

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
ONCOLOGIA E PATOLOGIA SPERIMENTALE**

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: 05/E1 – Settore Scientifico disciplinare: BIO/12

**Analisi di espressione di microRNA in tumore a cellule giganti: identificazione dei target con ruolo di potenziali biomarcatori.**

Presentata da: **Dott.ssa Irene Quattrini**

**Coordinatore Dottorato:**

**Chiar.mo Prof. Sandro Grilli**

**Relatore:**

**Chiar.mo Prof. Pietro Ruggieri**

**Esame finale anno 2014**

# Indice

	<b>Pagina</b>
<b>1 – Introduzione</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Tumore a Cellule Giganti</b>	<b>1</b>
1.1.1 Aspetti clinico-isto-patologici	1
1.1.2 Aspetti biologici-metabolici	6
1.1.3 Il circolo vizioso	12
<b>1.2 I MicroRNAs</b>	<b>16</b>
1.2.1 Identificazione e classificazione	16
1.2.2 Biogenesi ed attività dei microRNAs	18
1.2.3 MicroRNAs e cancro	19
<b>2 - Scopo della tesi</b>	<b>23</b>
<b>3 - Materiali e metodi</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Fase 1</b>	<b>25</b>
3.1.1 Casistica	25
3.1.2 Estrazione RNA	28
3.1.3 Analisi dell'espressione dei miRNA mediante microarray	29
3.1.4 Retrotrascrizione e RealTime PCR: validazione dell'espressione del miR-136	30
3.1.5 La validazione del metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$	32
3.1.6 Predizione bioinformatica dei geni target del miR-136	32
3.1.7 Retrotrascrizione e RealTime PCR: validazione dell'espressione dei geni target del miR-136	33
<b>3.2 Fase 2</b>	<b>35</b>
3.2.1 Estrazione proteica e Western Blot	35
3.2.2 Immunoistochimica su TMA	36
3.2.3 Analisi statistica	43
<b>4 – Risultati</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Fase 1</b>	<b>44</b>
4.1.1 Analisi dei livelli di espressione di miRNA mediante RealTime PCR	44
4.1.2 Predizione dei target del miR-136 mediante analisi bioinformatica	46

4.1.3	Espressione dei geni target mediante RealTime PCR	46
4.1.4	Analisi dell'espressione delle proteine target	49
<b>4.2</b>	<b>Fase 2</b>	<b>49</b>
4.2.1	Analisi di popolazione	49
4.2.2	Analisi di immunistochemica su TMA	51
<b>5</b>	<b>– Discussione</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>– Bibliografia</b>	<b>73</b>

# **1 - Introduzione**

## **1.1 Tumore a Cellule Giganti**

### **1.1.1 Aspetti clinico-isto-patologici**

Fra le tante neoplasie che possono colpire il complesso apparato scheletrico umano si trova il Tumore a Cellule Giganti, TCG, una neoplasia che nel 90% dei casi colpisce le ossa lunghe. Il TCG rappresenta circa il 5% di tutti i tumori ossei e il 20% di tutti i tumori di natura benigna. La sua incidenza è di circa 1/milione/anno.

Un tempo la denominazione tumore a cellule giganti si riferiva a diverse forme tumorali e non tumorali tra cui la cisti aneurismatica, il fibroma istiocitico ed il condroblastoma. Fino alla presentazione del lavoro di Jaffe [1] era comune la tendenza a dare un'eccessiva importanza alla presenza di cellule giganti in varie neoplasie, per questa ragione ogni tumore in cui si osservava la loro presenza veniva classificato come un tumore a cellule giganti, dando scarsa importanza alle cellule circostanti ed ai loro stadi di differenziazione; quest'ovvia confusione si ripercuoteva inevitabilmente sulla diagnosi e sulla terapia.

Jaffe, Lichtenstein e Portis furono i primi a svalutare l'importanza della presenza delle cellule giganti in tutte queste lesioni, mettendo invece in rilievo le caratteristiche citologiche delle cellule circostanti [1]. Solo con i lavori di Jaffe, Schajowicz e Aegerter si cominciò a considerare le cellule giganti come l'aspetto meno importante nell'organizzazione del tumore; ma non va ignorato il fatto che nessuno degli autori prese mai una decisa posizione riguardo la possibile origine delle cellule giganti.

Oggi per TCG si intende una neoplasia centrale dell'osso, probabilmente originata da istiociti o fibroblasti e costituita da cellule fondamentali mononucleate frammiste a cellule giganti polinucleate.

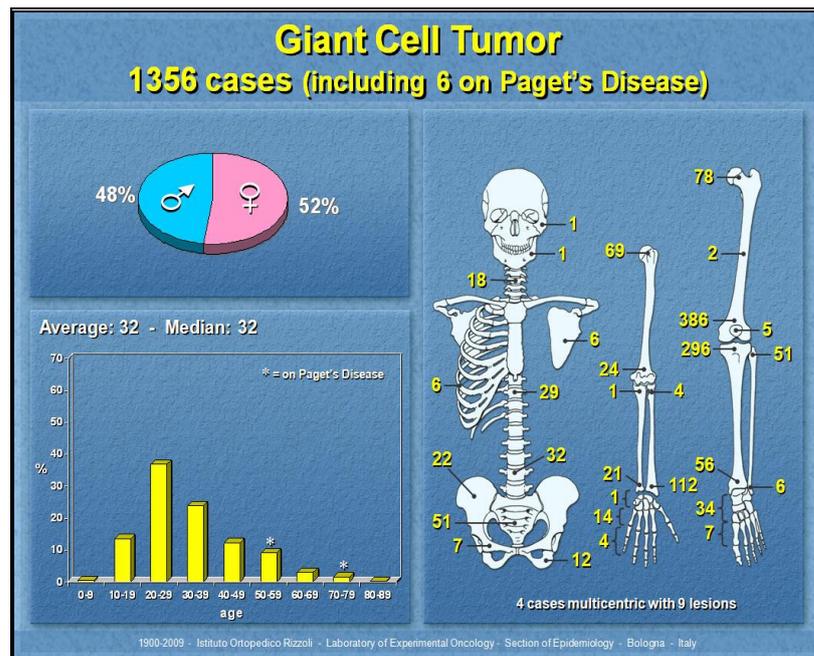
Come accennato in precedenza, altre forme tumorali possono presentare questo tipo di cellule giganti, ma solo con ruoli marginali, forse deputate al

riassorbimento di stravasi ematici, depositi calcarei, sostanza ossea o cartilaginea: invece nel TCG ne costituiscono l'elemento fondamentale [2].

Questa neoplasia presenta caratteristiche cliniche, radiografiche e istologiche particolari. Per esempio è largamente considerata una forma benigna tuttavia può manifestare caratteri di aggressività biologica dando origine a recidive locali nel 10-25% dei casi, e nel 1-4% dei casi noti metastatizza a livello polmonare.

Nel 1983 Enneking, sulla base delle caratteristiche clinico-radiologiche, classificò i TCG in stadio 1 (latente o inattivo), stadio 2 (attivo) e stadio 3 (aggressivo) [3].

Il sesso non sembra essere una variabile incidente nello sviluppo di questa neoplasia poiché c'è solo una lieve prevalenza nel sesso femminile (52% contro 48% dei maschi) (Figura 1).



**Figura 1** - Casistica degli Istituti Ortopedici Rizzoli di Tumore a Cellule Giganti. I casi sono classificati in base a sesso, età e sede della lesione.

Il TCG insorge più frequentemente nei giovani adulti (circa l'80% dei casi fra i 15 ed i 30 anni); mentre sono infrequenti casi prima della pubertà (cioè prima che siano chiuse le cartilagini di coniugazione).

Per quanto riguarda la localizzazione non si può ignorare che il 90% dei casi colpisca le ossa lunghe e precisamente le porzioni meta-epifisarie. Nell'adulto, dove non c'è più la cartilagine di coniugazione, epifisi e metafisi non sono più separate a sufficienza per prevenire la propagazione del tumore, il quale tende a coinvolgerle entrambe.

L'impressione generale è che il tumore si formi nella metafisi e poi si diffonda. Si può affermare questo perché esistono casi con localizzazione puramente metafisaria mentre non è mai stato riscontrato un caso di TCG localizzato esclusivamente all'epifisi.

Le due meta-epifisi di gran lunga preferite dal tumore sono quella distale del femore e quella prossimale della tibia, confermando così che oltre la metà di tutti i TCG si trovano nel ginocchio. Seguono nell'ordine di elencazione l'estremità distale del radio, la prossimale del femore, la distale della tibia e la prossimale dell'omero [2].

A parte le ossa lunghe, non è raro incontrare il TCG nel sacro e nel bacino; è invece rarissimo nelle restanti ossa. Eccezionalmente può presentarsi come lesione multicentrica.

I markers clinici fondamentali dei TCG sono l'età del paziente, la sede del tumore, la durata dei sintomi e i segni eventuali di espansione nella corticale e nelle parti molli. Il sintomo principale è il dolore; la frequente vicinanza del tumore al cavo articolare, da cui è separato solo dallo strato cartilagineo, comporta quasi sempre una forte limitazione della funzione articolare. Nelle ossa superficiali di piccolo diametro, il possibile rigonfiamento indotto dal tumore provoca spesso una tumefazione visibile. Il possibile assottigliamento della corticale rende poi facili microfratture e fratture patologiche. Nel caso che il tumore abbia passato la corticale espandendosi nei tessuti molli, risulta evidente una tumefazione elastica vascolarizzata (edema peritumorale). Tuttavia non è stato ancora possibile definire un risolutivo elemento prognostico in relazione al decorso clinico della malattia [4,5]. Anche il sistema di classificazione non è universalmente accettato.

Ai raggi X è visibile con margini abbastanza definiti, ma non così chiaramente come in altri tumori benigni, probabilmente anche in relazione allo stadio del

tumore. L'immagine radiografica è caratterizzata da un'intensa osteolisi associata ad un progressivo aumento dell'aggressività biologica [6].

Attraverso la TAC si rileva la solidità della massa tumorale. Con la risonanza magnetica nucleare si registra un segnale non omogeneo, basso in T1 ed alto in T2. La scintigrafia ossea è utile per evidenziare eventuali lesioni metastatiche prima che diventino evidenti ai raggi X.

Per quanto riguarda l'aspetto macroscopico, il tumore non alterato, è compatto, friabile, di colore bruno rossastro o bruno chiaro, uniformemente parenchimoso e molle. Non vi è traccia di calcificazioni all'interno del tumore; generalmente il tessuto può essere percorso da venature biancastre (espressione di fibrosi cicatriziale secondaria a fenomeni regressivi delle cellule tumorali) o presentare delle aree giallastre (dovute ad accumulo lipidico) o rossastre (zone emorragiche). In altre aree il tumore può presentare segni di necrosi [2].

Per quanto riguarda l'aspetto istologico, nella sezione possiamo identificare una fitta popolazione di cellule mononucleate di media grandezza, rotondeggianti o fusate, ed un gran numero di cellule giganti polinucleate simili ad osteoclasti (anche 50-100 nuclei raccolti al centro) con ampie porzioni citoplasmatiche talora vacuolate. Questi nuclei non differiscono morfologicamente da quelli delle cellule mononucleate. Non sono rare fibre reticolari e collagene, presenti in percentuali diverse a seconda dei casi.

I vasi sanguigni sono numerosi, spesso in forma di ampi sinusoidi [7]. Come conseguenza di eventi emorragici sono reperibili anche cristalli di emosiderina e accumuli di cellule schiumose [2].

Goldring et al. ottennero risultati significativi in seguito allo studio di colture cellulari di TCG identificando le diverse popolazioni cellulari che costituiscono questo tipo di neoplasia [8]. Il primo importante risultato ottenuto da Goldring et al. riguarda le cellule giganti che hanno la tendenza a scomparire dalla coltura: anche arricchendo il terreno non si riesce ad aumentarne la sopravvivenza. Questo fatto induce a considerare le cellule giganti come elemento non propriamente neoplastico.

Burmester et al. sono del parere che le cellule polinucleate derivino da una delle due popolazioni di cellule mononucleate presenti nel tumore,

precisamente da quelle di forma rotondeggiante [9]. Queste ultime, che come le cellule giganti tendono a scomparire dalla coltura, presentano caratteristiche morfologiche e antigeniche (esprimono l'antigene CD68) [10,11] proprie della famiglia dei monociti-macrofagi, sono infatti reattive ad uno specifico anticorpo per gli antigeni della serie monocitica. Le cellule giganti, pur non dando reattività all'anticorpo, come d'altra parte molti macrofagi presenti nei vari tessuti dell'organismo, hanno nel loro citoplasma enzimi comuni alla maggior parte dei macrofagi stessi (fosfatasi acida, beta-glucoronidasi) [12]. Quindi queste cellule monocita-simili possono essere considerate come le potenziali progenitrici delle cellule giganti.

Goldring et al., rivelando la presenza sulle cellule giganti di recettori per l'ormone calcitonina, considerato un marker tipico per l'identificazione degli osteoclasti, hanno dimostrato un'altra possibile origine e ruolo di queste cellule nel tumore [8].

L'origine degli osteoclasti stessi è a sua volta oggetto di discussione. Infatti mentre Burger et al. sostengono che la fusione di più macrofagi sia alla base della loro formazione [13], Horton et al. sono certi che esse derivino da una stirpe di cellule ematopoietiche fondamentali diverse da quelle progenitrici delle cellule convenzionali del sangue come i macrofagi [14]. Secondo l'autore i macrofagi e gli osteoclasti, pur avendo caratteristiche morfologiche e citochimiche in comune, quali l'attività di fagocitare e la tendenza a fondersi per formare dei policarionti, presentano differenze fondamentali [15]. Infatti gli osteoclasti oltre a non avere alcuni antigeni propri dei macrofagi [15], sono capaci di riassorbire l'osso [16] e sono suscettibili a ormoni che inibiscono il riassorbimento dell'osso quali la calcitonina, tutti aspetti mai riscontrati nei macrofagi [16-21].

