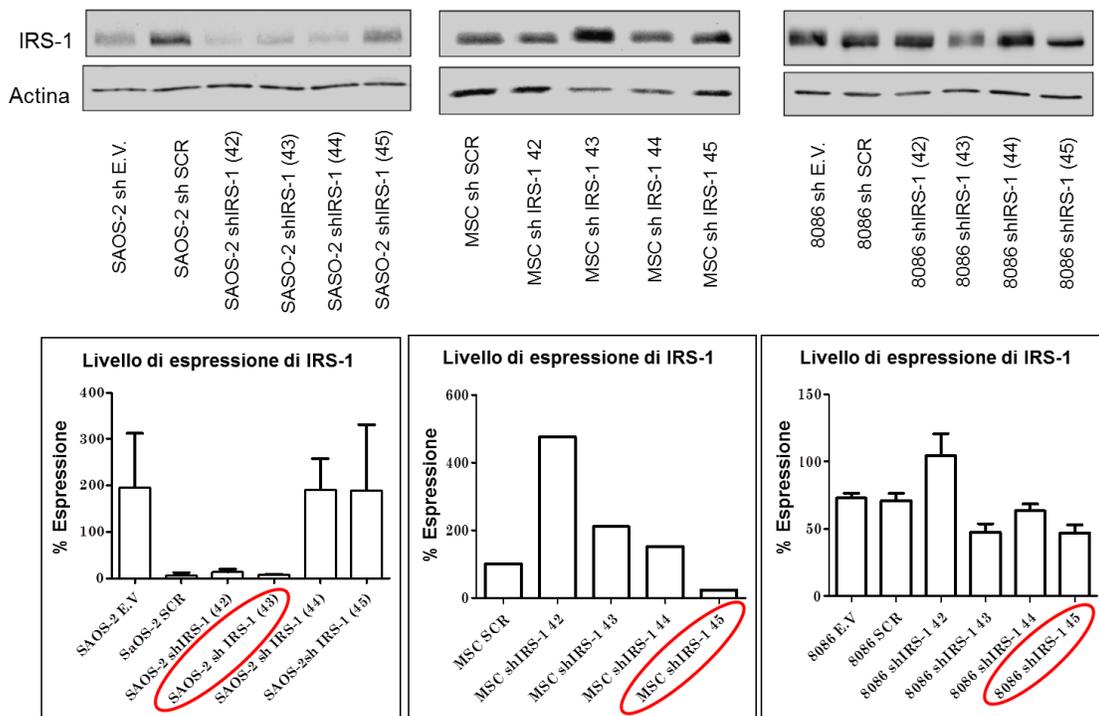


Figura 20. Riduzione dell'espressione di IRS-1 mediante infezione retrovirale. La diminuzione dell'espressione della proteina è stata verificata mediante Western blot e successiva densitometrica. La percentuale di riduzione è pari al $94.6 \pm 2.4\%$ nelle SaOS-2, al $65.9 \pm 10.8\%$ nelle MSCs ed al $51.2 \pm 10.7\%$ nelle 8086. Gli shRNAs cerchiati in rosso sono quelli utilizzati per i successivi esperimenti.

Le linee cellulari derivate da SaOS-2, MSCs ed 8086 e contenenti i vettori di controllo o gli shRNAs funzionali sono state testate per la capacità di differenziare in senso osteoblastico,

Risultati

utilizzando lo stesso terreno osteogenico impiegato in precedenza. Anche in questo caso il differenziamento osteoblastico è stato verificato tramite la formazione di matrice ossea mineralizzata con l'AR e le successive analisi di RT-PCR hanno consentito di determinare l'espressione dei marcatori di differenziamento osterix ed osteocalcina. In figura 21 viene riportata la significativa inibizione della deposizione di calcio osservata in tutte le linee cellulari; in particolare si ha una riduzione del 33% nelle SaOS-2, del 50% nelle MSCs e del 66% nelle 8086.

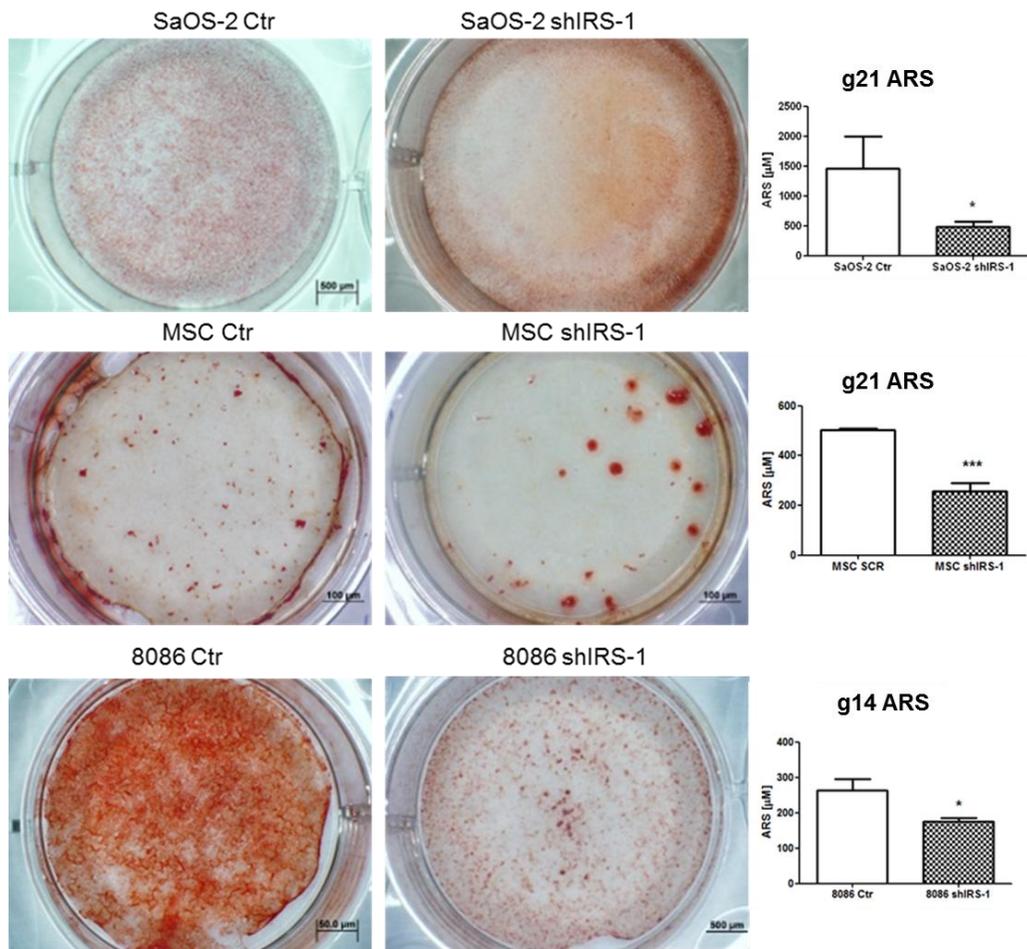


Figura 21. Riduzione della deposizione di calcio a 21 giorni di differenziamento osteoblastico nella linea SaOS-2 e nelle MSCs ed a 14 giorni nella linea 8086, con o senza l'utilizzo degli shRNA (*, $p \leq 0.05$ e ***, $p \leq 0.001$ confrontati con le cellule controllo).

Risultati

L'analisi dei marcatori di differenziamento in RT-PCR mostra un trend nella riduzione dell'espressione di osterix al giorno 14 ed una significativa diminuzione dei livelli di osteocalcina al giorno 21 nella linea di osteosarcoma umano SaOS-2 infettata con l'shRNA funzionale e comparata con la stessa linea infettata con il vettore di controllo. Allo stesso modo le MSCs infettate con l'shRNA funzionale mostrano una significativa riduzione sia nell'espressione di osterix al giorno 14, sia in quella dell'osteocalcina a 21 giorni. Le analisi di RT-PCR mostrano anche la diminuzione statisticamente significativa dell'espressione di osterix al giorno 7 e dell'osteocalcina al giorno 14 nella linea di osteosarcoma murino 8086 infettata con l'shRNA funzionale (Figura 22). Di conseguenza, la perdita di IRS-1 genera una riduzione nel potenziale differenziativo delle linee cellulari analizzate.