Per quanto riguarda la seconda popolazione di cellule mononucleate presenti nei TCG, esse sono di forma fusata ed hanno aspetto morfologico simile ai fibroblasti; è importantissimo sottolineare il fatto che queste cellule sono le uniche a proliferare a lungo in coltura e perciò si pensa che probabilmente rappresentino l'elemento neoplastico del TCG. La morfologia fibroblastica e l'assenza di antigeni specifici dei monociti-macrofagi suggerisce che queste cellule siano cellule stromali del tessuto connettivo.

Sembra quindi ormai assodato il ruolo non neoplastico delle cellule giganti: il loro compito potrebbe essere esclusivamente quello di creare lo spazio necessario all'espansione tumorale. Meno chiara è invece la loro origine che costituisce ancora materia di studio.

Il decorso della malattia TCG non è prevedibile: se il paziente non viene sottoposto a trattamento, nella maggioranza dei casi il tumore impiega tra i due e i sei mesi per raddoppiare la sua massa. Eccezionalmente la massa tumorale può arrestare la sua crescita e andare in contro a necrosi o fibrosi [22,23]. La classificazione istologica non ha valore ai fini prognostici e la possibilità di recidive locali dipende sia dalla prognosi che dal tipo di trattamento effettuato sul paziente. La casistica è rappresentata per il 10% da tumori allo stadio 1, per il 60 % allo stadio 2 e per il restante 30% allo stadio 3. Circa il 2-3% dei casi sono metastatici; le trasformazioni verso il fenotipo maligno sono spontanee nell'1% dei pazienti ed indotte da radiazioni nel 5-15%.

La rarità del tumore costituisce un limite intrinseco al fine della costituzione di una statistica valida.

Il trattamento è essenzialmente chirurgico e prevede l'asportazione della massa tumorale e di un margine di tessuto sano circostante. La percentuale di recidiva è del 10-15% in caso di somministrazione di terapia adiuvante e del 15-20% senza terapia adiuvante.

Per lesioni di stadio 3, con una massiva distruzione dell'osso e diffuse fratture patologiche, è necessaria l'amputazione dell'arto. La radioterapia è utilizzata come adiuvante post-chirurgico in caso di localizzazioni difficoltose del tumore. Recentemente alcune linee di ricerca, basandosi sulle caratteristiche osteoclastiche delle cellule giganti, utilizzano i bifosfonati inibendo così l'osteolisi indotta dal tumore [24,25].

### **1.1.2 Aspetti biologici-metabolici**

L'osso è un tessuto metabolicamente molto attivo, soggetto a continui processi di formazione e riassorbimento; le popolazioni cellulari maggiormente rappresentative di tale processo sono osteoblasti ed osteoclasti.

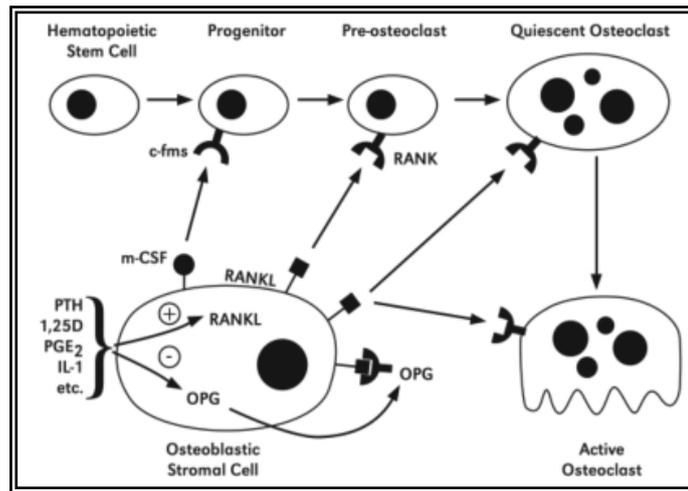
Gli osteoblasti sono cellule ad attività secernente e producono le componenti organiche della matrice ossea [26]; originano da precursori stromali che si trovano nel midollo ed il loro sviluppo si verifica sotto l'influsso di numerosi fattori tra i quali i principali sono rappresentati dal paratormone (PTH), dal Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), dall'1,25 (OH) $_2$ D $_3$ , da prostaglandine (PGE $_2$ ) e da estrogeni [27].

Gli osteoclasti sono cellule di grandi dimensioni, plurinucleate (sino ad un centinaio di nuclei) e sono deputate al riassorbimento osseo; originano da precursori midollari della serie monocito-macrofagica [26].

I fattori osteotropici come Interleuchina-1 (IL-1), IL-11, prostaglandina E $_2$  e 1,25-(OH) $_2$ D $_3$  promuovono la formazione degli osteoclasti legandosi alle cellule stromali del midollo osseo che aumentano l'espressione del ligando per il recettore attivatore del fattore nucleare kB RANKL (Receptor Activator for Nuclear Factor kB Ligand). RANKL si lega al suo recettore RANK presente sulla superficie degli osteoclasti maturi e dei loro precursori inducendo la formazione e l'attivazione degli osteoclasti stessi.

L'attività di RANKL può essere inibita dall'osteoprotegerina (OPG) [28] che viene prodotta da numerose popolazioni cellulari come le cellule stromali del midollo osseo e gli osteoblasti, il suo ruolo è quello di bloccare la differenziazione degli osteoclasti a partire dai loro precursori e di inibire la loro proliferazione legandosi a RANKL occupando così il sito di legame per RANK ed inibendo in tal modo il riassorbimento osseo [29]. Le normali cellule stromali mantengono stabile il rapporto RANKL/OPG che risulta essere indispensabile per il fisiologico rimodellamento osseo.

Anche il PTH stimola l'osteoclastogenesi in maniera indiretta, agendo cioè sugli osteoblasti che oltre a RANKL secernono una citochina, il fattore stimolante le colonie dei macrofagi il Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), il quale interagisce con i macrofagi inducendoli a differenziarsi in osteoclasti (Figura 2).



**Figura 2** - Meccanismo d'azione RANK-RANKL-OPG. Immagine tratta da “The Basics of Bone in Health and Disease”.

È stato riscontrato che cellule stromali presenti in pazienti affetti da TCG overesprimono RANKL alterando il normale rapporto tra RANKL/OPG aumentando quindi il riassorbimento osseo, questo meccanismo noto anche come “circolo vizioso” spiega la marcata osteolisi tipica di questa neoplasia [30], ma costituisce anche il bersaglio di nuove terapie che limitano l'azione di RANKL e quindi la degradazione ossea.

Recenti studi di citogenetica hanno evidenziato l'amplificazione della regione cromosomica 20q11.1 nella popolazione di cellule mononucleate [31] proponendo il gene TPX2 come possibile marcatore prognostico. In precedenza altri studi avevano messo in luce traslocazioni telomeriche, in particolare tra i telomeri dei cromosomi 11, 19 e 20 tali da causare forte instabilità genetica [32-34].

La sovraespressione dei protooncogeni c-jun [35] e c-myc ha suggerito un loro possibile ruolo nella comparsa del tumore, c-myc inoltre risulta essere differenzialmente espresso in relazione alla gravità della prognosi [36]; sembra quindi essere a tutt'oggi il primo reale marcatore prognostico del TCG.

Osteoblasti ed osteoclasti prendono numerosi rapporti con la matrice extracellulare (ECM) che garantisce il normale sviluppo ed il mantenimento dell'architettura e della funzione dei tessuti ed è di fondamentale importanza la capacità delle cellule di riconoscere ed interagire con la ECM. Questa è coinvolta in numerosi fenomeni tra cui l'adesione cellulare, la migrazione, la

proliferazione e l'espressione genica [37,38]. La matrice extracellulare è costituita da una componente fibrillare che genera resistenza alla trazione e dalla sostanza fondamentale, un materiale amorfo (gel) costituito da complessi di proteine quali GAGs e proteoglicani (PG) in grado di trattenere acqua e di conferire resistenza alla pressione (Figura 3).

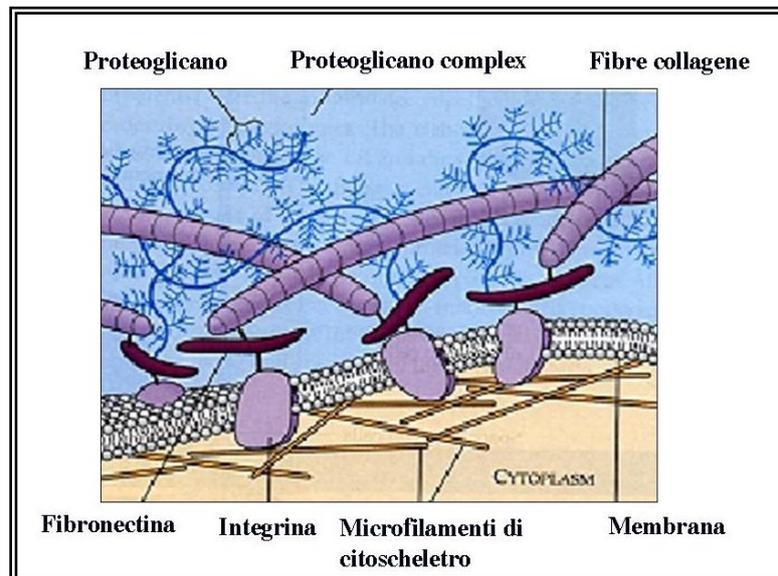


Figura 3- Struttura della matrice extracellulare.

La componente fibrillare è principalmente costituita da fibre collagene, fibre elastiche e fibronectina che è una delle molecole responsabili del collegamento tra ECM e superficie cellulare in quanto possiede siti di attacco per il collagene, per i glicosaminoglicani (GAGs) e per le integrine, glicoproteine di membrana, permettendo così di far aderire le cellule alla ECM. L'ECM è quindi una struttura altamente dinamica e la sua integrità è fondamentale.

Uno degli step iniziali dell'evento metastatico è l'invasione della ECM, un processo attivo che vede il distacco delle cellule tumorali dalla sede primaria, la loro adesione ai componenti dell'ECM e la migrazione delle cellule neoplastiche; in un individuo sano sono presenti diverse molecole che mantengono adese le cellule tra loro, una sottoregolazione di tali fattori riduce l'adesione cellulare facilitando il distacco delle cellule tumorali che si spingono nei tessuti circostanti legandosi a componenti della ECM come la laminina e la

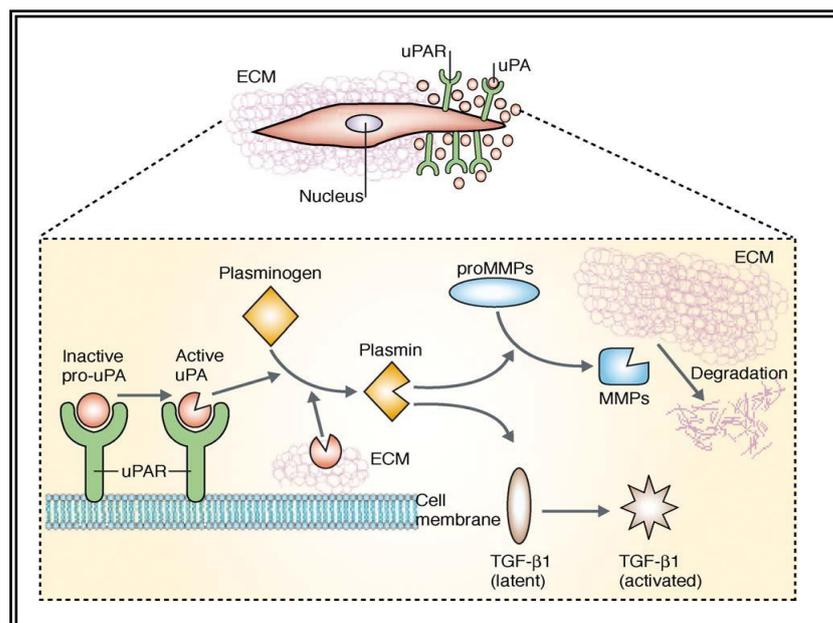
fibronectina. Dopo l'attacco le cellule tumorali secernono enzimi proteolitici, tra cui una notevole quantità di metalloproteasi (MMPs), che favoriscono la degradazione della membrana basale [39], permettendo così la migrazione delle cellule neoplastiche.

Le MMPs sono una famiglia di enzimi prevalentemente prodotti da cellule del tessuto connettivo, secreti come zimogeni nella matrice extracellulare; sono endopeptidasi multidominio zinco e calcio dipendenti che operano una specifica attività proteolitica su gran parte dei costituenti della matrice extracellulare. Recenti studi hanno evidenziato l'aumento di espressione di MMP-2 e MMP-9 in pazienti affetti da sarcoma [40], è stato inoltre rilevato che il loro aumento è correlato alla progressione di numerose neoplasie come il tumore colon rettale ed il tumore allo stomaco [41].

Sono state riscontrate alterazioni a livello del sistema dell'attivatore urochinasico del plasminogeno, il quale include u-PA (urokinase Plasminogen Activator), il suo recettore u-PAR (urokinase Plasminogen Activator Receptor) ed il suo inibitore PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1) [42]. Il sistema uPA è coinvolto in un ampio spettro di processi biologici quali fibrinolisi, infiammazione, formazione della placca aterosclerotica, rimodellamento della matrice durante la cicatrizzazione delle ferite, invasione tumorale, angiogenesi e metastasi [43].

Il legame dello zimogeno pro-uPA al suo recettore uPAR sull'estremità in avanzamento delle cellule in migrazione e la conseguente attivazione di uPA provoca l'inizio di una cascata proteolitica che determina la conversione del plasminogeno in plasmina (Figura 4). La plasmina è dotata di attività proteolitica ed è quindi in grado di degradare un'ampia serie di componenti della membrana basale extracellulare come fibrina e fibronectina, attivare fattori di crescita latenti come TGF- $\beta$  ed altri enzimi tra cui le MMPs [44].

Numerosi dati ricavati da sistemi modello, suggeriscono che il sistema uPA giochi un ruolo chiave nell'invasione tumorale e nel processo metastatico [45]. In precedenza si credeva che uPA mediasse semplicemente la disseminazione tumorale, catalizzando la degradazione della matrice extracellulare e permettendo alle cellule tumorali di invadere localmente e di disseminarsi a distanza.



**Figura 4-** Modello del funzionamento del sistema uPA (tratto da Duffy MJ, Duggan C, *Cinical Biochemistry*. 2004, 37: 541-548).

Dati recenti suggeriscono invece che il sistema uPA giochi un ruolo più ampio nel cancro e che sia coinvolto in stadi multipli nella formazione e nella progressione della malattia. Ad esempio è stato dimostrato che uPA può stimolare la proliferazione e la migrazione cellulare e modularne l'adesione. Il sistema uPA assume quindi un ruolo critico nella progressione tumorale e ci si può ragionevolmente aspettare che i livelli di espressione dei suoi componenti possano correlare con il potenziale metastatico e quindi con il tipo di prognosi. Coerentemente con il loro coinvolgimento nella progressione tumorale, uPA, uPAR e PAI-1 sono spesso overespressi in molte tipologie di neoplasia quali il tumore al seno [46,47], polmone [48], rene [49], utero ed endometrio [50-52] e tratto gastrointestinale [53]. In tutti questi casi un marcato aumento dei livelli di uPA e uPAR sopra la norma è associato a prognosi sfavorevole e fenotipo maligno.

### 1.1.3 Il Circolo Vizioso

RANK, RANKL ed OPG sono i maggiori coordinatori del meccanismo alla base dell'osteoclastogenesi e sono tutti membri della super famiglia Tumor Necrosis Factor (TNF) [54].

RANK è una proteina recettoriale transmembrana che viene codificata da un gene che si trova sul cromosoma 18; è presente sulla superficie dei precursori degli osteoclasti e sugli osteoclasti maturi. Viene espresso in differenti tessuti ed organi (osso, midollo osseo, milza, muscolo scheletrico, cervello, cuore, fegato, polmone, ghiandola mammaria, cute); in particolare, nel tessuto osseo, l'attivazione di RANK è fondamentale nel processo di differenziazione degli osteoclasti. L'attivazione di RANK è iniziata dal legame con il suo ligando, RANKL: l'attivazione trasmette il segnale tramite il secondo messaggero TNF Receptor Associated Factor 6 (TRAF6) [55], che provoca l'attivazione del sistema nuclear factor (NF)- $\kappa$ B; questo, traslocando nel nucleo promuove la trascrizione dei geni fondamentali nei processi di proliferazione e di differenziazione degli osteoclasti [56].

RANKL è una proteina codificata da un gene che si trova sul cromosoma 13; è un potente fattore osteoclastogenico che, in presenza di M-CSF, induce la formazione e l'attivazione degli osteoclasti [57]. Viene prodotto da diversi istotipi, osteoblasti, osteociti, cellule stromali del midollo osseo e da cellule T attivate. Da diversi studi inoltre emerge che le cellule tumorali sono in grado di produrre RANKL.

Alcuni autori suggeriscono sia una proteina transmembrana, altri che si trovi ancorata alla superficie esterna della membrana cellulare. La tesi più accreditata vede che ci siano 3 diverse forme di tale proteina, 2 forme clivate in modo diverso con localizzazione transmembrana, ed una clivata che diviene solubile (sRANKL) [58].

RANKL non partecipa solo all'osteoclastogenesi ma è anche un fattore di sopravvivenza per le cellule dendritiche [59] ed è coinvolta, forse come promuovente, nella risposta immunitaria delle cellule T [60], la cui attivazione induce l'espressione del gene per RANKL e va ad incrementare quindi l'osteoclastogenesi e la conseguente osteolisi.

La forma solubile di RANKL è quella biologicamente più attiva ed è possibile dosarla nel siero. Vi sono studi a favore della teoria che tale forma solubile derivi dal clivaggio della forma transmembrana ad opera di metallo proteinasi (MMP), in particolare MMP-14, MMP-7 e A-Disintegrin-And-Metalloproteinase (ADAM) [61-63]. Non è ancora del tutto chiaro quale sia la forma che promuove realmente il riassorbimento osseo, autori sostengono sia quella solubile, autori sostengono che entrambi siano attive [58]. Diversi studi hanno dimostrato che le cellule T attivate e le cellule mononucleate di forma fusata simile a fibroblasti, che costituiscono il pattern tumorale del TCG, sono in grado di secernere sRANKL [64].

OPG è un decoy receptor, un recettore esca, codificato da un gene sul cromosoma 8. E' una proteina solubile secreta dagli osteoblasti e cellule stromali del midollo osseo che si lega a RANKL impedendone il legame a RANK.

L'espressione di OPG è contrapposta a quella di RANKL, quindi il suo aumento determina un'inibizione dell'osteoclastogenesi. La sua produzione è favorita da diversi fattori come estrogeni, calcitonina, Platelet-derived growth factor (PDGF) e  $Ca^{2+}$  [65].

In condizioni fisiologiche i livelli di RANKL e di OPG circolanti sono piuttosto compensati e garantiscono un meccanismo ottimale di deposizione e riassorbimento. In ambito tumorale vari fattori intervengono a creare uno squilibrio, ed in particolare nel TCG si verifica una massiva osteolisi che viene spiegata dal meccanismo che prende il nome di circolo vizioso e che vede l'attiva partecipazione di osteoblasti, osteoclasti e cellule tumorali.

Le cellule tumorali producono fattori solubili come il PTH, il Peptide correlato al Paratormone (PTHrP), citochine come IL-1 $\alpha$  e IL-6, prostaglandina E2, vitamina D3 e fattori di crescita che stimolano la produzione di RANKL da parte degli osteoblasti maturi e dai loro precursori. Molti autori avanzano l'ipotesi che le cellule tumorali stesse siano in grado di produrre RANKL [64]. RANKL solubile e/o legato, si lega al suo recettore RANK, sulla superficie degli osteoclasti, attivando diversi fattori e vie di trasduzione che innescano una serie di risposte che portano all'attivazione degli osteoclasti ed alla loro attività erosiva.

Il primo fattore che viene ad essere attivato è la proteina TRAF6 [55] la quale a sua volta è in grado di indurre l'attivazione di diversi pathways e fattori come c-src che è in grado di attivare gli osteoclasti ed inibire gli osteoblasti.

TRAF6 è inoltre in grado di attivare la Fosfolipasi C (PLC) che mediante i secondi messaggeri Inositolo 3 fosfato (IP3) e Diacilglicerolo (DAG), determina il rilascio di ioni  $Ca^{2+}$  dai depositi intracellulari stimolando così l'attivazione di fattori di trascrizione che promuovono le tappe finali dell'osteoclastogenesi; uno dei geni la cui trascrizione viene attivata è il gene nFATc1, un potente fattore di trascrizione che promuove le tappe finali dell'osteoclastogenesi [66].

Un importante fattore di crescita che viene attivato è il Nuclear Factor-KappaB (NFkB) [67], che si libera dal suo repressore IKB e dal citoplasma migra nel nucleo dove induce la trascrizione di molteplici geni in grado di inibire l'apoptosi degli osteoclasti promuovendone la loro sopravvivenza, è in grado inoltre di stimolare la differenziazione dei precursori degli osteoclasti ad osteoclasti maturi e l'attivazione di quelli maturi.

Il legame di RANKL a RANK vede anche l'attivazione della via della Mitogen-activated protein kinases (MAPK) che fosforila c-fos attivandolo e quindi dando il via alla trascrizione di geni che favoriscono la replicazione degli osteoclasti [68].

Gli osteoblasti secernono IL-6 che oltre ad essere un fattore pro-angiogenico, in grado quindi di aumentare il potenziale aggressivo del TCG, riesce ad attivare NFkB in maniera del tutto indipendente da RANK e RANKL. Alti livelli di IL-6 sono stati riscontrati anche in pazienti con metastasi ossee [69].

L'attivazione di questi segnali vede quindi un drammatico aumento degli osteoclasti che erodono massivamente il tessuto osseo determinando anche il rilascio di vari fattori dalla matrice ossea in grado anch'essi di attivare e potenziare il reclutamento e l'attivazione degli osteoclasti e l'osteolisi con una sorta di meccanismo a feed back positivo. Tra questi fattori si trova il TGF- $\beta$  [70] che partecipa alla differenziazione dei precursori degli osteoblasti ad osteoblasti maturi che si traduce in maggiori quantitativi di RANKL prodotto.

Altri fattori di crescita liberati dall'azione osteolitica sono le Bone Morphogenetic Proteins (BMP) che con i loro recettori BMPR, tutti

appartenenti alla famiglia del TGF- $\beta$ , partecipano alla differenziazione degli osteoclasti con un meccanismo sinergico a RANKL. L'azione di BMP, detta anche sialoproteina 2, unita a quella di RANKL aumenta quindi la sopravvivenza degli osteoclasti e determina la riduzione dell'attività apoptotica nei confronti degli osteoclasti stessi attivando il pathway di AKT [71].

La matrice ossea inoltre è ricca di Insuline-Like Growth Factor (IGF) che, rilasciato nell'ambiente extracellulare, può agire sulle cellule tumorali inducendone la proliferazione e inibendone l'apoptosi. E' noto inoltre che lo stesso fattore viene secreto dalle cellule tumorali che, in tal modo, auto sostengono la loro proliferazione [72].

Inoltre nel caso del TCG è stato visto che le cellule stromali producono diversi fattori in grado di aiutare gli osteoclasti a maturare e attivarsi, tra questi fattori si trova il TNF- $\alpha$ , una citochina che determina una sovra-produzione di RANKL e quindi un potenziamento del meccanismo osteolitico ed inoltre recluta cellule del sistema immunitario quali le cellule T che aumentano la produzione di RANKL e sRANKL.

Inoltre il TNF- $\alpha$  attivando le cellule immunitarie determina un aumento della produzione di IL-6 [73] che a sua volta aumenta la proliferazione delle cellule stromali e ne bloccano l'apoptosi, ed in particolare l'IL-6 sembra anche un potente stimolo pro-angiogenico.

In conclusione da una parte le cellule neoplastiche rilasciano fattori che stimolano l'assorbimento osseo, dall'altra la degradazione della matrice ossea determina il rilascio di molecole e fattori di crescita che promuovono la proliferazione delle cellule tumorali. Si instaura così il circolo vizioso (Figura 5) in cui alla progressione dell'osteolisi corrisponde l'aumento del numero delle cellule che la determinano [74,75].

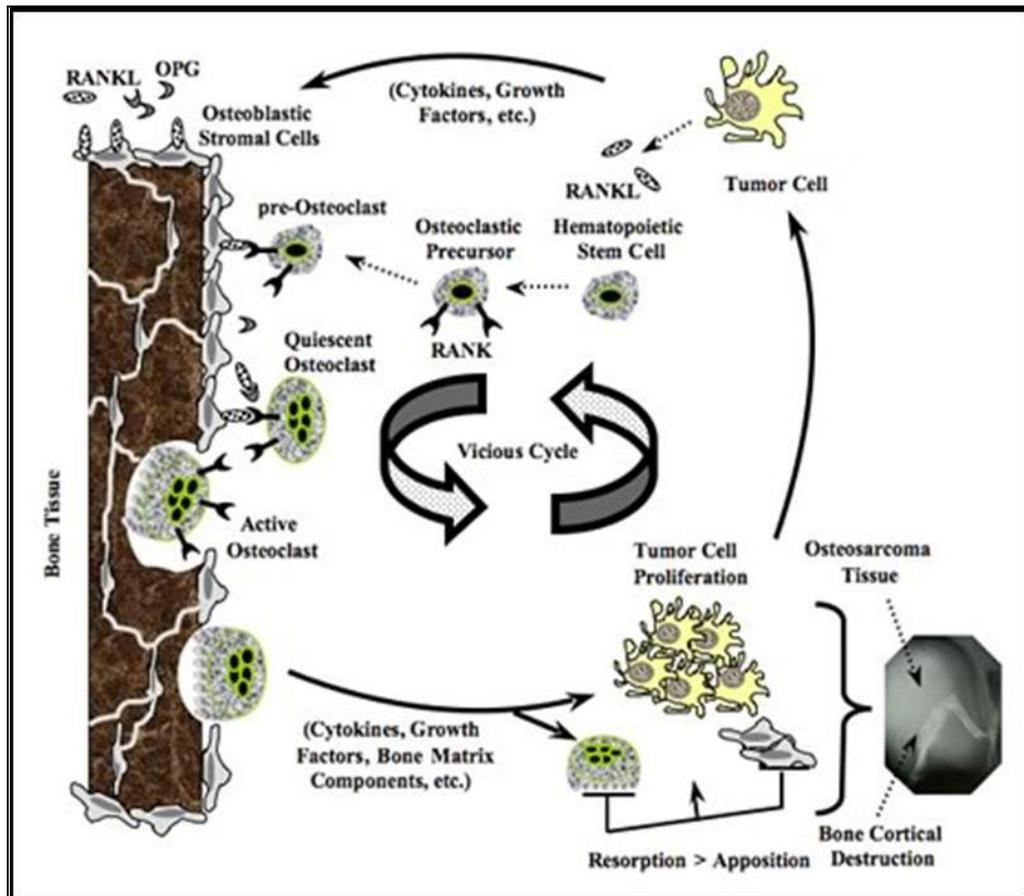


Figura 5 – Circolo vizioso. Immagine tratta da “ RANK/RANKL/OPG: new therapeutic targets in bone tumors and associated osteolysis”.

## 1.2 - I microRNAs

### 1.2.1 – Identificazione e classificazione

Nel 1981, durante uno studio loss-of function in *C.Elegans*, fu scoperto che le mutazioni del gene *lin-4* comportavano una sintesi continua della cuticola della larva quindi, insieme ai geni *lin-14*, *lin29* e *lin-28*, *lin-4* fu classificato un gene capace di controllare temporalmente gli eventi dello sviluppo post-embrionale dell'animale.

Ruvkun e collaboratori trovarono che le delezioni nella regione 3'-UTR dell'mRNA di *lin-14* portavano ad un anormale accumulo della proteina negli stati larvali tardivi, suggerendo l'esistenza di un elemento regolatore nella regione 3'-UTR di *lin-14* [76]. Dato che *lin-4* provocava una bassa espressione

della proteina di lin-14, gli autori ipotizzarono che il prodotto del gene lin-4 poteva agire come fattore trans-agente legandosi alla regione 3'-UTR di lin-14 provocandone l'inibizione.