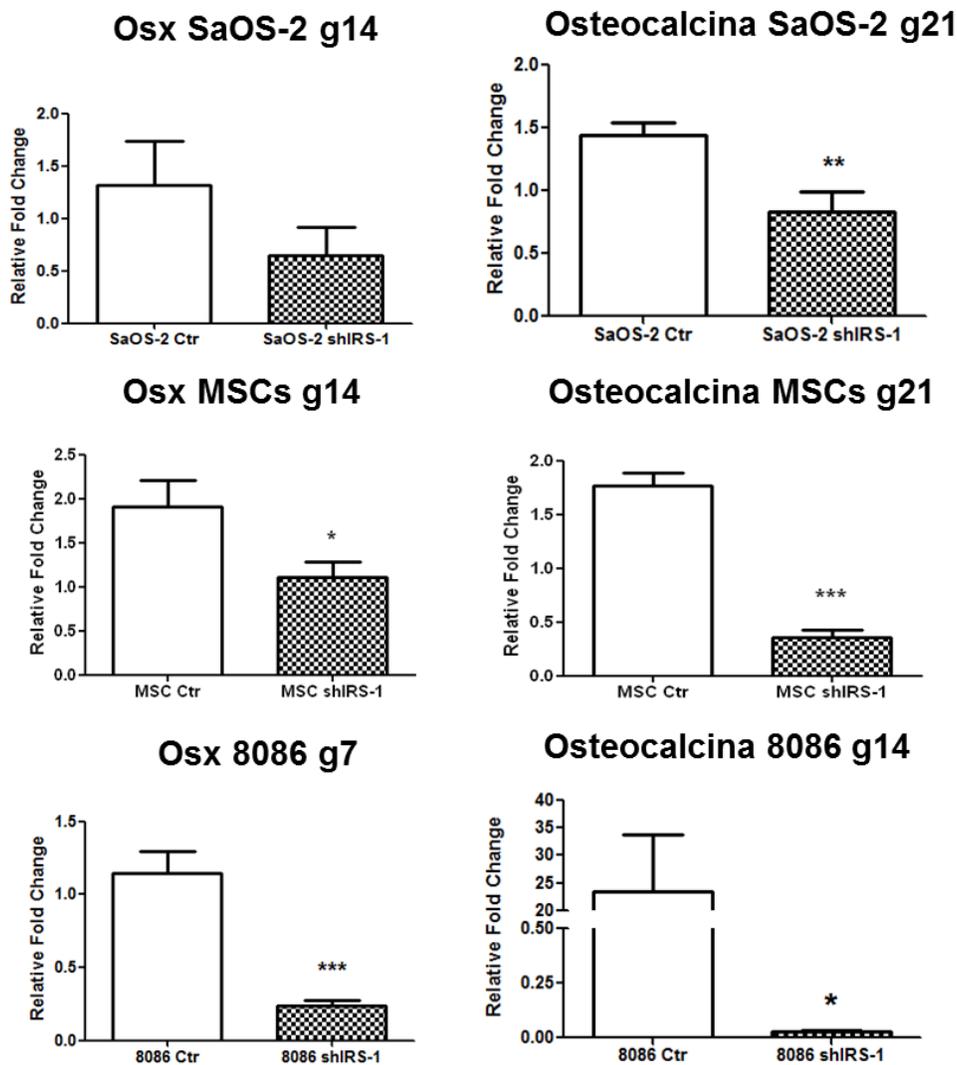


Figura 22. Analisi dell'espressione dei marcatori di differenziamento osteoblastico osterix (al giorno 14 per SaOS-2 ed MSCs e al giorno 7 per 8086) e osteocalcina (al giorno 21 per SaOS-2 ed MSCs e al giorno 14 per 8086) nelle cellule infettate con gli shRNA e normalizzata sul giorno 0 (*, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.005$; ***, $p \leq 0.001$).

Risultati

L'accumulo di IRS-1 inibisce il differenziamento osteoblastico.

I risultati ottenuti suggeriscono che le cellule sono in grado di differenziare in senso osteoblastico solo se IRS-1 è espresso a livello basale in un certo range. Modulando la sua espressione, sia sovra-esprimendone che down-regolandone i livelli proteici, si ottiene l'inibizione della capacità di differenziare in senso osteoblastico in tutte le linee cellulari analizzate (Figura 23).

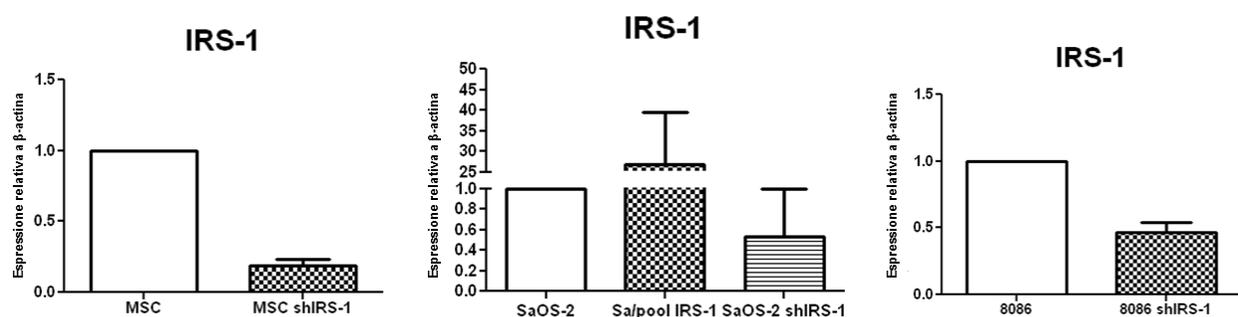


Figura 23. Analisi densitometrica dei livelli di espressione basale di IRS-1 nelle linee parentali e nei loro trasfettanti.

Per confermare questa osservazione è stata valutata in prima analisi l'attivazione di IRS-1, misurandone i livelli di fosforilazione in Tyr 612 durante il processo differenziativo, tramite Western blot, nelle linee SaOS-2 ed MSCs. Non è stata riscontrata alcuna differenza nei livelli di fosforilazione di IRS-1 tra campioni differenzianti e non differenzianti, suggerendo che i cambiamenti nello stato di attivazione di IRS-1 non sono coinvolti nella regolazione del differenziamento osteoblastico (Figura 24).

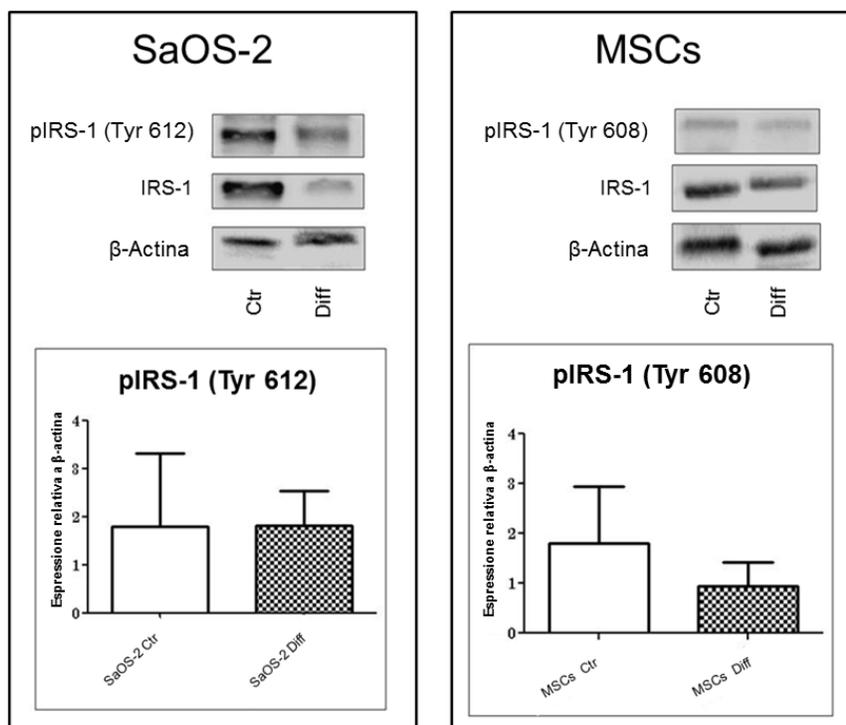


Figura 24. Analisi al Western blot e densitometria di IRS-1 fosforilato in Tyr612 o del suo equivalente murino Tyr608 dopo 21 giorni di differenziamento nelle linee cellulari SaOS-2 ed MSCs.

Di conseguenza è stato indotto un accumulo di IRS-1, inibendone la degradazione. E' noto come la degradazione di IRS-1 venga effettuata mediante il proteasoma [Sun XJ, 1999], pertanto è stato utilizzato un potente inibitore del proteasoma, MG-132, allo scopo di bloccarne l'attività. L'inibitore è stato aggiunto al mezzo di coltura nei 21 giorni di differenziamento a concentrazione 10 μ M ed è stato riscontrato un aumento nell'espressione di IRS-1 in entrambe le linee cellulari. Insieme all'accumulo della proteina è stata rilevata la diminuzione della formazione di matrice ossea mineralizzata mediante AR (Figura 25A). Tale dato è supportato dalla riduzione evidenziata in RT-PCR della produzione di osterix a 14 giorni di differenziamento e dell'osteocalcina a 21 giorni (Figura 25B). Pertanto la mancata regolazione dei livelli di IRS-1 tramite l'inibizione dei normali processi di degradazione proteica può inibire il differenziamento osteoblastico.

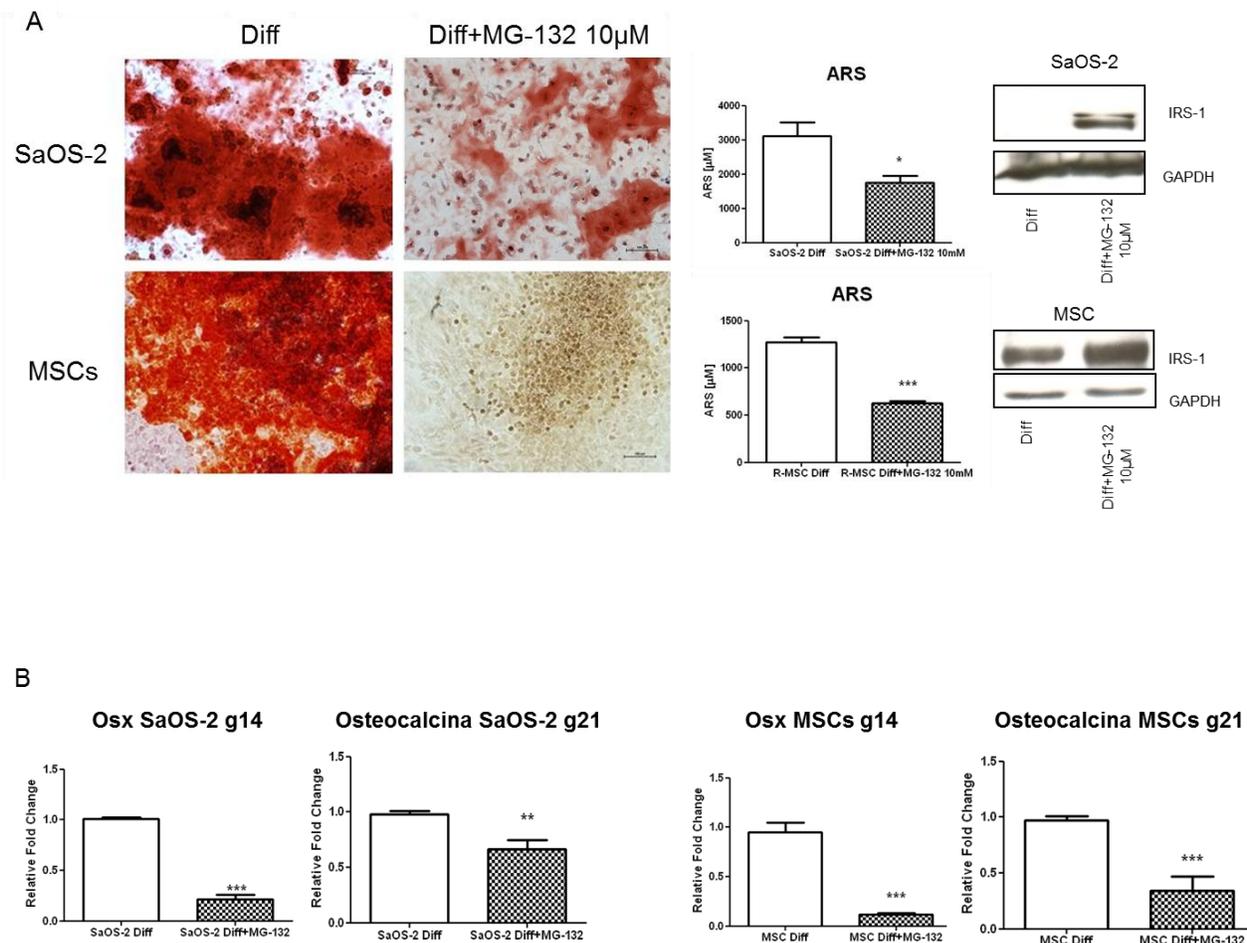


Figura 25. Effetti dell'inibitore del proteasoma MG-132 sul differenziamento osteoblastico. A. Formazione di matrice ossea mineralizzata valutata tramite AR a 21 giorni di differenziamento con e senza l'utilizzo di MG-132 e sua quantificazione. Western blots relativi all'espressione di IRS-1 in SaOS-2 ed MSCs in seguito all'impiego di MG-132 durante il differenziamento osteoblastico. B. Valutazione della produzione dei marcatori di differenziamento osteoblastico mediante RT-PCR in campioni differenziati trattati e non trattati con MG-132. (*, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.005$; ***, $p \leq 0.001$).

Prospettive Future

L'inibizione di IRS-1 tramite NT_157 provoca una riduzione della capacità proliferativa.

Allo scopo di verificare gli effetti della diminuzione dei livelli di espressione di IRS-1, è stato utilizzato l'inibitore di IRS-1/2 su una delle linee di osteosarcoma umano a fenotipo non differenziante, le OS-19. In prima istanza è stata verificata l'efficacia dell'inibitore, misurando i livelli proteici di IRS-1 tramite Western Blotting. Sono state utilizzate 3 diverse concentrazioni della molecola: 300, 1000 e 3000 nM. In figura 26 è possibile osservare una drastica riduzione della proteina d'interesse alla dose 3000 nM di NT_157.

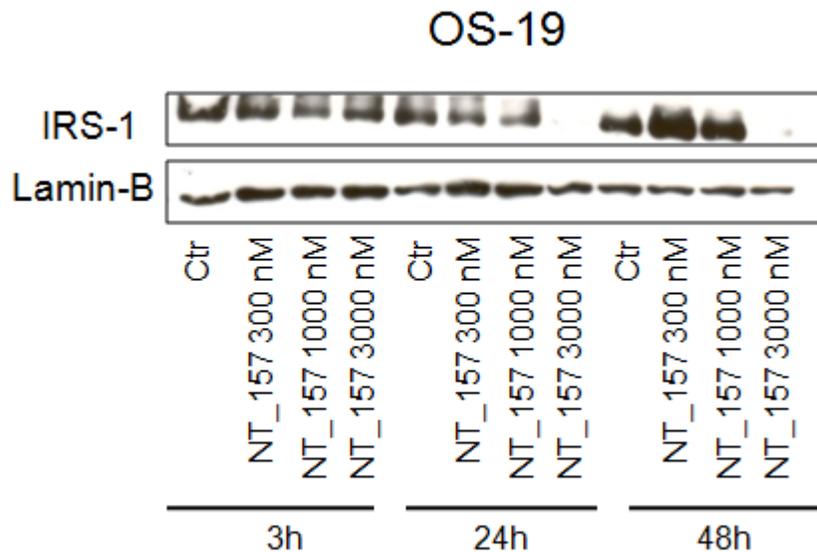


Figura 26. Analisi al Western Blot dei livelli di IRS-1 dopo trattamento con l'inibitore NT_157.

Prospettive Future

Successivamente è stato valutato l'effetto dello stesso inibitore sulla capacità proliferativa della stessa linea cellulare, mediante conta in trypan blu (Figura 27).

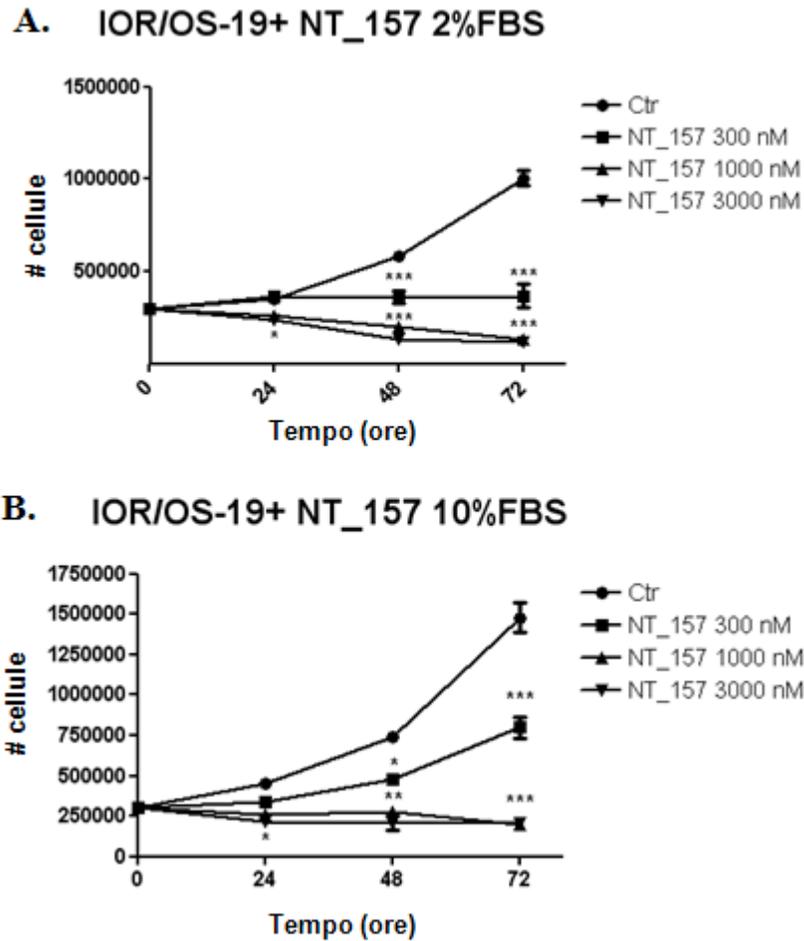


Figura 27. Inibizione della proliferazione esercitata da NT_157 sulla linea di osteosarcoma umano OS-19 (*, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.005$; ***, $p \leq 0.001$).

Discussione

L'osteosarcoma è un tumore primitivo maligno dell'osso. Nonostante la sua incidenza sia relativamente bassa, viene annoverato tra i tumori pediatrici più frequenti, rimanendo preminente anche tra adolescenti e giovani adulti [Longhi A, 2006]. La sua origine resta pressochè sconosciuta. Il quadro istologico riscontrato nei pazienti con osteosarcoma lo rende una neoplasia correlata al grado di differenziamento delle cellule, in cui anomalie genetiche ed epigenetiche interrompono il normale programma osteogenico cui vanno incontro le cellule staminali osteoprogenitrici. Alcuni aspetti del fenotipo differenziato vengono effettivamente conservati in queste cellule patologiche, quali l'espressione di marcatori precoci del differenziamento e la capacità delle cellule neoplastiche di produrre matrice ossea, seppure in maniera aberrante [Campanacci M, 1999].

Questo studio identifica IRS-1 come un fattore chiave nel passaggio da cellule immature a osteoblasti differenziati. IRS-1 è infatti il solo componente della pathway di IGF-1R i cui livelli di espressione diminuiscono durante la progressione del processo di differenziamento osteoblastico. I dati illustrati mostrano come il livello basale di IRS-1 sia un importante presupposto per l'avvio del differenziamento di cellule di osteosarcoma e di MSCs murine. In queste linee cellulari sia la down-regolazione sia la sovra-espressione di IRS-1 inibiscono il differenziamento osteoblastico. Bloccando la degradazione di IRS-1 ad opera del proteasoma è possibile inibire il processo differenziativo; questo suggerisce un importante ruolo della degradazione proteasomica nella regolazione del differenziamento osteoblastico IRS-1-dipendente. La regolazione del differenziamento osteoblastico attraverso l'espressione di IRS-1 potrebbe avere un profondo effetto sulla severità e sul potenziale metastatico degli osteosarcomi.

IRS-1 è una proteina di ancoraggio per IGF-1R e un regolatore chiave responsabile di diversi effetti dovuti all'attivazione di questo recettore, quali la proliferazione, il differenziamento e la trasformazione neoplastica [Valentinis B, 2001]. Nelle linee cellulari analizzate la via di segnalazione di IGF-1R è essenziale per il differenziamento osteoblastico. Infatti, utilizzando un anticorpo neutralizzante per bloccare il recettore, il differenziamento viene inibito: nelle SaOS-2 e

Discussione

nelle MSCs si assiste ad una riduzione della produzione dei marcatori di differenziamento osterix ed osteocalcina pari almeno al 50%. Confrontando questi risultati con quelli ottenuti in seguito alla down-regolazione di IRS-1 si nota come il differenziamento osteoblastico venga inibito ad un livello pari a quello raggiunto con l'utilizzo dell'anticorpo. In questo modo è stato dimostrato come pressochè l'intero segnale di differenziamento IGF-1R-dipendente sia dovuto alla regolazione di IRS-1, la cui funzione non può essere compensata o sostituita da altre proteine. Di conseguenza, IRS-1 è una proteina critica di questa via di segnalazione durante la transizione da cellule indifferenziate ad osteoblasti maturi.