Più tardi, due studi indipendenti confermarono che lin-4 non codificava per una proteina bensì per due piccoli trascritti di circa 22-61 nucleotidi contenenti sequenze complementari alla regione 3'-UTR del trascritto di lin-14. In questo modo lin-4 controllava temporalmente la traduzione di lin-14 attraverso un'interazione post-trascrizionale RNA:RNA antisenso. Diversi anni dopo fu identificato, sempre in *C.Elegans*, anche il gene let-7 che agisce con lo stesso meccanismo di lin-4, andando a regolare target diversi. Infine tre gruppi di ricerca differenti isolarono molti small-RNAs con le stesse caratteristiche di lin4 e let-7, in sistemi cellulari ed in organismi diversi compreso l'uomo, portando così alla luce l'esistenza di una grande classe di small-RNAs con un potenziale ruolo di regolatori, che a causa delle loro piccole dimensioni furono chiamati microRNAs (miRNAs) [77].

I miRNAs fanno parte di una categoria più ampia di small-RNAs chiamata noncoding RNA (ncRNA), composta anche da siRNA, tncRNA, e snRNA, tutte molecole di RNA che non codificano per delle proteine poiché vengono trascritte da regioni intergeniche sul cromosoma. Di fatto, almeno il 50% dei miRNAs, nei mammiferi, sono intragenici: il 40% è localizzato negli introni dei geni codificanti per le proteine mentre il 10% sta negli introni dei trascritti primari di RNA.

Il resto dei miRNAs è invece rappresentato da unità indipendenti di trascritti con specifici core di elementi promotori e segnali di poliadenilazione [78]. In particolare, negli ultimi anni, i miRNA hanno conosciuto un grande sviluppo in quanto sono stati riconosciuti come importanti elementi di regolazione genica attraverso la degradazione dell'mRNA, l'inibizione della sintesi proteica o alcuni meccanismi basati sul silenziamento della cromatina in diversi organismi multicellulari e sono implicati in una varietà di malattie tra cui il cancro [79].

## 1.2.2 Biogenesi ed attività dei microRNAs

I miRNAs sono piccoli RNA a singolo filamento di circa 21-23 nucleotidi di lunghezza, mentre normalmente un mRNA varia dai 2000 ai 5000 nucleotidi.

I geni dei miRNAs sono trascritti da una RNA polimerasi II in un trascritto primario chiamato pri-miRNA che possiede un CAP al 5' ed una coda poliadenilata al 3'. La lunghezza di un pri-miRNA non è ben definita ma si pensa sia di centinaia di nucleotidi. I pri-miRNAs vengono processati nel nucleo da Drosha, una RNasi di tipo III aiutata da una ds-RNA binding protein (DGCR8), il prodotto del taglio che ne deriva è un precursor miRNA definito pre-miRNA [80].

Il pre-miRNA è lungo circa 70-90 nucleotidi e con una struttura secondaria "hairpin" e di tipo stem-loop, in cui i due bracci dello stem possono non essere totalmente complementari. I pre-miRNAs sono caratterizzati da una sporgenza di due nucleotidi al 3' e vengono trasportati nel citoplasma con l'ausilio di un'esportina, l'esportina 5 e del cofattore Ran-GTP. Nel citoplasma sono ulteriormente processati alla base dello stem-loop da Dicer, una ribonucleasi della famiglia delle RNasi III insieme al ds-RNA binding partner (TRBP), e vengono quindi rilasciati come corti frammenti di RNA a doppio filamento di circa 22 nucleotidi (miRNA duplex). Ogni duplex contiene il filamento di miRNA maturo (5'-3') e un frammento miRNA\* (3'-5') complementare al primo. I due nucleotidi al 3' del duplex miRNA:miRNA\* vengono riconosciuti dalla proteina Ago2, reclutata da TRBP, che guida il duplex nell'incorporamento in un complesso RISC (RNA induced silencing complex) [81] che si attiva consequenzialmente allo svolgimento del duplex. Successivamente il filamento miRNA\* viene degradato nel citoplasma mentre il filamento miRNA maturo guida il complesso RISC verso l'mRNA target (Figura 6). Il riconoscimento tra un miRNA e il suo mRNA target avviene tra l'estremità 5' del miRNA (detta "seed region") e la regione 3' del target, per circa 2-8 nucleotidi; se l'interazione tra il miRNA e il target è quasi perfetta allora la regolazione è portata a termine con un processo detto RNA interference, nel quale il complesso RISC taglia direttamente il target; se la complementarietà tra miRNA e target non è perfetta, come nel caso di gran

parte dei mammiferi, allora la regolazione avviene con una repressione della traduzione, ossia un blocco nella traduzione del messaggero da parte del ribosoma (Figura 6) [82].

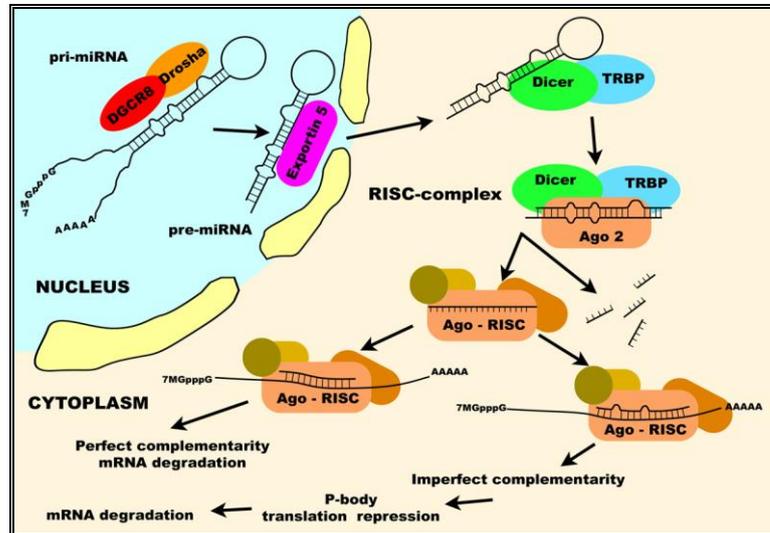


Figura 6 - Meccanismo per la biogenesi dei microRNAs.

La posizione dei geni dei miRNA all'interno del genoma è particolarmente interessante, di fatto gran parte di essi si trovano nelle sequenze intergeniche, ad almeno 1 Kb dai geni conosciuti, indicando che sono trascritti indipendentemente da questi. Molti miRNA formano anche dei clusters suggerendo che potrebbero essere trascritti come un singolo filamento policistronico, una teoria sostenuta dal coordinamento dell'espressione dei geni nel cluster.

E' per via della non perfetta complementarità che un singolo miRNA può probabilmente regolare diversi mRNA e questo rende particolarmente difficile la ricerca di target specifici con la conseguenza che le funzioni di molti miRNA sono ancora sconosciute [83].

### 1.2.3 MicroRNAs e cancro

Il primo collegamento tra miRNAs e cancro fu scoperto tramite l'identificazione di due miRNAs specifici, il miR-15 e il miR-16 localizzati nella regione del cromosoma 13, che contiene un gene soppressore del tumore che risulta essere mutato nel 68% delle leucemie linfocitiche croniche (CLL).

Più tardi si scoprì che mutazioni a livello dei precursori primari di entrambi i miRNAs ne riducevano l'espressione, causando la sovraespressione del loro gene target BCL-2, un gene anti-apoptotico.

La correlazione tra miRNAs e cancro venne poi rafforzata dal fatto che le posizioni dei miRNAs nel genoma non erano random, bensì erano riscontrate con maggior frequenza nei siti fragili dei cromosomi e nelle regioni cromosomiche già mappate relativamente alla presenza di un tumore [83].

Recenti studi bioinformatici e sperimentali affermano che il 30% dei geni umani sono target diretti per i miRNAs, suggerendo quindi un ruolo in quasi tutti i processi biologici che includono la regolazione del ciclo cellulare, la proliferazione, la crescita cellulare, l'apoptosi, la differenziazione e le risposte allo stress. Recenti analisi del genoma hanno identificato un'espressione sregolata dei miRNA in patologie maligne umane ed un potenziale doppio ruolo nella formazione dei tumori, di fatto i miRNAs possono modulare sia geni di pathway oncogenici, sia geni soppressori dei tumori, di cui fanno parte geni noti e già caratterizzati come la p53, c-Myc, RAS e BCR-ABL, mentre l'espressione dei miRNAs stessi può essere regolata da oncogeni o da geni tumor suppressor [79]. Alla luce di questi dati, l'espressione alterata dei miRNA è tutt'oggi considerata una caratteristica comune a tutti i tumori umani. Infatti, comparati con i tessuti sani dello stesso tipo, molti tumori presentano una differente espressione dei microRNAs. Nel 2006 Lu e collaboratori dimostrarono che il profilo di espressione dei miRNAs può classificare accuratamente diversi tipi di cancro e che gran parte dei miRNAs analizzati nello studio erano significativamente sottoespressi nei tumori rispetto ai tessuti sani. Questo fu confermato nel 2007 da Kumar che con un knockdown globale di miRNAs maturi, attraverso il silenziamento di Dicer, DGCR8 e Drosha, dimostrò una rafforzata tumorigenesi in cellule in vitro e un'accelerata formazione del tumore in vivo, indipendentemente dal tessuto di origine. Infatti, le cellule con difettosa biogenesi dei miRNAs dimostravano un'aumentata invasività del tessuto sano circostante dopo essere state iniettate in topi nudi [84]. Una grande analisi con microarray di 540 campioni tra cui 363 tumori solidi umani e 177 tessuti sani, mostra un ruolo più complesso dei miRNAs nel cancro, con l'identificazione del "miRNoma", composto da 36

miRNAs sovraespressi e 21 sottoespressi. Questo studio insieme all'ampia analisi del profilo del genoma, supporta l'ipotesi che, nel cancro, le alterazioni dei miRNAs consistono sia di sottoespressioni che di sovraespressioni con putative funzioni sia oncogene che di soppressione del tumore. Il fatto che i miRNAs possono agire sia come oncogeni che come soppressori del tumore, dipende dal tessuto e dai geni target [85]. Infatti i miRNAs la cui espressione è aumentata nei tumori, potrebbero essere considerati come oncogeni. Questi oncogeni chiamati "oncomirs", di solito promuovono lo sviluppo della malattia andando ad inibire i geni soppressori del tumore e/o geni che controllano il differenziamento o l'apoptosi. Molti miRNAs sono risultati significativamente espressi in differenti tipi di cancro e tutti sembrano comportarsi come oncogeni. Tuttavia pochi di questi sono stati caratterizzati, un esempio è il cluster mir 17-92, un miRNA policistronico localizzato sul cromosoma 13q31, un locus genico che risulta amplificato nel cancro al polmone e in una serie di linfomi. Rispetto all'espressione nel tessuto sano, il cluster mir 17-92 è significativamente sovra espresso nei tipi di cancro sopra elencati e in particolar modo nelle loro forme più aggressive, come il tumore a piccole cellule del polmone e il linfoma delle cellule B [86]. Nell'oncogenesi, l'espressione di alcuni miRNAs risulta essere più bassa nelle cellule tumorali, queste tipologie di miRNAs sono considerate come geni oncosoppressori. Tali miRNAs, in condizioni normali, prevengono lo sviluppo del tumore andando ad inibire oncogeni specifici e/o geni coinvolti nell'apoptosi o nel controllo della differenziazione cellulare. L'esempio più noto e recente di miRNA oncosoppressore è il miRNA let-7: è un gene molto conservato e presente anche nell'uomo, dove è localizzato in una regione del cromosoma che nel cancro subisce quasi sempre una delezione [87]. Takamizawa e collaboratori scoprirono che let-7 è debolmente espresso nelle cellule di cancro al polmone e questa riduzione è significativamente associata ad una più corta sopravvivenza post-operatoria del paziente, indipendentemente dallo stadio della malattia suggerendo che let-7 potrebbe essere, in condizioni normali, considerato un gene tumor suppressor [88]. Studi più recenti hanno identificato l'oncogene RAS come uno dei target di let-7 da cui è regolato negativamente. Nel cancro al polmone let-7 è significativamente sottoespresso per cui i livelli di RAS

aumentano rispetto al tessuto sano, confermando ancora una volta la funzione di soppressore del tumore di let-7 [89].

Oggi è chiaro che i miRNAs potranno entro breve essere sfruttati come markers biologici per la diagnosi, per la prognosi, per la determinazione precoce dell'origine di un tumore e come target di monitoraggio terapeutico. Finora sono stati ipotizzati due approcci terapeutici: bloccare i miRNAs oncogenici o aumentare i miRNAs oncosoppressori. Teoricamente gli oligonucleotidi anti-miRNA (AMOs) possono essere usati per sopprimere l'attività di uno specifico miRNA se si legano fortemente a questo e se l'unione rimane stabile in diverse condizioni fisiologiche [90]. Gli AMOs sono delle sequenze complementari ai miRNAs e per raggiungere questo scopo vengono sintetizzati con una serie di modificazioni chimiche come i nucleotidi 2'-O-metilati di RNA e nucleotidi di DNA bloccati (LNA). Queste modificazioni sono anche usate nell'approccio opposto in cui gli oligonucleotidi modificati vengono rilasciati nelle cellule che sottoesprimono miRNAs con attività di soppressori del tumore. Quest'ultimo metodo ha dato risultati promettenti nelle culture cellulari e necessita di essere testato su modelli animali. La più grande sfida per entrambi gli approcci è quella dell'iniezione diretta degli oligonucleotidi modificati nei tessuti tumorali [91].

## 2 - Scopo della tesi

Il Tumore a Cellule Giganti è una neoplasia dell'osso ad aggressività locale che presenta frequentemente recidive locali e in rari casi metastasi; queste ultime hanno localizzazione polmonare. A seconda delle caratteristiche clinico-radiologiche viene classificato in 3 stadi: latente, attivo e aggressivo. Quest'ultimo presenta una corticale interrotta e un maggior rischio di progressione maligna. Dal punto di vista istologico il TCG è caratterizzato da cellule mononucleate che rappresentano la fase proliferante frammiste a cellule polinucleate. Il trattamento di questo tumore è essenzialmente chirurgico e prevede l'asportazione della massa tumorale e di un margine di tessuto sano circostante. Solo nel caso di lesioni di stadio 3 che presentano una massiccia erosione ossea con conseguenti fratture patologiche è necessario ricorrere all'amputazione dell'arto.

A oggi purtroppo sono ancora poco affidabili i fattori biologici in grado di predire l'aggressività e l'evoluzione clinica del tumore. La rarità del TCG, infatti, ha come conseguenza una scarsa disponibilità di campioni tumorali umani utili per approfondire le conoscenze su tale patologia. Tuttavia grazie all'ampia casistica di materiale congelato e incluso in paraffina conservato presso la banca tessuti dell'Istituto Ortopedico Rizzoli e allo sviluppo di tecniche di screening ad alto rendimento e risoluzione, si sono potute avviare indagini globali del profilo molecolare del tumore del singolo paziente, focalizzandosi non più su un singolo fattore ma ampliando le ricerche all'intero network cellulare.

L'obiettivo principale di questa ricerca è l'identificazione di possibili marcatori utili per la stratificazione prognostica di pazienti affetti da TCG. Questo inoltre permetterebbe di riconoscere molecole "chiave" all'interno di pathway di segnalazione che possono rappresentare target per eventuali nuove terapie.

Mediante la tecnica di microarray è stato possibile identificare, in una popolazione tumorale di TCG, una lista di miRNA differenzialmente espressi.

Questi risultati sono stati per noi il punto di partenza per la ricerca di molecole correlate con alto potere discriminante nella stratificazione prognostica dei pazienti, ad esempio pazienti ricaduti verso pazienti liberi da eventi secondari. Abbiamo proceduto quindi con la validazione dei miRNA di maggior interesse mediante l'utilizzo di un'altra tecnica altamente sensibile e specifica quale la RealTime PCR, poi con l'analisi dell'espressione di geni e proteine target del miRNA che risultava avere un maggior impatto in termini di progressione della malattia.

In un secondo tempo la casistica è stata ampliata e l'analisi dell'espressione di molecole chiave dei pathway correlati è stata associata con le caratteristiche cliniche dei pazienti in termini di ricaduta sia locale che metastatica.

La validazione dei marcatori, considerando i dati clinici a nostra disposizione, permette di definire il loro possibile impatto diagnostico e/o prognostico e di identificare molecole che potrebbero risultare utili a migliorare il trattamento chirurgico e/o medico del paziente.

Parallelamente abbiamo condotto uno studio per valutare la variazione di espressione delle molecole maggiormente coinvolte nella aggressività tumorale in campioni di TCG da pazienti sottoposti a trattamento farmacologico in grado di bloccare l'innesco del meccanismo osteoclastogenico a livello del legame RANK-RANKL così da verificare l'efficacia del trattamento stesso.

## **3 - Materiali e metodi**

In questo studio sono stati presi in considerazione solo campioni provenienti da pazienti affetti da Tumore a Cellule Giganti dell'osso di tipo classico, non sono stati inclusi TCG dell'osso derivanti da evento secondario ad altre neoplasie. Tutti i casi sono stati selezionati dalla banca dei tessuti dell'Istituto Ortopedico Rizzoli da un gruppo di esperti patologi.

La diagnosi è stata effettuata su campioni colorati in ematossilina-eosina in accordo con i criteri istopatologici [3]. Sono stati considerati pazienti con un follow up minimo di 36 mesi che al momento del prelievo istologico non erano stati sottoposti a nessun tipo di terapia preoperatoria e pazienti sottoposti a trattamento di cui erano disponibili sia la biopsia, prelevata prima di essere sottoposti a trattamento, che il pezzo chirurgico prelevato dopo la terapia.

Di tutti i pazienti si dispone di complete e dettagliate informazioni cliniche.

### **3.1 Fase 1**

#### **3.1.1 Casistica**

Grazie ad una collaborazione con il Dipartimento di Patologia dell'Università di Helsinki, è stata condotta un'analisi di espressione dei microRNA su 10 campioni di tessuto proveniente da pazienti affetti da TCG, di cui 5 di grado 3, ricaduti con metastasi durante il periodo di follow up e 5 di grado 1-2 non metastatici (Tabella 1).

I miRNA più significativi che differenziano i due gruppi sono stati validati presso il Laboratorio di Oncologia Sperimentale del Rizzoli, mediante RealTime PCR sulla stessa casistica. Tramite specifici software bioinformatici si è quindi stabilito quali fossero i target dei miRNA deregolati che sono stati quindi validati con la RealTime PCR su una casistica più ampia che comprendeva i 10 campioni di partenza e ulteriori 10 campioni di TCG per un totale di 20 campioni, di cui 10 con sopravvivenza libera da eventi secondari e

10 ricaduti in termini di metastasi e/o di recidiva locale (Tabella 1). 6 campioni di tessuto osseo sano provenienti da pazienti non oncologici sono stati inclusi come controllo.

Tutti i campioni di TCG provenienti dai pazienti ricaduti, sia con metastasi che con recidiva locale, erano di grado 3 con corticale interrotta in più punti e tendenza ad espandersi nei tessuti circostanti. Nei gradi 1-2 la corticale si presentava integra o assottigliata con crescita del tumore all'interno dell'osso.

La bassa percentuale dei metastatici rispecchia l'andamento della malattia che ha tendenza ad una aggressività per lo più locale.

Caso	Età	Sesso	Grado	Ricaduta	Follow up (mesi)	Analisi
1	26	F	3	RL+M	121	MA, miRNA-RT, Gene-RT, WB
2	23	F	3	RL+M	126	MA, miRNA-RT, Gene-RT, WB
3	25	M	3	RL+M	187	MA, miRNA-RT, Gene-RT, WB
4	31	F	3	M	102	MA, miRNA-RT, Gene-RT, WB
5	22	F	2	NON RIC	50	MA, miRNA-RT, Gene-RT, WB
6	25	F	1	NON RIC.	102	MA, miRNA-RT, Gene-RT, WB
7	44	M	1	NON RIC.	51	MA, miRNA-RT, Gene-RT, WB
8	17	F	3	RL+M	61	MA, miRNA-RT, Gene-RT, WB
9	28	F	1	NON RIC.	115	MA, miRNA-RT, Gene-RT, WB
10	23	M	2	NON RIC.	68	MA, miRNA-RT, Gene-RT, WB
11	37	F	1	NON RIC.	81	Gene-RT
12	75	M	1	NON RIC.	114	Gene-RT
13	67	M	1	NON RIC.	69	Gene-RT
14	22	M	1	NON RIC.	71	Gene-RT
15	30	M	1	NON RIC.	81	Gene-RT
16	17	F	3	RL+M	81	Gene-RT
17	19	M	3	RL	172	Gene-RT
18	23	F	3	RL	52	Gene-RT
19	54	M	3	RL	137	Gene-RT
20	55	M	3	RL	51	Gene-RT

**Tabella 1** - Casistica dello studio. RL = recidiva locale; M = metastasi; NON RIC = non ricaduto. MA = microRNA Array; miRNA-RT = RealTime PCR miRNA ; Gene-RT = RealTime gene target; WB = Western Blot.

### 3.1.2 Estrazione RNA

L'estrazione dell'RNA totale da tutti i 26 campioni di tessuto fresco congelato è stata effettuata tramite l'utilizzo di TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad CA).

I campioni congelati sono stati sminuzzati in ghiaccio secco mediante un bisturi sterile ed il tessuto così tritato è stato messo in un opportuno volume di TRIzol. È stato usato un omogenizzatore di tipo rotore-statore (Polytron) per distruggere tessuti e cellule; il materiale insolubile è stato separato dalla soluzione tramite centrifugazione a 10000/2-3min/4°C; quindi è stato recuperato il surnatante, messo in una provetta pulita alla quale sono stati aggiunti 200µl di cloroformio freddo che permette la separazione della soluzione in una fase acquosa contenente RNA e una fase organica che contiene DNA e proteine. Dopo agitazione meccanica la soluzione è stata incubata in ghiaccio per 15min e successivamente centrifugata a 13000rpm/15min/4°C. E' stato recuperato quindi il surnatante ed è stato messo in una provetta pulita aggiungendo un uguale volume di isopropanolo per far precipitare l'RNA, si lascia quindi incubare in ghiaccio la soluzione per 15min e dopo centrifugazione a 14000rpm/4°C/15min si recupera il pellet sul fondo della provetta che corrisponde al sedimento dell'RNA; si è tolto con una siringa il surnatante ed è stato effettuato un lavaggio con etanolo freddo al 70%; si effettua nuovamente una centrifugazione a 13000rpm/4°C/15min, si rimuove l'etanolo lasciando asciugare all'aria il pellet per qualche minuto. L'RNA viene così sospeso in opportuno volume di RNasecure reagent (Ambion, Inc, Austin TX), una soluzione priva di RNasi che consente di conservare il campione che viene attivato a 60°C.

La concentrazione di RNA è stata determinata tramite lo spettrofotometro, il rapporto di assorbanza A260/A280 è risultato essere 1,9.

Si effettua così una elettroforesi su gel di agarosio al 2% in TBE 1X che permette di verificare l'integrità del prodotto e l'assenza di DNA genomico o proteine contaminanti.

I campioni di RNA così ottenuti vengono mantenuti a -80°C ed utilizzati per le successive analisi di Affymetrix e RealTime PCR.

### **3.1.3 Analisi dell'espressione dei miRNA mediante microarray**

Lo studio del profilo di espressione dei miRNA nei 10 campioni di TCG (5 metastatici e 5 non metastatici), effettuato presso l'Università di Helsinki, è stato eseguito mediante piattaforma Human miRNA Microarray Kit (V3) della ditta Agilent Technologies, contenente 866 sonde per miRNA umani e 89 per miRNA virali tratti dal Sanger Database v12. La marcatura dei campioni è stata eseguita con il sistema monocolor miRNA Complete Labeling and Hybridization Kit, contenente la cianina 3-pCp.

Il principio su cui si basa la tecnica dei microarrays è quello dell'ibridazione tra molecole complementari di acido nucleico a singolo filamento: la prima, chiamata probe, è attaccata covalentemente alla superficie del vetrino ed ha una sequenza nota appositamente disegnata per potersi legare alla molecola complementare che si vuole studiare nel campione, chiamata target. Per amplificare il segnale, e renderlo quindi più facilmente rilevabile in fase di analisi, molte copie della stessa probe vengono posizionate nello stesso punto del vetrino, in modo da formare uno spot.

Nel caso di avvenuta ibridazione, essa viene rilevata in fase di scansione del vetrino grazie alla fluorescenza emessa dalla molecola target marcata con un opportuno fluoroforo.

Il vetrino pronto per la lettura viene scansionato mediante lo strumento Scanner Agilent G2565 (Agilent Technologies): il sistema è in grado di rilevare la fluorescenza emessa dal vetrino dopo l'eccitazione da parte di un laser a determinate lunghezze d'onda (550 nm quella del laser di eccitazione, 570 nm quella di emissione della cianina impiegata in questo studio). Con la scansione, che può essere eseguita a risoluzioni diverse e può arrivare fino a 2  $\mu\text{m}$ , si ottiene un'immagine relativa alla fluorescenza emessa su tutto il vetrino, la quale dovrà essere successivamente analizzata con opportuni software per estrarre l'intensità di emissione di ciascuno spot.

I dati ottenuti sono stati rielaborati con Agilent's Feature Extraction Software e quindi analizzati mediante GeneSpring GX Analysis Software v 11.0.2 (Agilent Technologies).

### **3.1.4 Retrotrascrizione e RealTime PCR: validazione dell'espressione del miR-136**

Un'aliquota di RNA di tutti i 10 campioni è stata convertita nel in cDNA utilizzando il TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA); a 5µl di RNA vengono aggiunti 3µl di primer e 7µl di master mix che contiene una miscela di dNTPs, MultiScribe Reverse Transcriptase, 10X Reverse Transcription Buffer, RNase Inhibitor e nuclease free water.

La reazione di retrotrascrizione è avvenuta nel termociclatore Applied 2400 adeguatamente settato ed alle seguenti condizioni:

- 30min a 16°C
- 30min a 42°C
- 5min a 85°C
- ∞ a 4°C.

L'analisi dell'espressione del miR-136 è stata effettuata sui 10 campioni precedentemente analizzati con analisi di microarray (Tabella 1). L'analisi è stata eseguita mediante RealTime PCR che permette di identificare lo specifico miRNA presente nel campione e di valutarne l'espressione in rapporto a quella di un normalizzatore appositamente scelto. L'intero procedimento è basato sull'impiego di kit TaqMan microRNA assay (Applied Biosystems, USA).

La successiva reazione di amplificazione è stata condotta in duplicato per ogni campione di cDNA; ogni reazione ha un volume totale di 20µl e contiene 1.33 µl di cDNA o controllo endogeno, 18.67µl di master mix di reazione che consiste in:

- 1µl Taqman MicroRNA Assay 20X
- 7.67µl Nuclease free water
- 10µl TaqMan 2X Universal PCR Master No AmpErase UNG

Essendo una PCR quantitativa relativa, ogni campione ha bisogno di essere amplificato per il gene di interesse e per un gene di riferimento housekeeping, detto controllo endogeno che in questo caso è RNU44, un RNA endogeno costitutivamente espresso in tutti i tipi cellulari.

La reazione è avvenuta alle seguenti condizioni:

- 10min a 95°C, attivazione degli enzimi
- 15sec a 95°C, denaturazione
- 1min a 60°C, appaiamento ed estensione

Sono stati impostati 40 cicli di reazione.

La reazione di amplificazione viene condotta utilizzando lo strumento ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystem, Foster City, CA), il software di corsa SDS 2.3 ed il software di analisi RQ manager (Applied Biosystem, Foster City, CA). In questo studio è stato utilizzato il metodo di quantificazione comparativo relativo del  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

Gli assay usati sono riportati nella tabella 2, tutti i prodotti sono forniti dalla ditta Applied Biosystem:

<b>miRNA</b>	<b>ASSAY ID</b>
miR-1	hsa-miR-1 002222
miR-934	hsa-miR-934 002177
miR-513-5p	hsa-miR513-5p 002090
miR-136	hsa-miR-136 000592
let7a*	hsa-miR-let7a* 002307
RNU44	hsa-miR-RNU44 001094

Tabella 2 - RealTime PCR, Assay utilizzati.