I risultati riportati in letteratura riguardo al ruolo di IRS-1 nel differenziamento sono contrastanti. Questa proteina è stata indicata come un fattore che promuove la crescita e la proliferazione mentre inibisce l'apoptosi e il differenziamento in colture cellulari emopoietiche umane 32D, NIH3T3 murine e fibroblasti e cellule epiteliali umane [Valentinis B, 1999] [Baserga R., 2000]. Altri studi correlano IRS-1 alla promozione del differenziamento delle MSCs. Il signaling di IRS-1 attraverso PI3K-Akt regola il *commitment* IGF-1-indotto dei preadipociti in adipociti maturi nel tessuto adiposo bruno [Cypess AM, 2011], mentre studi *in vivo* attribuiscono il differenziamento dei precursori osteoblastici, come le MSCs, in osteoblasti maturi al signaling di IGF-1 ed Akt, presumibilmente in maniera IRS-1-dipendente. Tali evidenze sono supportate da uno studio che mostra come il TGF- β 1 regoli negativamente il differenziamento osteoblastico di MSCs umane, pre-osteoblasti MC3T3-E1 umani e cellule dei legamenti periodontali umane tramite la down-regolazione del signaling di IGF1. In seguito alla perdita di IRS-1, IGF-1 non è in grado di ristabilire il fenotipo differenziato in queste cellule [Ochiai H, 2012]. Noi stessi abbiamo verificato la contraddittorietà del ruolo di IRS-1 nell'ambito del differenziamento, infatti una linea cellulare (OS-9) esprime bassi livelli della proteina non si è mostrata in grado di differenziare in senso osteoblastico e due linee che esprimono alti livelli di IRS-1 (OS-14 e 8086) si sono invece dimostrate capaci di differenziare. Come dimostrato da uno studio del 2009, anche la localizzazione di IRS-1 è una condizione importante per il differenziamento delle BM-MSCs (bone-marrow MSCs) in condrociti: la localizzazione nucleare di IRS-1 totale e fosforilato sembra favorire la proliferazione, mentre il differenziamento condrogenico è favorito da una localizzazione citoplasmatica della proteina [Longobardi L, 2009]. Il coinvolgimento diretto di IRS-1 nel differenziamento è stato dimostrato anche tramite l'utilizzo di shRNAs contro IRS-1 nelle MSCs, in seguito al quale le cellule non riescono a differenziare in osteoblasti in assenza

Discussione

della proteina o quando trattate con inibitori di PI3K [Granero-Molto F, 2011]. I livelli di IRS-1 nei nostri modelli risultano essere direttamente correlati al differenziamento osteoblastico di cellule cancerose così come di cellule normali. Nella linea di osteosarcoma umano SaOS-2 la quantità di IRS-1 diminuisce durante il differenziamento osteoblastico a partire dal giorno 7. La ragione di questa diminuzione dei livelli proteici resta da determinare ma suggerisce che IRS-1 sia richiesto solo durante le fasi iniziali di questo tipo di differenziamento e che il *commitment* al differenziamento terminale porti alla down-regolazione di IRS-1. Ancora più importante della diminuzione di IRS-1 durante il processo differenziativo risulta essere il livello di IRS-1 all'inizio del differenziamento. Quando IRS-1 è over-espresso nella stessa linea cellulare SaOS-2, il differenziamento osteoblastico viene inibito rispetto a quanto avviene nelle stesse cellule wild-type. La stessa osservazione è stata effettuata nei precursori mieloidi 32D, che normalmente non esprimono IRS-1, dove la sua sovra-espressione inibisce il differenziamento e provoca anche l'aumento della tumorigenicità delle cellule [Valentinis B, 1999]. Anche nel nostro modello di osteosarcoma umano l'aumentata espressione di IRS-1 ha portato all'accentuazione delle proprietà neoplastiche di queste cellule: le linee Sa/pool IRS-1 e OS-7/pool IRS-1 hanno mostrato una capacità proliferativa, una capacità migratoria e una capacità di formare colonie in condizioni di ancoraggio indipendenza superiore a quella delle linee parentali. I successivi esperimenti *in vivo*, effettuati mediante inoculi sottocute ed endovena, hanno confermato i risultati ottenuti *in vitro*: le cellule trasfettate per over-esprimere la proteina hanno dato tumori di dimensioni maggiori rispetto a quelli generati dalle linee parentali, così come hanno formato un maggior numero di metastasi sperimentalmente indotte, sia a livello polmonare che a livello epatico. L'over-espressione di IRS-1 ha influenzato le caratteristiche di malignità di queste cellule anche diminuendone la capacità differenziativa.

Sorprendentemente, si assiste alla stessa inibizione del differenziamento quando l'espressione di IRS-1 viene manipolata tramite shRNAs in MSCs e SaOS-2 riducendola. La diminuzione dei livelli di IRS-1 in queste cellule inibisce infatti il differenziamento quando si paragonano le cellule manipolate alle cellule controllo. Come precedentemente riportato, il knockdown di IRS-1 riduce il differenziamento osteoblastico delle MSCs [Granero-Molto F, 2011] [Ochiai H, 2012] [Cypess AM, 2011]. Allo scopo di avere un modello di osteosarcoma più vicino e quindi più paragonabile anche alla linea mesenchimale murina, è stata impiegata la linea

Discussione

di osteosarcoma murino 8086, che mostra una quantità di IRS-1 largamente superiore a quella riscontrata nelle SaOS-2 e nelle MSCs. Nonostante questa peculiarità, le cellule 8086 sono in grado di differenziare in senso osteoblastico. L'shRNA impiegato è stato in grado di ridurre i livelli di espressione della proteina del 51%, ma i livelli di espressione di IRS-1 mostrati dalle 8086 risultano comunque essere 5 volte superiori rispetto alle altre linee cellulari impiegate e pari alla linea Sa/pool IRS-1, la quale mostra una capacità differenziativa ridotta.

L'importanza dei livelli proteici di IRS-1 è stata confermata dalla valutazione dell'attività di IRS-1 in questo contesto. Un vasto numero di proteine inclusa PI3K può legare IRS-1 una volta fosforilata sui residui tirosinici, consentendo la propagazione del segnale di IGF-1R. Nei modelli considerati non si riscontra alcuna differenza nello stato di fosforilazione in Tyr612 (uomo)/Tyr 608 (topo) di IRS-1, fosforilazione necessaria per l'interazione PI3K-IRS-1, durante il differenziamento osteoblastico. Questo suggerisce che IRS-1 sia ancora in grado di interagire con PI3K ed altre proteine di legame. Di conseguenza, la funzione di IRS-1 di proteina di ancoraggio potrebbe dipendere dalla regolazione stechiometrica dei target di legame a valle [Good MC, 2011]. Nel caso dell'over-espressione, sopra una certa soglia IRS-1 può attivare chinasi e substrati partner, come PI3K e Akt, in complessi separati, inibendo il signaling. Nella situazione opposta, cioè in assenza di IRS-1, tali complessi non sono presenti in quantità sufficiente a propagare il segnale. Un esempio è la via canonica di Wnt/ β -catenina, che regola positivamente la formazione dell'osso e il differenziamento osteoblastico. Tale funzione è dipendente dalla localizzazione nucleare e dalla attività trascrizionale di β -catenina, conseguenza della prevenzione della degradazione proteasomica di β -catenina indotta da Wnt che ne aumenta quindi la concentrazione citoplasmatica [Milat F, 2009]. IRS-1 può legare β -catenina e mediare la sua traslocazione nel nucleo, ma in assenza di livelli di IRS-1 sufficienti nel citoplasma, la traslocazione nucleare di β -catenina non può essere ostacolata [Chen J, 2005]. Si rende necessario uno studio più attento dello stato di fosforilazione dei residui target, degli effetti del legame di IRS-1 alle proteine partners e della localizzazione di questi complessi al fine comprendere meglio la funzione di sequestro svolta da IRS-1.

Uno dei modi attraverso cui la cellula può regolare i livelli di IRS-1 è la sua degradazione attraverso il proteasoma. L'inibitore del proteasoma MG-132 è stato quindi utilizzato per indurre

Discussione

un accumulo di IRS-1 nelle linee cellulari SaOS-2 ed MSCs. L'aumento della quantità della proteina ha portato alla diminuzione della capacità differenziativa delle cellule, al pari di quanto avvenuto over-esprimendo IRS-1 tramite trasfezione nelle SaOS-2. Tale accumulo ha avuto delle forti ripercussioni, come dimostrato in diverse linee tumorali umane nelle quali IRS-1 è spesso sovra-espresso. L'espressione ectopica o aumentata di IRS-1 può portare alla trasformazione cellulare e in questo scenario è noto il coinvolgimento del proteasoma nella regolazione dei livelli di IRS-1. L'associazione di IRS-1 alla caveolina-1 in fibroblasti derivati da embrioni di topo è in grado di proteggere IRS-1 da questo tipo di degradazione, portando ad un aumento dei livelli di IRS-1 e ad una maggiore capacità clonogenica *in vitro* [Chen J, 2008]. Pertanto, la regolazione dei livelli di IRS-1 potrebbe migliorare le terapie utilizzate nella cura del cancro, consentendo alle cellule di raggiungere il differenziamento terminale.

L'osteosarcoma rappresenta un esempio di come la regolazione della pathway di IGF-1R e in particolare di IRS-1 potrebbe essere importante nella progressione della malattia, poichè lo stato di differenziamento delle cellule tumorali influenza l'aggressività del tumore stesso [Scotlandi K, 2008]. In questa patologia il normale processo di differenziamento osteoblastico a partire da cellule staminali mesenchimali è interrotto, portando allo sviluppo di cellule indifferenziate maligne e ad una prognosi peggiore. I risultati ottenuti dimostrano che l'alterata espressione di IRS-1 inibisce il differenziamento osteoblastico ed aumenta le caratteristiche tumorali delle cellule, pertanto IRS-1 potrebbe essere un target da sfruttare allo scopo di modulare il differenziamento cellulare in pazienti affetti da osteosarcoma o da altre forme di cancro nelle quali IRS-1 svolga un ruolo simile e il grado di differenziamento cellulare rappresenti un parametro importante ai fini prognostici.