### 3.1.5 La validazione del metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$

Il metodo del  $2^{-\Delta\Delta CT}$  è valido se l'efficienza dell'amplificazione del target e l'efficienza dell'amplificazione del gene di riferimento sono approssimativamente uguali. Un metodo per valutare se i due amplificati hanno la stessa efficienza è verificare come varia il  $\Delta C_T$  a diluizioni seriali dello stesso template. I risultati che si ottengono dall'esperimento di validazione sono riportati in un grafico che ha per ascissa il logaritmo della quantità di cDNA e per ordinata il valore di  $\Delta C_T$ . La retta che si ottiene deve avere una pendenza minore di 0,1 poiché solo in questo caso i  $\Delta C_T$  sono confrontabili ed il metodo può essere applicato per l'analisi comparativa.

Se le efficienze dei due sistemi non sono uguali si deve utilizzare il metodo della quantificazione assoluta, in alternativa si procede con la ricerca di nuovi primers.

Per eseguire questo esperimento sono state utilizzate tre concentrazioni diverse di cDNA ed è stata effettuata una corsa di PCR quantitativa RealTime.

I valori di  $\Delta C_T$  ottenuti erano comparabili ed è stato quindi possibile utilizzare il metodo del  $2^{-\Delta\Delta CT}$  per l'analisi dei dati.

### 3.1.6 Predizione bioinformatica dei geni target del miR-136

I target del miR-136 sono stati individuati utilizzando il sistema bioinformatico che utilizza il software TargetScan.

Esistono diversi algoritmi computazionali che predicono i target dei miRNA in base alla complementarietà e/o termo stabilità delle sequenze [92]. Un buon algoritmo dovrebbe stimare circa un centinaio di targets, considerare la percentuale di falsi positivi, avere un'evidenza computazionale ma anche sperimentale dell'autenticità del risultato, identificare classi funzionali comuni oltre che geni regolatori della trascrizione.

Il sistema TargetScan si basa sulla combinazione di modelli termodinamici di interazione di duplex RNA:RNA con l'analisi comparativa di sequenza per predire i targets dei miRNA conservati in base alla presenza di sequenze omologhe 3' UTR [93] l'efficacia complessiva viene espressa da un context

score. La correlazione tra il context score e il sito di efficacia può essere validata sperimentalmente [94]. La selezione dei geni bersaglio rimane comunque un problema complesso, recenti studi indicano che molti fattori addizionali come il contenuto locale di AU e la posizione del sito possono significativamente pregiudicare l'efficacia del sito target per il sistema di tale software [95].

### **3.1.7 Retrotrascrizione e RealTime PCR: validazione dell'espressione dei geni target del miR-136**

Un'aliquota di RNA di tutti i 20 campioni (tabella 1) è stata convertita nel cDNA utilizzando il kit High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA); i 100µl della miscela di retrotrascrizione contenevano tampone di retrotrascrizione 10X, dNTPs 25X, random primers 10X, 400ng di RNA e Multiscribe Reverse Transcriptase.

La reazione di retrotrascrizione è avvenuta nel termociclatore Applied 2400 adeguatamente settato ed alle seguenti condizioni:

- 10min a 25°C
- 120min a 37°C
- ∞ a 4°C.

Per ogni gene la reazione di amplificazione è stata condotta in duplicato, in un volume totale di 25µl. La mix di reazione contiene:

- 1,25µl di Target Assay Mix 20X o Endogenous Control Assays Mix 20X
- 25ng di cDNA diluiti in 11,25µl di Rnase free water (Qiagen, Valencia, CA)
- 12,5µl di TaqMan Universal Master Mix 2X (AmpliAq Gold DNA polimerasi, AmpErase UNG, deossinucleotidi trifosfato, fluorocromo di riferimento passivo, tampone di PCR ottimizzato) (Applied Biosystems, Foster City, CA).

La reazione è avvenuta alle seguenti condizioni:

- 2min a 50°C , attivazione dell'enzima UNG (Uracil-N-Glicosilasi)
- 10min a 95°C, denaturazione
- 1min a 60°C, appaiamento ed estensione

Sono stati impostati 45 cicli di reazione.

Sono stati utilizzati prodotti specifici per l'analisi quantitativa, TaqMan Expression Assay che consistono in una miscela contenente i primers ed una sonda del tipo TaqMan, specifica per la sequenza di interesse (gene bersaglio o gene di riferimento endogeno) e presenti in quantità ottimale per ottenere la massima efficienza di reazione.

Gli assay usati sono riportati nella tabella 3, tutti i prodotti sono forniti dalla ditta Applied Biosystem:

<b>Gene Target</b>	<b>ASSAY ID</b>
NF1B	Hs00232149_m1
RANK	Hs00187192_m1
ACTB	Hs99999903_m1

Tabella 3 - RealTime PCR, Assay utilizzati.

Le sonde TaqMan presenti in tutti i prodotti di TaqMan Expression Assays sono marcate al 5' con un fluorocromo reporter del tipo 6-FAM e al 3' con un quencher non fluorescente (NFQ).

In questo studio è stato utilizzato il metodo di quantificazione comparativo relativo del  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

L'espressione del gene bersaglio è stata normalizzata su un gene di riferimento, Actina (ACTB) (TaqMan Expression Assays-Applied Biosystems, Foster City, CA) e rispetto ad un campione calibratore (pool di linfociti sani).

## **3.2 Fase 2**

Nella seconda fase dello studio abbiamo effettuato analisi di espressione delle principali proteine target del miR-136 con tecnica di western blot sugli stessi campioni (5 metastatici e 5 non metastatici) precedentemente analizzati per l'espressione dei microRNA e su 5 campioni di pazienti sani, non oncologici usati come controllo. Le caratteristiche cliniche e patologiche dei pazienti sono riportate in tabella 1.

Per validare l'impatto clinico delle proteine target del miR-136, con particolare attenzione a quelle coinvolte nel rimodellamento osseo, abbiamo condotto l'analisi IHC utilizzando Tissue Microarray (TMA) su una casistica di 163 TCG da pazienti con diverse caratteristiche cliniche e a differente decorso della malattia (Tabella 4).

Abbiamo parallelamente condotto uno studio di espressione delle proteine selezionate su sezioni di tessuto provenienti da pazienti affetti da TCG e sottoposti a trattamento con un anticorpo monoclonale capace di bloccare il meccanismo di osteoclastogenesi. I 26 pazienti presi in considerazione sono affetti da TCG classico di grado 3 e presentano un diverso decorso di malattia e differenti caratteristiche cliniche (Tabella 5). Di questi pazienti si disponeva di biopsie incluse in paraffina prelevate prima della somministrazione del trattamento e di sezioni derivanti da intervento chirurgico effettuato dopo un periodo di trattamento. Essendo pazienti sottoposti a un protocollo sperimentale non si dispone di tutte le informazioni cliniche.

### **3.2.1 Estrazione proteica e Western Blot**

L'analisi è stata condotta a partire da tessuto fresco congelato a  $-80^{\circ}\text{C}$  che è stato sminuzzato in ghiaccio secco mediante un bisturi sterile ed il tessuto è stato triturato mediante omogenizzatore di tipo rotore-statore (Polytron), in un apposito buffer di estrazione contenente specifici inibitori delle proteasi (Protease Inhibitor Mix, 80-6501-42, Amersham Biosciences), lasciato in

ghiaccio per 30 minuti e siringato ogni 10 minuti. Il campione viene quindi centrifugato a + 4°C, per 5 minuti, a 12000rpm; viene infine recuperato il surnatante che costituisce l'estratto proteico. Il successivo dosaggio delle proteine è stato valutato mediante lo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595nm.

I campioni sono stati quindi sottoposti all'analisi elettroforetica, in condizioni denaturanti, utilizzando un gel con una percentuale di acrilamide del 10%. È stato utilizzato lo standard biotinilato low range (Bio-Rad Laboratories). Per la corsa è stato utilizzato un voltaggio di 40 V nella fase dello stacking e di 100V nel running.

Il blottaggio è stato effettuato a 4°C, 100V, 1 ora, su membrane di nitrocellulosa.

Successivamente le membrane sono rimaste immerse in una soluzione di bloccaggio di non fat dry milk al 5% ed incubate con i rispettivi anticorpi primari: anti-NF1B (AbNova) diluito 1:500, anti-RANK (Santa Cruz) diluito 1:1000. Gli anticorpi primari sono stati diluiti in latte al 5% in TBST 1X. Le membrane vengono lasciate in incubazione over night a +4°C. Dopo opportuni lavaggi l'immunocomplesso è stato visualizzato mediante incubazione con anticorpo secondario (Anti-Mouse IgG, Amersham GE Healthcare, diluito 1:1000 in latte al 5% in TBST 1X per NF1B e Anti-Rabbit IgG Amersham GE Healthcare, diluito 1:1000 in latte al 5% in TBST 1X per RANK). Le lastre sono state visualizzate in chemiluminescenza (Immobilon Western, Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore) ed analizzate al densitometro GS800 (Bio-rad) mediante software Quantity One (Bio-Rad).

### **3.2.2 Immunoistochimica su TMA**

Campioni rappresentativi delle lesioni tumorali dei pazienti considerati vengono prelevati sottoforma di "carotine" e posti nel blocchetto di paraffina ricevente utilizzando lo strumento TMA Master (3DHistech). Il blocchetto ricevente contiene 2 o 3 campioni per ogni paziente, ogni TMA contiene così in tutto 70\80 sezioni.

I TMA utilizzati contengono “cores” di tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina, provenienti da 163 casi di pazienti affetti da TGC, 83 con sopravvivenza libera da eventi secondari e 80 ricaduti, di cui 72 con recidiva locale e 33 con metastasi; un ulteriore TMA è costituito da sezioni provenienti da 26 pazienti affetti da TCG di grado 3 in trattamento con anticorpo monoclonale, le uniche informazioni di cui si dispone sono età, sesso e grado del tumore.

Le caratteristiche dei pazienti sono riportate in tabelle (Tabella 4 e tabella 5).

<b>Caso</b>	<b>Età</b>	<b>Sesso</b>	<b>Grado</b>	<b>Aplodia</b>	<b>Ricaduta</b>	<b>Follow up (mesi)</b>
1	25	F	2	D	NON RIC	168
2	58	M	3	D	NON RIC	187
3	39	M	3	D	RL	186
4	22	M	3	D	NON RIC	149
5	13	F	2	D	RL	85
6	76	F	3	A	NON RIC	124
7	39	M	3	D	RL	171
8	59	F	1	D	NON RIC	90
9	41	M	3	A	RL+M	46
10	34	F	2	D	RL	171
11	46	M	2	D	RL	36
12	26	M	3	D	RL	161
13	34	M	3	D	RL+M	394
14	34	M	2	D	NON RIC	134
15	30	F	2	D	NON RIC	113
16	38	F	1	D	RL	80
17	31	M	3	A	RL	36
18	13	F	2	D	NON RIC	89
19	24	M	1	D	NON RIC	73
20	20	M	1	D	NON RIC	138
21	65	M	3	A	RL+M	77
22	26	F	3	A	RL	112
23	26	F	3	D	RL+M	121
24	36	M	1	D	NON RIC	76
25	31	F	1	D	NON RIC	149
26	24	F	1	D	NON RIC	123
27	19	F	2	D	NON RIC	136
28	52	F	3	D	NON RIC	125
29	26	M	1	D	NON RIC	111
30	24	F	3	D	NON RIC	70

31	23	F	3	D	NON RIC	144
32	20	M	3	D	NON RIC	87
33	18	F	2	D	RL	115
34	33	F	2	D	NON RIC	129
35	23	F	1	D	RL	52
36	38	F	1	D	NON RIC	125
37	31	F	3	A	RL	175
38	22	F	3	A	RL	143
39	15	F	1	D	NON RIC	86
40	23	F	2	D	NON RIC	117
41	33	F	3	D	NON RIC	85
42	56	M	1	D	NON RIC	109
43	59	F	3	A	RL+M	40
44	37	M	1	D	NON RIC	133
45	23	F	3	D	RL+M	126
46	24	F	3	D	RL	37
47	60	M	3	D	RL	140
48	23	F	1	D	NON RIC	114
49	23	M	3	D	RL+M	36
50	51	M	2	D	RL	122
51	44	M	1	D	NON RIC	92
52	16	F	3	D	RL	57
53	20	F	2	D	NON RIC	69
54	38	M	1	D	NON RIC	92
55	36	F	2	D	RL	199
56	19	M	3	D	NON RIC	109
57	54	M	3	A	RL	137
58	37	M	1	D	NON RIC	111
59	56	M	1	D	NON RIC	36
60	27	M	3	D	M	210
61	66	F	2	D	NON RIC	142
62	53	M	3	D	RL+M	81
63	39	F	3	D	RL+M	94
64	17	F	3	D	RL+M	61
65	19	M	1	D	RL	163
66	22	M	3	D	RL	148
67	55	F	3	D	NON RIC	122
68	33	F	2	D	NON RIC	36
69	45	F	1	D	RL	86
70	40	F	1	D	NON RIC	79
71	23	M	1	D	NON RIC	44
72	33	F	3	D	NON RIC	58
73	54	F	3	D	NON RIC	189
74	32	F	1	D	RL	88
75	57	M	3	D	RL	37
76	22	M	1	D	NON RIC	142
77	22	M	1	D	NON RIC	71

78	28	F	2	D	NON RIC	115
79	31	M	1	D	RL	36
80	35	M	3	D	NON RIC	135
81	38	M	3	D	RL	104
82	24	F	2	D	NON RIC	142
83	67	M	1	D	NON RIC	69
84	41	F	2	D	NON RIC	79
85	34	F	2	D	RL	201
86	26	M	3	D	NON RIC	168
87	27	F	1	D	NON RIC	113
88	58	M	3	D	RL	108
89	53	M	1	D	RL	84
90	76	F	2	D	NON RIC	57
91	40	M	3	D	NON RIC	172
92	20	F	2	D	RL	209
93	31	F	2	D	RL+M	147
94	53	M	2	D	NON RIC	97
95	52	M	1	D	RL	152
96	18	F	3	D	NON RIC	103
97	31	F	1	D	RL	57
98	34	M	1	D	RL	135
99	25	F	1	D	NON RIC	103
100	23	M	3	D	NON RIC	68
101	21	M	3	D	NON RIC	37
102	27	F	3	D	RL	92
103	24	M	3	D	RL	114
104	21	F	1	D	RL	169
105	29	F	3	A	RL	65
106	18	M	3	D	RL	215
107	71	M	2	D	NON RIC	63
108	32	M	2	D	RL	214
109	17	F	1	D	RL	131
110	44	F	1	D	NON RIC	121
111	37	M	3	D	NON RIC	36
112	24	M	3	D	RL	201
113	37	F	3	D	NON RIC	108
114	28	M	3	D	NON RIC	180
115	30	M	1	D	NON RIC	81
116	21	F	2	D	RL	242
117	27	F	1	D	NON RIC	105
118	33	F	1	D	NON RIC	155
119	5	F	1	D	NON RIC	157
120	55	F	2	D	RL	217
121	21	M	3	D	NON RIC	196
122	75	M	1	D	NON RIC	114
123	33	M	3	D	NON RIC	195
124	25	F	3	D	NON RIC	184

125	49	F	1	D	NON RIC	90
126	22	F	2	D	NON RIC	169
127	33	F	2	D	NON RIC	125
128	37	F	1	D	NON RIC	81
129	19	F	2	D	RL	125
130	37	M	3	D	M	151
131	31	F	3	D	M	102
132	27	F	2	D	RL	141
133	31	F	3	D	NON RIC	115
134	32	M	3	D	NON RIC	115
135	31	F	2	D	NON RIC	91
136	29	M	3	D	NON RIC	166
137	19	M	3	D	RL	172
138	15	F	2	D	NON RIC	128
139	36	M	2	D	NON RIC	46
140	51	M	3	D	RL+M	201
141	19	F	1	D	NON RIC	127
142	17	F	3	A	RL+M	81
143	52	F	3	D	NON RIC	76
144	21	F	2	D	NON RIC	118
145	36	M	2	D	NON RIC	150
146	25	M	3	A	RL	112
147	37	F	3	D	M	202
148	20	M	3	D	RL+M	227
149	19	F	3	D	M	93
150	16	F	3	D	RL+M	76
151	62	M	3	D	RL+M	120
152	32	F	3	D	RL+M	61
153	39	M	3	D	RL+M	78
154	23	F	3	D	M	99
155	22	M	3	D	RL+M	104
156	29	F	3	D	RL+M	161
157	27	F	3	D	RL+M	78
158	31	M	3	D	RL+M	36
159	20	M	3	D	M	202
160	20	M	3	D	RL+M	165
161	44	M	3	D	RL+M	358
162	27	F	3	D	RL+M	17
163	24	M	3	D	M	95

Tabella 4 - Casistica dello studio. M = metastasi; RL = recidiva locale; NON RIC = non ricaduto (libero da malattia).

Caso	Età	Sesso	Grado	Follow up (mesi)
1	45	M	3	48
2	34	M	3	17
3	40	M	3	40
4	25	F	3	66
5	44	F	3	41
6	35	M	3	65
7	30	M	3	63
8	40	M	3	36
9	24	F	3	88
10	43	M	3	35
11	34	F	3	33
12	49	F	3	33
13	27	F	3	34
14	36	F	3	29
15	49	M	3	26
16	25	F	3	29
17	42	F	3	29
18	29	M	3	30
19	47	M	3	25
20	30	M	3	28
21	37	M	3	27
22	20	F	3	26
23	42	M	3	23
24	44	F	3	20
25	35	F	3	24
26	22	F	3	20

Tabella 5 - Casistica dello studio - Pazienti in trattamento.

Le sezioni su TMA sono state sparaffinate ponendole in stufa per 30 minuti a 37°C, successivamente sono state poste in xilolo I e II per 60 minuti e reidratate attraverso passaggi in etanolo 100%, 95%, 70% ed infine in acqua distillata. Le sezioni sono state poi sottoposte ad un trattamento con soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 5 minuti a temperatura ambiente allo scopo di bloccare le perossidasi endogene. Per limitare le eventuali aspecificità di reazione è stato applicato per 15 minuti il blocking solution (Universal Block, KPL).

Le sezioni sono state incubate per tutta la notte a 4°C con gli anticorpi primari diluiti con Phosphatase Buffered Saline 1X (PBS); gli anticorpi utilizzati sono riportati in tabella (Tabella 6).

<b>ANTICORPO</b>	<b>DILUIZIONE</b>	<b>DITTA</b>
<b>RANK</b>	1:100	Santa Cruz Biotechnology
<b>NF1B</b>	1:1000	Abnova
<b>RANKL</b>	1:100	Abcam
<b>TRAF6</b>	1:100	Santa Cruz Biotechnology
<b>IL-6</b>	1:50	Santa Cruz Biotechnology
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	1:100	Santa Cruz Biotechnology
<b>Osteocalcin</b>	1:100	Santa Cruz Biotechnology
<b>MMP-2</b>	1:50	Calbiochem
<b>MMP-9</b>	1:50	Calbiochem
<b>CAII</b>	1:100	Santa Cruz Biotechnology
<b>FN</b>	1:50	Santa Cruz Biotechnology
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	1:50	Abcam
<b>C-FOS</b>	1:50	Santa Cruz Biotechnology

Tabella 6 – Anticorpi e diluizioni utilizzate in IHC.

Dopo i lavaggi con tampone PBS 1X le sezioni sono state incubate per 30 minuti con l'anticorpo secondario biotinilato (kit Dako k0679). Dopo opportuni lavaggi in PBS 1X le sezioni sono state incubate con una soluzione contenente i complessi streptavidina-HRP per consentire la reazione immunoenzimatica di rivelazione. Al termine dell'incubazione i vetri sono stati lavati con PBS 1X e ricoperti con soluzione che contiene il tampone substrato ed il cromogeno DAB (3,3'-diaminobenzidina) necessari per la reazione colorimetrica.

Successivamente le sezioni sono state contrastate con ematossilina e quindi disidratate attraverso passaggi in etanolo crescente, sono seguiti 2 lavaggi in xilolo; i vetrini coprioggetto sono stati montati mediante mezzo di montaggio non acquoso.

Il livello di immunoreattività è stata valutato mediante l'assegnazione di uno score determinato dalla somma dell'intensità dell'immunocolorazione (0 = negativo, 1 = moderatamente positivo, 2 = fortemente positivo) e dalla percentuale delle cellule positive (0 = negativo, 1 = positività < 25% delle cellule, 2 = positività del 25-75% delle cellule, 3 = positività > 75% delle cellule). I campioni che raggiungevano lo score totale di 4 o 5 sono stati quindi considerati positivi, i campioni con score minore di 4 sono stati considerati negativi.

Come controllo negativo è stata utilizzata una sezione a cui non viene applicato l'anticorpo primario. Come controlli positivi sono stati usati: tessuto umano dell'intestino tenue (RANK), rene umano (Osteocalcin, CAII e FN), tessuto linfoide umano (RANKL e IL-6), colon umano (TRAF6), neuro fibroma umano (MMP-2), adenocarcinoma umano (MMP-9), surrene umano (c-Fos), endometrio (IL-1 $\alpha$ ), carcinoma alla prostata (TGF- $\beta$ ) e tessuto mammario umano normale (NF1B).

Abbiamo posto particolare attenzione alla localizzazione degli antigeni escludendo dallo studio tutte quelle sezioni che mostravano positività in aree non previste dai data sheet degli anticorpi.

### **3.2.3 Analisi statistica**

Tutti i dati riguardanti i microRNA validati con tecnica di RealTime sono stati valutati come mediana, 25° e 75° percentile a causa della loro distribuzione non Gaussiana. Sono state utilizzate analisi statistiche non parametriche di Mann-Whitney e Kruskal Wallis per comparare i dati di espressione genica in campioni non appaiati; il test di Fischer è stato utilizzato per valutare l'associazione tra i diversi parametri della popolazione, espressione proteica e sopravvivenza libera da malattia in termini sia di ricaduta locale che di metastasi. Le curve di sopravvivenza libera da malattia sono state calcolate mediante l'analisi di Kaplan-Meier e la comparazione delle curve è stata ottenuta con il Log-Rank test. L'analisi multivariata è stata valutata mediante analisi di Cox. E' stato calcolato il coefficiente Tau di Kendall per valutare la correlazione tra i parametri studiati ed è stata eseguita la curva di Roc per stimare sensibilità e specificità del modello prognostico. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate con il software SPSS Statistics (SPSS). Per tutte le analisi statistiche i valori di  $p < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

## 4 - Risultati

### 4.1 Fase 1

#### 4.1.1 Analisi dei livelli di espressione di miRNA mediante RealTime PCR

In seguito alla collaborazione con l'Istituto di Patologia di Helsinki, l'analisi di microarray, effettuata per ibridazione dei campioni su chip e l'acquisizione dei dati mediante complessa analisi bioinformatica/statistica tra i due gruppi di campioni posti a confronto, ha consentito di individuare miRNA che differenziano il gruppo dei TCG metastatici rispetto a quello dei non metastatici (Tabella 7).

<b>Pazienti Metastatici</b>	<b>Pazienti Non Metastatici</b>
miR-224	miR-542-3p
miR-10b*	miR-505*
miR-513a-5p	miR-136
let-7a*	miR-1
miR-876-5p	miR-542-5p
miR-934	

Tabella 7 – MicroRNA differenzialmente espressi mediante analisi di microarray.

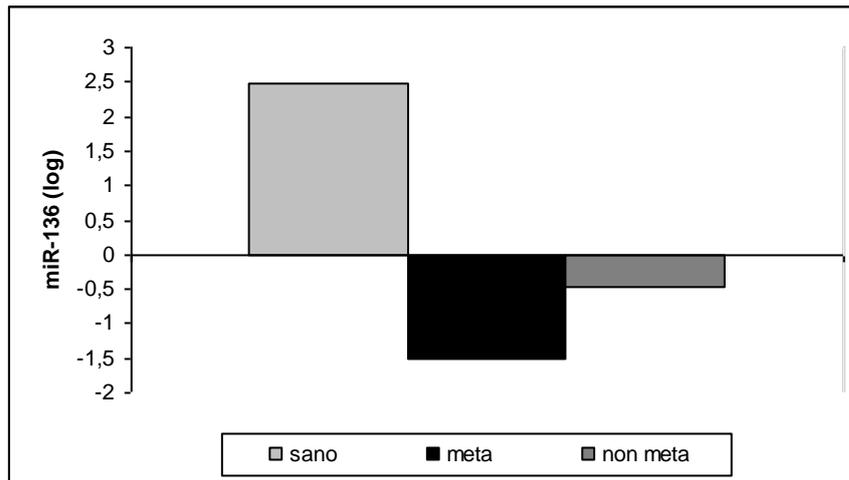
Successivamente si è passati alla validazione dell'espressione dei miRNA 513a-5p, let-7a, 934 presenti nei TCG metastatici e dei miRNA 136 e 1 espressi nei non metastatici. L'analisi effettuata sugli stessi 10 campioni (5 metastatici e 5 non metastatici) (Tabella 1) mediante la tecnica della RealTime PCR, con il metodo di quantificazione comparativo relativo del  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , ha confermato una differente espressione dei valori mediani dei miRNA nei 2 gruppi (Tabella 8).

		Median 2 <sup>-ΔΔCT</sup>	25°	75°	P
miR-1	MET	7,38	6,84	13,17	0.06
	Non MET	8,05	0,88	12,59	
miR-934	MET	0,46	0,44	3,84	0.06
	Non MET	1,14	0,13	1,46	
miR-513a-5p	MET	3,04	2,54	3,19	0.07
	Non MET	0,73	0,29	0,78	
miR-136	MET	0,03	0,02	0,09	<b>0.04</b>
	Non MET	0,35	0,29	0,64	
let7a*	MET	3,31	2,73	4,12	0.11
	Non MET	1,79	1,54	1,80	

Tabella 8 – Analisi mediante RealTime PCR, valori mediани dell'espressione dei miRNA, percentili e significatività mediante Mann Whitney. MET=pazienti metastatici; Non MET=pazienti non metastatici.

Il test non parametrico di Mann-Whitney ha evidenziato che il miR-136 è significativamente più espresso nei non metastatici rispetto ai metastatici (p=0.04). Sebbene gli altri miRNA non raggiungano la significatività statistica, forse a causa del ridotto numero di campioni, i dati confermano la tendenza ad una differente espressione tra i due gruppi.

Per meglio approfondire il ruolo del miR-136 nei TCG, la sua espressione è stata confrontata con un gruppo di 6 campioni di osso sano, utilizzato come controllo, proveniente da pazienti non oncologici. L'analisi di RealTime PCR ha evidenziato una maggiore espressione nel gruppo dei pazienti sani rispetto ai pazienti con TCG sia metastatico che non metastatico (297.89 vs 0.03 e 0.35 rispettivamente). Questa differenza è risultata essere significativa (Kruskal Wallis test; p=0.001) (Figura 7) suggerendo un coinvolgimento del miR-136 nella comparsa della malattia.



**Figura 7** - Espressione differenziale del miR-136 nei pazienti sani vs pazienti con TCG metastatico e non metastatico (confronto tra valori mediани di  $2^{-\Delta\Delta CT}$  trasformati in logaritmo).

#### **4.1.2 Predizione dei target del miR-136 mediante analisi bioinformatica**

L'identificazione dei geni target per il miR-136 è stata effettuata mediante il software TargetScan (<http://www.targetscan.org/>).