Bibliografia

Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung UI, Kubota N *et al* (2004). PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *The Journal of clinical investigation* **113**: 846-855.

Anderson PM, Tomaras M, McConnell K (2010). Mifamurtide in osteosarcoma--a practical review. *Drugs Today (Barc)* **46**: 327-337.

Angelov D, (2006). Nucleolin is a histone chaperon with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes, *EMBO J.* **25** 1669–1679.

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, 3rd, Johnson RS *et al* (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* **372**: 186-190.

Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L *et al* (2000). Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* **406**: 641-645.

Arteaga CL, Kitten LJ, Coronado EB, Jacobs S, Kull FC, Jr., Allred DC *et al* (1989). Blockade of the type I somatomedin receptor inhibits growth of human breast cancer cells in athymic mice. *The Journal of clinical investigation* **84**: 1418-1423.

Barrios H, Castresana JS, Ruiz J, et al. (1994). Amplification of the cmyc proto-oncogene in soft tissue sarcomas. *Oncology* **51**:13–7.

Baserga R (1994). Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell* **79**: 927-930.

Baserga R (2000). The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Oncogene* **19**: 5574-5581.

Baserga R (2009). The insulin receptor substrate-1: a biomarker for cancer? *Experimental cell research* **315**: 727-732.

Bibliografia

- Benassi MS, Molendini L, Gamberi G, Ragazzini P, Sollazzo MR, Merli M *et al* (1999). Alteration of pRb/p16/cdk4 regulation in human osteosarcoma. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* **84**: 489-493.
- Berg CE, Lavan BE, Rondinone CM (2002). Rapamycin partially prevents insulin resistance induced by chronic insulin treatment. *Biochemical and biophysical research communications* **293**: 1021-1027.
- Bialek P, Kern B, Yang X, Schrock M, Sosic D, Hong N *et al* (2004). A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Developmental cell* **6**: 423-435.
- Blyth K, Cameron ER, Neil JC (2005). The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nature reviews Cancer* **5**: 376-387.
- Braulke T (1999). Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **31**: 242-246.
- Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nature medicine* **3**: 1271-1274.
- Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinger BR *et al* (1995). Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* **377**: 646-649.
- Burfoot MS, Rogers NC, Watling D, Smith JM, Pons S, Paonessaw G *et al* (1997). Janus kinase-dependent activation of insulin receptor substrate 1 in response to interleukin-4, oncostatin M, and the interferons. *The Journal of biological chemistry* **272**: 24183-24190.
- Byron SA, Horwitz KB, Richer JK, Lange CA, Zhang X, Yee D (2006). Insulin receptor substrates mediate distinct biological responses to insulin-like growth factor receptor activation in breast cancer cells. *British journal of cancer* **95**: 1220-1228.
- Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE (2003). Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *The Journal of biological chemistry* **278**: 25323-25330.
- Campanacci M. "Bone and soft tissue tumors". 2nd Edition, Wien: Springer-Verlag, 1999*

Bibliografia

- Campanacci M, Bacci G, Bertoni F, Picci P, Minutillo A, Franceschi C (1981). The treatment of osteosarcoma of the extremities: twenty year's experience at the Istituto Ortopedico Rizzoli. *Cancer* **48**: 1569-1581.
- Canalis E (2009). Growth factor control of bone mass. *Journal of cellular biochemistry* **108**: 769-777.
- Chang Q, Li Y, White MF, Fletcher JA, Xiao S (2002). Constitutive activation of insulin receptor substrate 1 is a frequent event in human tumors: therapeutic implications. *Cancer research* **62**: 6035-6038.
- Chen D, Zhao M, Mundy GR (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* **22**: 233-241.
- Chen J, Wu A, Sun H, Drakas R, Garofalo C, Cascio S *et al* (2005). Functional significance of type 1 insulin-like growth factor-mediated nuclear translocation of the insulin receptor substrate-1 and beta-catenin. *The Journal of biological chemistry* **280**: 29912-29920.
- Chen J, Capozza F, Wu A, Deangelis T, Sun H, Lisanti M *et al* (2008). Regulation of insulin receptor substrate-1 expression levels by caveolin-1. *Journal of cellular physiology* **217**: 281-289.
- Choi JY, Pratap J, Javed A, Zaidi SK, Xing L, Balint E *et al* (2001). Subnuclear targeting of Runx/Cbfa/AML factors is essential for tissue-specific differentiation during embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 8650-8655.
- Clark SF, Molero JC, James DE (2000). Release of insulin receptor substrate proteins from an intracellular complex coincides with the development of insulin resistance. *The Journal of biological chemistry* **275**: 3819-3826.
- Clemens TL, Chernausk SD (2004). Genetic strategies for elucidating insulin-like growth factor action in bone. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* **14**: 195-199.
- Clemmons DR (2001). Use of mutagenesis to probe IGF-binding protein structure/function relationships, *Endocr. Rev.* **22**:800–817.
- Cormier JN, Pollock RE (2004). Soft tissue sarcomas. *CA: a cancer journal for clinicians* **54**: 94-109.

Bibliografia

Craparo A, O'Neill TJ, Gustafson TA (1995). Non-SH2 domains within insulin receptor substrate-1 and SHC mediate their phosphotyrosine-dependent interaction with the NPEY motif of the insulin-like growth factor I receptor. *The Journal of biological chemistry* **270**: 15639-15643.

Cristofanelli B, Valentini B, Soddu S, Rizzo MG, Marchetti A, Bossi G *et al* (2000). Cooperative transformation of 32D cells by the combined expression of IRS-1 and V-Ha-Ras. *Oncogene* **19**: 3245-3255.

Cypess AM, Zhang H, Schulz TJ, Huang TL, Espinoza DO, Kristiansen K *et al* (2011). Insulin/IGF-I regulation of neccin and brown adipocyte differentiation via CREB- and FoxO1-associated pathways. *Endocrinology* **152**: 3680-3689.

D'Ambrosio C, Keller SR, Morrione A, Lienhard GE, Baserga R, Surmacz E (1995). Transforming potential of the insulin receptor substrate 1. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **6**: 557-562.

D'Ercole AJ (2008). Expanding the mind: IGF-I and brain development. *Endocrinology*. Dec;**149**(12):5958-62.

De Fea K, Roth RA (1997). Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **272**: 31400-31406.

DeAngelis T, Chen J, Wu A, Prisco M, Baserga R (2006). Transformation by the simian virus 40 T antigen is regulated by IGF-I receptor and IRS-1 signaling. *Oncogene* **25**: 32-42.

Deyrup AT, Montag AG, Inwards CY, Xu Z, Swee RG, Krishnan Unni K (2007). Sarcomas arising in Paget disease of bone: a clinicopathologic analysis of 70 cases. *Archives of pathology & laboratory medicine* **131**: 942-946.

Di Cresce C, Koropatnick J (2010). Antisense treatment in human prostate cancer and melanoma. *Current cancer drug targets* **10**: 555-565.

DiGiovanni J, Kiguchi K, Frijhoff A, Wilker E, Bol DK, Beltran L *et al* (2000). Deregulated expression of insulin-like growth factor 1 in prostate epithelium leads to neoplasia in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 3455-3460.

Dobrev G, Chahrouh M, Dautzenberg M, Chirivella L, Kanzler B, Farinas I *et al* (2006). SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation. *Cell* **125**: 971-986.

Bibliografia

Dorfman HD, Czerniak B (1995). Bone cancers. *Cancer* **75**: 203-210.

Ducy P, Karsenty G (1995). Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Molecular and cellular biology* **15**: 1858-1869.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**: 747-754.

Duguay SJ, Milewski WM, Young BD, Nakayama K, Steiner DF (1997). Processing of wild-type and mutant proinsulin-like growth factor-IA by subtilisin-related proprotein convertases. *The Journal of biological chemistry* **272**: 6663-6670.

Eck MJ, Dhe-Paganon S, Trub T, Nolte RT, Shoelson SE (1996). Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Cell* **85**: 695-705.

Efeyan A, Sabatini DM (2010). mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Current opinion in cell biology* **22**: 169-176.

Engels EA (2005). Cancer risk associated with receipt of vaccines contaminated with simian virus 40: epidemiologic research. *Expert review of vaccines* **4**: 197-206.

Enneking WF (1979). Advances and treatment of primary bone tumors. *The Journal of the Florida Medical Association* **66**: 28-30.

Esposito DL, Aru F, Lattanzio R, Morgano A, Abbondanza M, Malekzadeh R *et al* (2012). The insulin receptor substrate 1 (IRS1) in intestinal epithelial differentiation and in colorectal cancer. *PloS one* **7**: e36190.

Feng Y, Dimitrov DS (2012). Antibody-based therapeutics against components of the IGF system. *Oncoimmunology* **1**: 1390-1391.

Finkel MP, Biskis BO, Jinkins PB (1966). Virus induction of osteosarcomas in mice. *Science* **151**: 698-701.

Frampton JE (2010). Mifamurtide: a review of its use in the treatment of osteosarcoma. *Paediatric drugs* **12**: 141-153.

Bibliografia

- Frystyk J (2004). Free insulin-like growth factors -- measurements and relationships to growth hormone secretion and glucose homeostasis. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* **14**: 337-375.
- Fuchs B, Pritchard DJ (2002). Etiology of osteosarcoma. *Clinical orthopaedics and related research*: 40-52.
- Furstenberger G, Senn HJ (2002). Insulin-like growth factors and cancer. *The lancet oncology* **3**: 298-302.
- Gallagher EJ, LeRoith D (2011). Minireview: IGF, Insulin, and Cancer. *Endocrinology* **152**: 2546-2551.
- Gammeltoft S, Ballotti R, Kowalski A, Westermark B, Van Obberghen E (1988). Expression of two types of receptor for insulin-like growth factors in human malignant glioma. *Cancer research* **48**: 1233-1237.
- Gandhi A, Beam HA, O'Connor JP, Parsons JR, Lin SS (2005). The effects of local insulin delivery on diabetic fracture healing. *Bone* **37**: 482-490.
- Garofalo C, Manara MC, Nicoletti G, Marino MT, Lollini PL, Astolfi A *et al* (2011). Efficacy of and resistance to anti-IGF-1R therapies in Ewing's sarcoma is dependent on insulin receptor signaling. *Oncogene* **30**: 2730-2740.
- Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS *et al* (2005). Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *The Journal of biological chemistry* **280**: 33132-33140.
- Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, Scott EW *et al* (2005). Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* **7**: 967-976.
- Gobbi G, Sangiorgi L, Lenzi L, Casadei R, Canaider S, Strippoli P *et al* (2002). Seven BMPs and all their receptors are simultaneously expressed in osteosarcoma cells. *International journal of oncology* **20**: 143-147.
- Goetsch L, Corvaia N (2009). Insulin-like growth factor receptor type I as a target for cancer therapy. *Immunotherapy* **1**: 265-279.

Bibliografia

Good MC, Zalatan JG, Lim WA (2011). Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science* **332**: 680-686.

Gorlick R, Anderson P, Andrulis I, Arndt C, Beardsley GP, Bernstein M *et al* (2003). Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: meeting summary. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**: 5442-5453.

Granero-Molto F, Myers TJ, Weis JA, Longobardi L, Li T, Yan Y *et al* (2011). Mesenchymal stem cells expressing insulin-like growth factor-I (MSCIGF) promote fracture healing and restore new bone formation in *Irs1* knockout mice: analyses of MSCIGF autocrine and paracrine regenerative effects. *Stem Cells* **29**: 1537-1548.

Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA (2003). Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **278**: 8199-8211.

Grigoriadis AE, Wang ZQ, Wagner EF (1995). Fos and bone cell development: lessons from a nuclear oncogene. *Trends in genetics : TIG* **11**: 436-441.

Gualberto, A. *et al.* (2008). Characterization of NSCLC patients responding to anti-IGF-IR therapy. *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 Suppl.), 8000.

Guertin DA, Sabatini DM (2005). An expanding role for mTOR in cancer. *Trends in molecular medicine* **11**: 353-361.

Gutierrez S, Javed A, Tennant DK, van Rees M, Montecino M, Stein GS *et al* (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) beta and delta activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specific expression. *The Journal of biological chemistry* **277**: 1316-1323.

Habuchi T (2006). Common genetic polymorphisms and prognosis of sporadic cancers: prostate cancer as a model. *Future Oncol* **2**: 233-245.

Hakuno F, Yamauchi Y, Kaneko G, Yoneyama Y, Nakae J, Chida K *et al* (2011). Constitutive expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 inhibits myogenic differentiation through nuclear exclusion of Foxo1 in L6 myoblasts. *PloS one* **6**: e25655.

Bibliografia

Hansen MF, Seton M, Merchant A (2006). Osteosarcoma in Paget's disease of bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **21 Suppl 2**: P58-63.

Hartmann C (2006). A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends in cell biology* **16**: 151-158.

Hartog H, Wesseling J, Boezen HM, van der Graaf WT (2007). The insulin-like growth factor 1 receptor in cancer: old focus, new future. *Eur J Cancer* **43**: 1895-1904.

Hassan MQ, Javed A, Morasso MI, Karlin J, Montecino M, van Wijnen AJ *et al* (2004). Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. *Molecular and cellular biology* **24**: 9248-9261.

Hayden JB, Hoang BH (2006). Osteosarcoma: basic science and clinical implications. *The Orthopedic clinics of North America* **37**: 1-7.

Haydon RC, Deyrup A, Ishikawa A, Heck R, Jiang W, Zhou L *et al* (2002). Cytoplasmic and/or nuclear accumulation of the beta-catenin protein is a frequent event in human osteosarcoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* **102**: 338-342.

He W, Craparo A, Zhu Y, O'Neill TJ, Wang LM, Pierce JH *et al* (1996). Interaction of insulin receptor substrate-2 (IRS-2) with the insulin and insulin-like growth factor I receptors. Evidence for two distinct phosphotyrosine-dependent interaction domains within IRS-2. *The Journal of biological chemistry* **271**: 11641-11645.

Heidegger I, Pircher A, Klocker H, Massoner P (2011). Targeting the insulin-like growth factor network in cancer therapy. *Cancer biology & therapy* **11**: 701-707.

Heron-Milhavet L, LeRoith D (2002). Insulin-like growth factor I induces MDM2-dependent degradation of p53 via the p38 MAPK pathway in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry* **277**: 15600-15606.

Hoang BH, Kubo T, Healey JH, Sowers R, Mazza B, Yang R *et al* (2004). Expression of LDL receptor-related protein 5 (LRP5) as a novel marker for disease progression in high-grade osteosarcoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* **109**: 106-111.

Bibliografia

Holleville N, Mateos S, Bontoux M, Bollerot K, Monsoro-Burq AH (2007). Dlx5 drives Runx2 expression and osteogenic differentiation in developing cranial suture mesenchyme. *Developmental biology* **304**: 860-874.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271**: 665-668.

Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G (2006). Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology 2000* **41**: 48-72.

Huvos AG. (1991). Bone Tumors: Diagnosis. Treatment and Prognosis 2nd edition. Philadelphia, W.B. Saunders. Co.

Jaffe N. *Malignant bone tumors in children: incidence and etiologic considerations*. In: Jaffe N, ed. *Solid Tumors in Childhood*. Littleton, MA: PSG Publishing Co; 1979:1-10.

Janghorbani M, Feskanich D, Willett WC, Hu F (2006). Prospective study of diabetes and risk of hip fracture: the Nurses' Health Study. *Diabetes care* **29**: 1573-1578.

Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W (2005). Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocrine reviews* **26**: 743-774.

Jeon MJ, Kim JA, Kwon SH, Kim SW, Park KS, Park SW *et al* (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *The Journal of biological chemistry* **278**: 23270-23277.

Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC (1998). Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **13**: 793-802.

Jochum W, David JP, Elliott C, Wutz A, Plenk H, Jr., Matsuo K *et al* (2000). Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nature medicine* **6**: 980-984.

Jones DC, Wein MN, Oukka M, Hofstaetter JG, Glimcher MJ, Glimcher LH (2006). Regulation of adult bone mass by the zinc finger adapter protein Schnurri-3. *Science* **312**: 1223-1227.

Bibliografia

- Jones RA, Campbell CI, Wood GA, Petrik JJ, Moorehead RA (2009). Reversibility and recurrence of IGF-IR-induced mammary tumors. *Oncogene* **28**: 2152-2162.
- Kansara M, Thomas DM (2007). Molecular pathogenesis of osteosarcoma. *DNA and cell biology* **26**: 1-18.
- Kenner L, Hoebertz A, Beil FT, Keon N, Karreth F, Eferl R *et al* (2004). Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects. *The Journal of cell biology* **164**: 613-623.
- Kloen P, Gebhardt MC, Perez-Atayde A, Rosenberg AE, Springfield DS, Gold LI *et al* (1997). Expression of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in osteosarcomas: TGF-beta3 is related to disease progression. *Cancer* **80**: 2230-2239.
- Kobayashi H, Gao Y, Ueta C, Yamaguchi A, Komori T (2000). Multilineage differentiation of Cbfa1-deficient calvarial cells in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* **273**: 630-636.
- Koda M, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Sulkowski S (2005). Expression of insulin receptor substrate 1 in primary breast cancer and lymph node metastases. *Journal of clinical pathology* **58**: 645-649.
- Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K *et al* (2005). NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nature medicine* **11**: 880-885.
- Kolb EA, Kamara D, Zhang W, Lin J, Hingorani P, Baker L *et al* (2010). R1507, a fully human monoclonal antibody targeting IGF-1R, is effective alone and in combination with rapamycin in inhibiting growth of osteosarcoma xenografts. *Pediatric blood & cancer* **55**: 67-75.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K *et al* (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**: 755-764.
- Komori T (2006). [Mechanism of transcriptional regulation by Runx2 in osteoblasts]. *Clinical calcium* **16**: 801-807.
- Krassas GE, Papadopoulou P, Koliakos G, Konstantinidis T, Kalothetou K (2003). Growth hormone, insulin growth factor-1, and igf binding protein-3 axis relationship with bone mineral density among healthy men. *Archives of andrology* **49**: 191-199.

Bibliografia

- Kream BE, Smith MD, Canalis E, Raisz LG (1985). Characterization of the effect of insulin on collagen synthesis in fetal rat bone. *Endocrinology* **116**: 296-302.
- Krook A, O'Rahilly S (1996). Mutant insulin receptors in syndromes of insulin resistance. *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism* **10**: 97-122.
- Lassak A, Del Valle L, Peruzzi F, Wang JY, Enam S, Croul S *et al* (2002). Insulin receptor substrate 1 translocation to the nucleus by the human JC virus T-antigen. *The Journal of biological chemistry* **277**: 17231-17238.
- Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE (1997). A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *The Journal of biological chemistry* **272**: 21403-21407.
- Lawlor MA, Alessi DR (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Journal of cell science* **114**: 2903-2910.
- Le Marchand L, Donlon T, Seifried A, Kaaks R, Rinaldi S, Wilkens LR (2002). Association of a common polymorphism in the human GH1 gene with colorectal neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute* **94**: 454-460.
- Lee CS, Yi JS, Jung SY, Kim BW, Lee NR, Choo HJ *et al* (2010). TRIM72 negatively regulates myogenesis via targeting insulin receptor substrate-1. *Cell death and differentiation* **17**: 1254-1265.
- Lee H, Volonte D, Galbiati F, Iyengar P, Lublin DM, Bregman DB *et al* (2000). Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol Endocrinol* **14**: 1750-1775.
- Lengner CJ, Steinman HA, Gagnon J, Smith TW, Henderson JE, Kream BE *et al* (2006). Osteoblast differentiation and skeletal development are regulated by Mdm2-p53 signaling. *The Journal of cell biology* **172**: 909-921.
- Li J, DeFea K, Roth RA (1999). Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *The Journal of biological chemistry* **274**: 9351-9356.
- Li Y, Meng G, Huang L, Guo QN (2009). Hypomethylation of the P3 promoter is associated with up-regulation of IGF2 expression in human osteosarcoma. *Human pathology* **40**: 1441-1447.

Bibliografia

- Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ *et al* (2004). Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* **14**: 1-41.
- Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y *et al* (2001). Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *The Journal of cell biology* **155**: 157-166.
- Logan CY, Nusse R (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* **20**: 781-810.
- Lonardo F, Ueda T, Huvos AG, Healey J, Ladanyi M (1997). p53 and MDM2 alterations in osteosarcomas: correlation with clinicopathologic features and proliferative rate. *Cancer* **79**: 1541-1547.
- Longhi A, Barbieri E, Fabbri N, Macchiagodena M, Favale L, Lippo C *et al* (2003). Radiation-induced osteosarcoma arising 20 years after the treatment of Ewing's sarcoma. *Tumori* **89**: 569-572.
- Longhi A, Errani C, De Paolis M, Mercuri M, Bacci G (2006). Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art. *Cancer treatment reviews* **32**: 423-436.
- Longobardi L, Granero-Molto F, O'Rear L, Myers TJ, Li T, Kregor PJ *et al* (2009). Subcellular localization of IRS-1 in IGF-I-mediated chondrogenic proliferation, differentiation and hypertrophy of bone marrow mesenchymal stem cells. *Growth Factors* **27**: 309-320.
- Luk F, Yu Y, Walsh WR, Yang JL (2011). IGF1R-targeted therapy and its enhancement of doxorubicin chemosensitivity in human osteosarcoma cell lines. *Cancer investigation* **29**: 521-532.
- Ma L, Golden S, Wu L, Maxson R (1996). The molecular basis of Boston-type craniosynostosis: the Pro148-->His mutation in the N-terminal arm of the MSX2 homeodomain stabilizes DNA binding without altering nucleotide sequence preferences. *Human molecular genetics* **5**: 1915-1920.
- MacEwen EG, Pastor J, Kutzke J, Tsan R, Kurzman ID, Thamm DH *et al* (2004). IGF-1 receptor contributes to the malignant phenotype in human and canine osteosarcoma. *Journal of cellular biochemistry* **92**: 77-91.

Bibliografia

- Maelandsmo GM, Berner JM, Florenes VA, Forus A, Hovig E, Fodstad O *et al* (1995). Homozygous deletion frequency and expression levels of the CDKN2 gene in human sarcomas--relationship to amplification and mRNA levels of CDK4 and CCND1. *British journal of cancer* **72**: 393-398.
- Marie PJ (2008). Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Archives of biochemistry and biophysics* **473**: 98-105.
- Marina N, Gorlick R (2009). Immune approaches to treating osteosarcoma. *Cancer biology & therapy* **8**: 981-983.
- Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, Amizuka N, Ito M, Fukuyama R *et al* (2007). Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **236**: 1876-1890.
- Mascarenhas L, Siegel S, Spector L, et al. Malignant bone tumors. In: Bleyer A, O'Leary M, Barr R, et al., eds. *Cancer Epidemiology in Older Adolescents and Young Adults 15 to 29 Years of Age, Including SEER Incidence and Survival: 1975–2000*.
- Massague J (1998). TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry* **67**: 753-791.
- McIntyre JF, Smith-Sorensen B, Friend SH, Kassell J, Borresen AL, Yan YX *et al* (1994). Germline mutations of the p53 tumor suppressor gene in children with osteosarcoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **12**: 925-930.
- Mendez R, Welsh G, Kleijn M, Myers MG, White MF, Proud CG *et al* (2001). Regulation of protein synthesis by insulin through IRS-1. *Progress in molecular and subcellular biology* **26**: 49-93.
- Mendoza S, David H, Gaylord GM, Miller CW (2005). Allelic loss at 10q26 in osteosarcoma in the region of the BUB3 and FGFR2 genes. *Cancer genetics and cytogenetics* **158**: 142-147.
- Mendoza SM, Konishi T, Miller CW (1998). Integration of SV40 in human osteosarcoma DNA. *Oncogene* **17**: 2457-2462.

Bibliografia

Merchant MS, Melchionda F, Sinha M, Khanna C, Helman L, Mackall CL (2007). Immune reconstitution prevents metastatic recurrence of murine osteosarcoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **56**: 1037-1046.

Meyers PA, Heller G, Healey J, Huvos A, Lane J, Marcove R *et al* (1992). Chemotherapy for nonmetastatic osteogenic sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **10**: 5-15.

Milat F, Ng KW (2009). Is Wnt signalling the final common pathway leading to bone formation? *Molecular and cellular endocrinology* **310**:52-62.

Monesi V, Adamo S, Carinci P, Molinaro M, Siracusa G, Stefanini M, Ziparo E (2008). Istologia di V. Monesi. Piccin Editore, 5° edizione.

Moore C, Eslin D, Levy A, Roberson J, Giusti V, Sutphin R (2010). Prognostic significance of early lymphocyte recovery in pediatric osteosarcoma. *Pediatric blood & cancer* **55**: 1096-1102.

Murphey MD, Robbin MR, McRae GA, Flemming DJ, Temple HT, Kransdorf MJ (1997). The many faces of osteosarcoma. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* **17**: 1205-1231.

Myers MG, Jr., Grammer TC, Brooks J, Glasheen EM, Wang LM, Sun XJ *et al* (1995). The pleckstrin homology domain in insulin receptor substrate-1 sensitizes insulin signaling. *The Journal of biological chemistry* **270**: 11715-11718.

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR *et al* (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**: 17-29.

Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H (2006). Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene* **372**: 62-70.

O'Connor R (2003). Regulation of IGF-I receptor signaling in tumor cells. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **35**: 771-777.

Ochiai H, Okada S, Saito A, Hoshi K, Yamashita H, Takato T *et al* (2012). Inhibition of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) expression by prolonged transforming growth factor-beta1 (TGF-

Bibliografia

beta1) administration suppresses osteoblast differentiation. *The Journal of biological chemistry* **287**: 22654-22661.

Ogawa W, Matozaki T, Kasuga M (1998). Role of binding proteins to IRS-1 in insulin signalling. *Molecular and cellular biochemistry* **182**: 13-22.

Ornitz DM, Marie PJ (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes & development* **16**: 1446-1465.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR *et al* (1997). Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**: 765-771.

Ouban A, Muraca P, Yeatman T, Coppola D (2003). Expression and distribution of insulin-like growth factor-1 receptor in human carcinomas. *Human pathology* **34**: 803-808.

Pandini G, Vigneri R, Costantino A, Frasca F, Ippolito A, Fujita-Yamaguchi Y *et al* (1999). Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancers leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signaling. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **5**: 1935-1944.

Parton RG, Simons K (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 185-194.

Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ (2004). Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* **103**: 1662-1668.

Pete G, Fuller CR, Oldham JM, Smith DR, D'Ercole AJ, Kahn CR *et al* (1999). Postnatal growth responses to insulin-like growth factor I in insulin receptor substrate-1-deficient mice. *Endocrinology* **140**: 5478-5487.

Picci P (2007). Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). *Orphanet journal of rare diseases* **2**: 6.

Pollak M, Richard M (1990). Suramin blockade of insulinlike growth factor I-stimulated proliferation of human osteosarcoma cells. *Journal of the National Cancer Institute* **82**: 1349-1352.

Bibliografia

Pollak M, Sem AW, Richard M, Tetenes E, Bell R (1992). Inhibition of metastatic behavior of murine osteosarcoma by hypophysectomy. *Journal of the National Cancer Institute* **84**: 966-971.

Pollak M (2008). Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature reviews Cancer* **8**: 915-928.

Pun KK, Lau P, Ho PW (1989). The characterization, regulation, and function of insulin receptors on osteoblast-like clonal osteosarcoma cell line. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **4**: 853-862.

Ragazzini P, Gamberi G, Benassi MS, Orlando C, Sestini R, Ferrari C *et al* (1999). Analysis of SAS gene and CDK4 and MDM2 proteins in low-grade osteosarcoma. *Cancer detection and prevention* **23**: 129-136.

Ravichandran KS (2001). Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* **20**: 6322-6330.

Reidy-Lagunes DL, Vakiani E, Segal MF, Hollywood EM, Tang LH, Solit DB *et al* (2012). A phase 2 study of the insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor MK-0646 in patients with metastatic, well-differentiated neuroendocrine tumors. *Cancer* **118**: 4795-4800.

Reiss K (2001). Mechanism of regulation of cell adhesion and motility by insulin receptor substrate-1 in prostate cancer cells. *Oncogene* **20**:490–500.

Reiss K, Del Valle L, Lassak A, Trojanek J (2012). Nuclear IRS-1 and cancer. *Journal of cellular physiology* **227**: 2992-3000.

Rosemburg SA (1979). Treatment of osteogenic sarcoma. Effect of adjuvant high-dose Methotrexate after amputation. *Cancer Treat Rep.* **63**:739–51.

Rubin R, Arzumanyan A, Soliera AR, Ross B, Peruzzi F, Prisco M (2007). Insulin receptor substrate (IRS)-1 regulates murine embryonic stem (mES) cells self-renewal. *Journal of cellular physiology* **213**: 445-453.

Salani B, Briatore L, Garibaldi S, Cordera R, Maggi D (2008). Caveolin-1 down-regulation inhibits insulin-like growth factor-I receptor signal transduction in H9C2 rat cardiomyoblasts. *Endocrinology* **149**: 461-465.

Bibliografia

Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P (2007). The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocrine reviews* **28**: 20-47.

Sandberg AA, Bridge JA. (2003). Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, Aug;145(1):1-30.

Sangaletti S, Stoppacciaro A, Guiducci C, Torrisi MR, Colombo MP (2003). Leukocyte, rather than tumor-produced SPARC, determines stroma and collagen type IV deposition in mammary carcinoma. *The Journal of experimental medicine* **198**: 1475-1485.

Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K *et al* (2000). Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nature genetics* **24**: 391-395.

Savage SA, Woodson K, Walk E, Modi W, Liao J, Douglass C *et al* (2007). Analysis of genes critical for growth regulation identifies Insulin-like Growth Factor 2 Receptor variations with possible functional significance as risk factors for osteosarcoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **16**: 1667-1674.

Scartozzi M, Bianconi M, Maccaroni E, Giampieri R, Del Prete M, Berardi R *et al* (2011). State of the art and future perspectives for the use of insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) targeted treatment strategies in solid tumors. *Discovery medicine* **11**: 144-153.

Schaffer BS, Lin MF, Byrd JC, Park JH, MacDonald RG (2003). Opposing roles for the insulin-like growth factor (IGF)-II and mannose 6-phosphate (Man-6-P) binding activities of the IGF-II/Man-6-P receptor in the growth of prostate cancer cells. *Endocrinology* **144**: 955-966.

Scheel C, Schaefer KL, Jauch A, Keller M, Wai D, Brinkschmidt C, van Valen F, Boecker W, Dockhorn-Dworniczak B, Poremba C. (2001). Alternative lengthening of telomeres is associated with chromosomal instability in osteosarcomas. *Oncogene* **20(29)**:3835-44.

Schmidt K, Schinke T, Haberland M, Priemel M, Schilling AF, Mueldner C *et al* (2005). The high mobility group transcription factor Sox8 is a negative regulator of osteoblast differentiation. *The Journal of cell biology* **168**: 899-910.

Bibliografia

Schmitz-Peiffer C, Whitehead JP (2003). IRS-1 regulation in health and disease. *IUBMB life* **55**: 367-374.

Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL *et al* (2003). Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 7084-7092.

Schwartz AL, Ciechanover A (1999). The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annual review of medicine* **50**: 57-74.

Sciaccia L, Mineo R, Pandini G, Murabito A, Vigneri R, Belfiore A (2002). In IGF-I receptor-deficient leiomyosarcoma cells autocrine IGF-II induces cell invasion and protection from apoptosis via the insulin receptor isoform A. *Oncogene* **21**: 8240-8250.

Scotlandi K, Manara MC, Nicoletti G, Lollini PL, Lukas S, Benini S *et al* (2005). Antitumor activity of the insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 in musculoskeletal tumors. *Cancer research* **65**: 3868-3876.

Scotlandi K, Picci P (2008). Targeting insulin-like growth factor 1 receptor in sarcomas. *Current opinion in oncology* **20**: 419-427.

Seccareccia E, Brodt P (2012). The role of the insulin-like growth factor-I receptor in malignancy: an update. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* **22**: 193-199.

Shen YM, Yang XC, Yang C, Shen JK (2008). Enhanced therapeutic effects for human pancreatic cancer by application K-ras and IGF-IR antisense oligodeoxynucleotides. *World journal of gastroenterology : WJG* **14**: 5176-5185.

Shetty PJ, Movva S, Pasupuleti N, Vedicherlla B, Vattam KK, Venkatasubramanian S *et al* (2011). Regulation of IGF2 transcript and protein expression by altered methylation in breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* **137**: 339-345.

Shirakabe K, Terasawa K, Miyama K, Shibuya H, Nishida E (2001). Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **6**: 851-856.

Spentzos D, Cannistra SA, Grall F, Levine DA, Pillay K, Libermann TA *et al* (2007). IGF axis gene expression patterns are prognostic of survival in epithelial ovarian cancer. *Endocrine-related cancer* **14**: 781-790.

Bibliografia

Steele-Perkins G, Roth RA (1990). Monoclonal antibody alpha IR-3 inhibits the ability of insulin-like growth factor II to stimulate a signal from the type I receptor without inhibiting its binding. *Biochemical and biophysical research communications* **171**: 1244-1251.

Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M (1996). Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiological reviews* **76**: 593-629.

Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ *et al* (2011). Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* **144**: 27-40.

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA *et al* (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* **352**: 73-77.

Sun XJ, Goldberg JL, Qiao LY, Mitchell JJ (1999). Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway. *Diabetes* **48**: 1359-1364.

Swaney JJ (1973). Familial osteogenic sarcoma. *Clinical orthopaedics and related research*: 64-68.

Szuhai K, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PC, Bovée JV (2012). Molecular pathology and its diagnostic use in bone tumors. *Cancer Genet.* **205(5)**:193-204.

Takano A, Usui I, Haruta T, Kawahara J, Uno T, Iwata M *et al* (2001). Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin. *Molecular and cellular biology* **21**: 5050-5062.

Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC, He TC (2008). Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clinical orthopaedics and related research* **466**: 2114-2130.

Thirunavukkarasu K, Mahajan M, McLarren KW, Stifani S, Karsenty G (1998). Two domains unique to osteoblast-specific transcription factor Osf2/Cbfa1 contribute to its transactivation function and its inability to heterodimerize with Cbfbeta. *Molecular and cellular biology* **18**: 4197-4208.

Thomas D, Kansara M (2006). Epigenetic modifications in osteogenic differentiation and transformation. *Journal of cellular biochemistry* **98**: 757-769.

Bibliografia

Thomas DM, Carty SA, Piscopo DM, Lee JS, Wang WF, Forrester WC *et al* (2001). The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Molecular cell* **8**: 303-316.

Tintut Y, Parhami F, Le V, Karsenty G, Demer LL (1999). Inhibition of osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 by the cAMP pathway in osteoblastic cells. Ubiquitin/proteasome-dependent regulation. *The Journal of biological chemistry* **274**: 28875-28879.

Trojanek J, Ho T, Del Valle L, Nowicki M, Wang JY, Lassak A *et al* (2003). Role of the insulin-like growth factor I/insulin receptor substrate 1 axis in Rad51 trafficking and DNA repair by homologous recombination. *Molecular and cellular biology* **23**: 7510-7524.

Tsuchiya N, Wang L, Suzuki H, Segawa T, Fukuda H, Narita S *et al* (2006). Impact of IGF-I and CYP19 gene polymorphisms on the survival of patients with metastatic prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **24**: 1982-1989.

Turner BC, Zhang J, Gumbs AA, Maher MG, Kaplan L, Carter D *et al* (1998). Expression of AP-2 transcription factors in human breast cancer correlates with the regulation of multiple growth factor signalling pathways. *Cancer research* **58**: 5466-5472.

Valentinis B, Romano G, Peruzzi F, Morrione A, Prisco M, Soddu S *et al* (1999). Growth and differentiation signals by the insulin-like growth factor 1 receptor in hemopoietic cells are mediated through different pathways. *The Journal of biological chemistry* **274**: 12423-12430.

Valentinis B, Navarro M, Zanocco-Marani T, Edmonds P, McCormick J, Morrione A *et al* (2000). Insulin receptor substrate-1, p70S6K, and cell size in transformation and differentiation of hemopoietic cells. *The Journal of biological chemistry* **275**: 25451-25459.

Valentinis B, Baserga R (2001). IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Molecular pathology : MP* **54**: 133-137.

Van den Berg S, Rahmsdorf HJ, Herrlich P, Kaina B (1993). Overexpression of c-fos increases recombination frequency in human osteosarcoma cells. *Carcinogenesis* **14**: 925-928.

Wagner ER, Luther G, Zhu G, Luo Q, Shi Q, Kim SH *et al* (2011). Defective osteogenic differentiation in the development of osteosarcoma. *Sarcoma* **2011**: 325238.

Bibliografia

Walsh, S. (2003) IGF-I does not affect the proliferation or early osteogenic differentiation of human marrow stromal cells. *Bone* **33**, 80-89.

Wang J, Zhou J, Bondy CA (1999). Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**: 1985-1990.

Wang LL (2005). Biology of osteogenic sarcoma. *Cancer J* **11**: 294-305.

Wang X, Kua HY, Hu Y, Guo K, Zeng Q, Wu Q *et al* (2006). p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. *The Journal of cell biology* **172**: 115-125.

Werner H, Karnieli E, Rauscher FJ, LeRoith D (1996). Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 8318-8323.

Westendorf JJ (2006). Transcriptional co-repressors of Runx2. *Journal of cellular biochemistry* **98**: 54-64.

White MF (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **283**: E413-422.

Whitehead JP, Humphreys P, Krook A, Jackson R, Hayward A, Lewis H *et al* (1998). Molecular scanning of the insulin receptor substrate 1 gene in subjects with severe insulin resistance: detection and functional analysis of a naturally occurring mutation in a YMXM motif. *Diabetes* **47**: 837-839.

Wu X, Sallinen K, Anttila L, Makinen M, Luo C, Pollanen P *et al* (2000). Expression of insulin-receptor substrate-1 and -2 in ovaries from women with insulin resistance and from controls. *Fertility and sterility* **74**: 564-572.

Xiao G, Jiang D, Thomas P, Benson MD, Guan K, Karsenty G *et al* (2000). MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *The Journal of biological chemistry* **275**: 4453-4459.

Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T *et al* (2004). ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* **117**: 387-398.

Bibliografia

- Yi HK, Kim SY, Hwang PH, Kim CY, Yang DH, Oh Y *et al* (2005). Impact of PTEN on the expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in human gastric adenocarcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* **330**: 760-767.
- Yousfi M, Lasmoles F, Lomri A, Delannoy P, Marie PJ (2001). Increased bone formation and decreased osteocalcin expression induced by reduced Twist dosage in Saethre-Chotzen syndrome. *The Journal of clinical investigation* **107**: 1153-1161.
- Yu H, Berkel H (1999). Insulin-like growth factors and cancer. *The Journal of the Louisiana State Medical Society : official organ of the Louisiana State Medical Society* **151**: 218-223.
- Zha J, Lackner MR (2010). Targeting the insulin-like growth factor receptor-1R pathway for cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**: 2512-2517.
- Zhande R, Mitchell JJ, Wu J, Sun XJ (2002). Molecular mechanism of insulin-induced degradation of insulin receptor substrate 1. *Molecular and cellular biology* **22**: 1016-1026.
- Zhang Y, Song L, Cai L, Wei R, Hu H, Jin W (2013). Effects of baicalein on apoptosis, cell cycle arrest, migration and invasion of osteosarcoma cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **53**: 325-333.
- Zhao M, Qiao M, Harris SE, Oyajobi BO, Mundy GR, Chen D (2004). Smurf1 inhibits osteoblast differentiation and bone formation in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* **279**: 12854-12859.
- Zhou G, Zheng Q, Engin F, Munivez E, Chen Y, Sebald E *et al* (2006). Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 19004-19009.