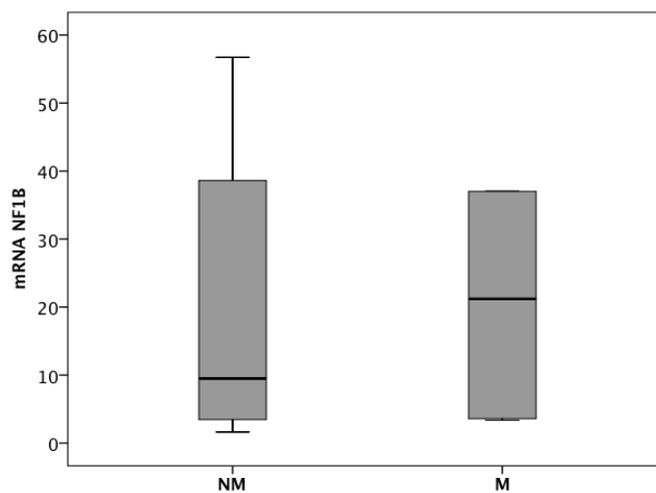
Il software ha elencato numerosi geni target del miR-136, ma la nostra attenzione si è concentrata su RANK, coinvolto con i meccanismi di reclutamento ed attivazione degli osteoclasti e di conseguente osteolisi e su NF1B, un fattore nucleare correlato con la trascrizione di geni strettamente legati all'adesione cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare, coinvolto quindi con una mancata regolazione della crescita e proliferazione cellulare.

#### **4.1.3 Espressione dei geni target mediante RealTime PCR**

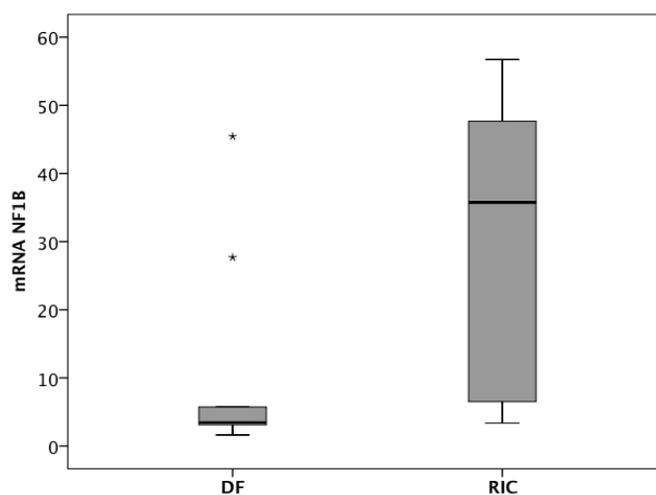
Abbiamo ampliato la casistica a 20 pazienti, di cui 6 provenienti da pazienti metastatici e 14 da pazienti non metastatici ed abbiamo confrontato i valori di espressione dei target tra i due gruppi di pazienti.

L'analisi dell'espressione genica del gene NF1B ha dimostrato una più alta espressione rispetto al calibratore con valori di  $2^{-\Delta\Delta CT}$  che variano da 1.63 a 122.45 con un valore mediano pari a 9.625. Il confronto dei valori mediани di

espressione tra il gruppo dei metastatici (M) con il gruppo dei non metastatici (NM) ha evidenziato un'espressione più alta nel primo gruppo rispetto al secondo (21.2 vs 9.49) (Figura 8). Suddividendo la casistica in pazienti ricaduti con metastasi e/o recidiva locale (RIC) e pazienti con sopravvivenza libera da eventi (DF) l'espressione del gene NF1B ha dimostrato valori più alti nel gruppo di pazienti ricaduti rispetto al gruppo dei liberi da malattia (35.75 vs 3.47) suggerendo un suo possibile ruolo nel promuovere il potenziale aggressivo di tale neoplasia (Figura 9).



**Figura 8** – Espressione dell'mRNA della proteina NF1B - Confronto tra non metastatici (NM) e metastatici (M) (valori mediani a confronto).



**Figura 9** – Espressione dell'mRNA della proteina NF1B - Confronto tra liberi da malattia (DF) e ricaduti (RIC) (valori mediani a confronto).

I livelli di espressione del gene RANK variano da 18.96 a 49495.17, con valore mediano pari a 3903.9; sebbene il gruppo dei metastatici (M) abbia dimostrato valori di espressione lievemente inferiori rispetto al gruppo dei non metastatici (NM) (3417.70 vs 3903.9) (Figura 10), quando vengono considerati anche i pazienti con ricaduta locale (RIC) i livelli di espressione di RANK sono maggiori rispetto al gruppo di pazienti con sopravvivenza libera da eventi (DF) (4269.94 vs 2998.45 rispettivamente) suggerendo un attivo coinvolgimento di RANK in meccanismi di aggressività locale piuttosto che sistemica (Figura 11).

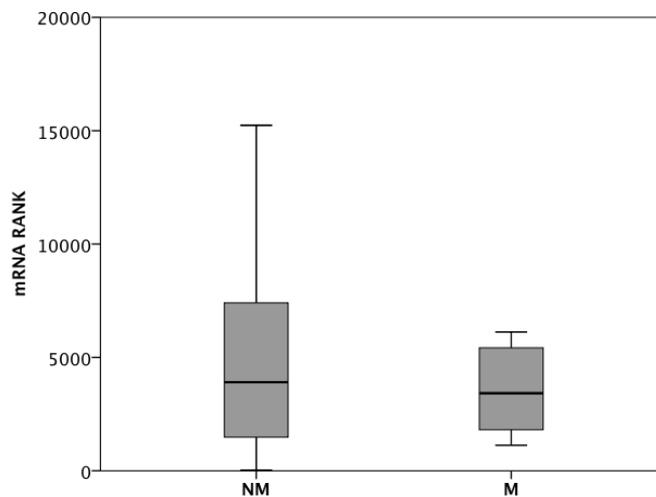


Figura 10 – Espressione dell’ mRNA della proteina RANK - Confronto tra non metastatici (NM) e metastatici (M) (valori mediani a confronto).

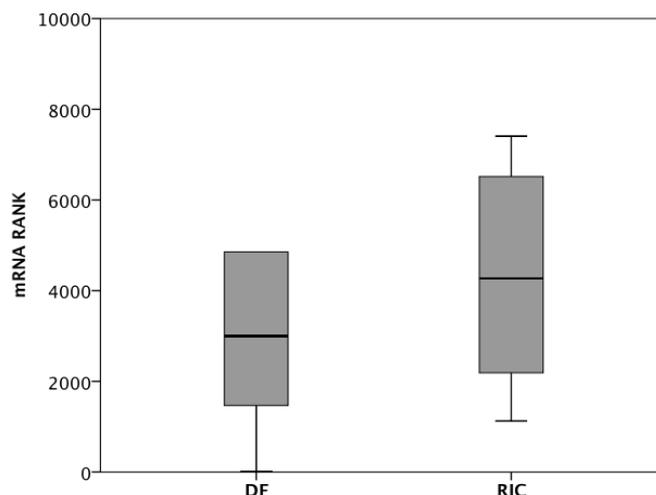


Figura 11 – Espressione dell’ mRNA della proteina RANK - Confronto tra liberi da malattia (DF) e ricaduti (RIC) (valori mediani a confronto).

#### 4.1.4 Analisi dell' espressione delle proteine target

E' stata effettuata l'analisi di Western Blot per valutare la presenza delle proteine RANK e NF1B nei 10 campioni (5 con sopravvivenza libera da eventi e 5 metastatici) precedentemente sottoposti all'analisi di array e in 5 campioni provenienti da pazienti non oncologici (Tabella 1). L'analisi densitometrica è stata effettuata con apposito software "Quantity one" (Bio-Rad), ha evidenziato una maggiore espressione di entrambe le proteine in tutti i campioni provenienti da pazienti metastatici rispetto ai non metastatici ed ai sani, nei quali le bande risultano appena visibili (Figura 12).

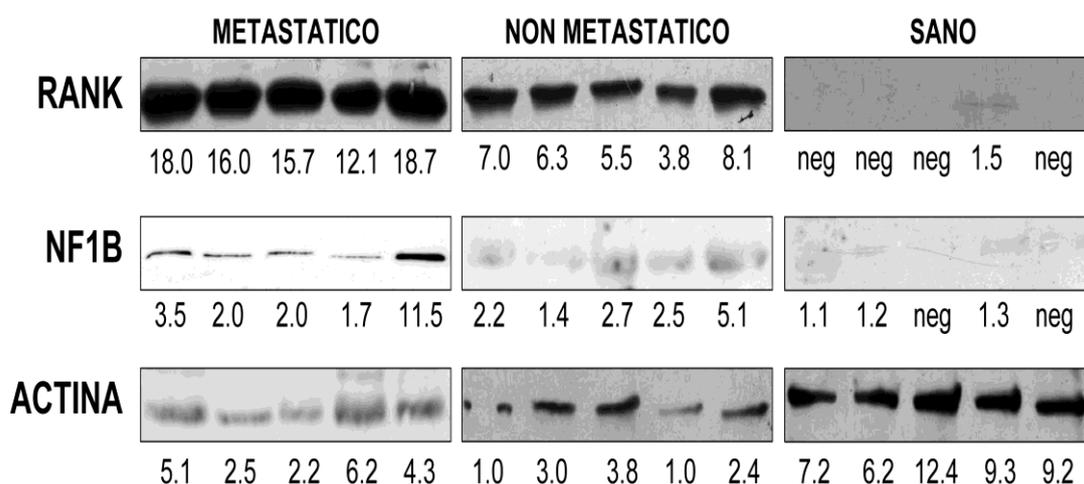


Figura 12 – Analisi di Western Blot con le proteine RANK e NF1B (Actina usata come controllo); sotto ciascuna banda è presente il valore di Adj. Vol. OD\*mm<sup>2</sup> rilevato dal densitometro.

## 4.2 Fase 2

### 4.2.1 Analisi di popolazione

La casistica comprende 163 pazienti affetti da TCG, di cui 76 di sesso maschile e 87 di sesso femminile; l'età varia da 5 a 76 anni con un valore mediano di 27 anni. 25 pazienti mostravano una localizzazione del tumore nelle ossa che

costituiscono il sistema assiale e 138 nelle ossa poste alle estremità. Il 50% dei pazienti mostrava un grading 3 e solo il 9% presentava un corredo cromosomico aneuploide (Tabella 9).

<b>Variabili</b>	<b>Numero di pazienti (%)</b>
<b>Sesso</b>	
Maschi	76 (47%)
Femmine	87 (53%)
<b>Età</b>	
< 35	104 (64%)
≥ 35	59 (36%)
<b>Localizzazione tumore</b>	
Assiale	25 (15%)
Estremità	138 (85%)
<b>Grading tumore</b>	
Grado 1	44 (27%)
Grado 2	38 (23%)
Grado 3	82 (50%)
<b>Ploidia</b>	
Aneuploide	13 (9%)
Diploide	150 (91%)
<b>Chirurgia</b>	
Curettage	79 (48%)
Resezione	84 (52%)

Tabella 9 – Caratteristiche cliniche della casistica.

Di 163 pazienti 33 sono ricaduti con metastasi polmonare durante il follow up, di questi 33 pazienti 25 presentavano anche recidiva locale, dimostrando che l'incidenza dell'evento metastatico è significativamente più frequente nei pazienti con pregressa recidiva rispetto ai pazienti liberi da malattia (Test di Fisher=16.740,  $p<0.0005$ ).

Dall'analisi statistica univariata della sopravvivenza secondo il modello di Kaplan Meier abbiamo dimostrato una significativa correlazione tra comparsa di metastasi e grado del tumore,

32 dei 33 pazienti metastatici presentavano uno stadio 3 di aggressività;

confrontando le curve di sopravvivenza libera da malattia è stato confermato il ruolo statisticamente significativo dello staging aggressivo nella comparsa di ricaduta a livello sistemico (Log Rank Test=31.668,  $p < 0.0005$ ) (Figura 13).

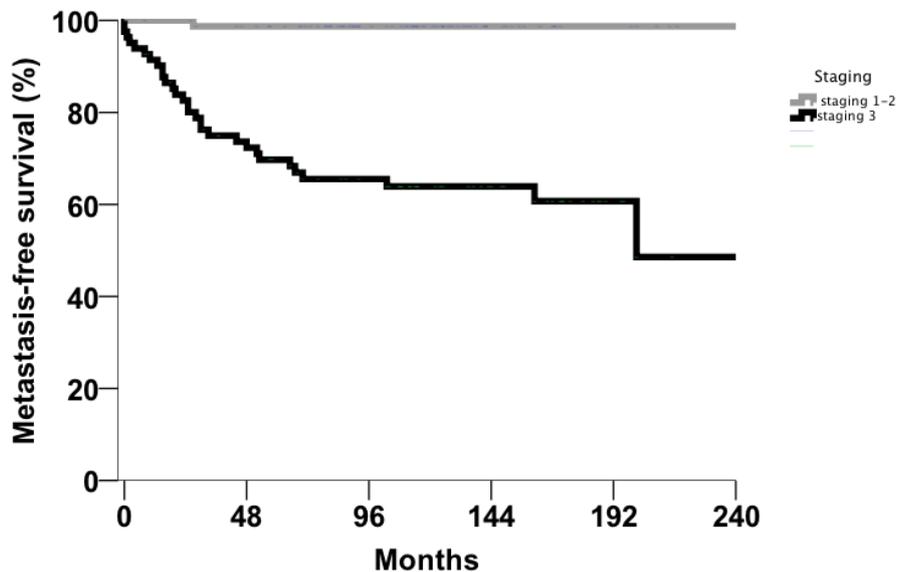


Figura 13 – Curva di sopravvivenza libera da metastasi in relazione allo staging del tumore (staging 1-2 = bassa aggressività; staging 3 = alta aggressività).

Localizzazione del tumore, chirurgia utilizzata, sesso, età e stato di ploidia sono risultati parametri non significativi in termini di sopravvivenza libera da malattia.

#### 4.2.2 Analisi di immunoistochimica su TMA

La validazione dell'impatto clinico di NF1B e RANK è stata effettuata mediante analisi di immunoistochimica su TMA, comprendente una popolazione di 163 pazienti affetti da TCG primitivo con caratteristiche cliniche e istopatologiche differenti; le caratteristiche di ciascun paziente sono riportate in tabella 4.

RANK ha mostrato una localizzazione esclusivamente a livello delle cellule giganti, sia a livello citoplasmatico che di membrana; NF1B ha una

distribuzione decisamente omogenea, localizzandosi sia a livello del nucleo che del citoplasma delle cellule giganti e delle cellule mononucleate.

Entrambe le proteine sono risultate essere maggiormente espresse nei campioni provenienti da pazienti ricaduti, in particolare nei pazienti metastatici (Figura 14).

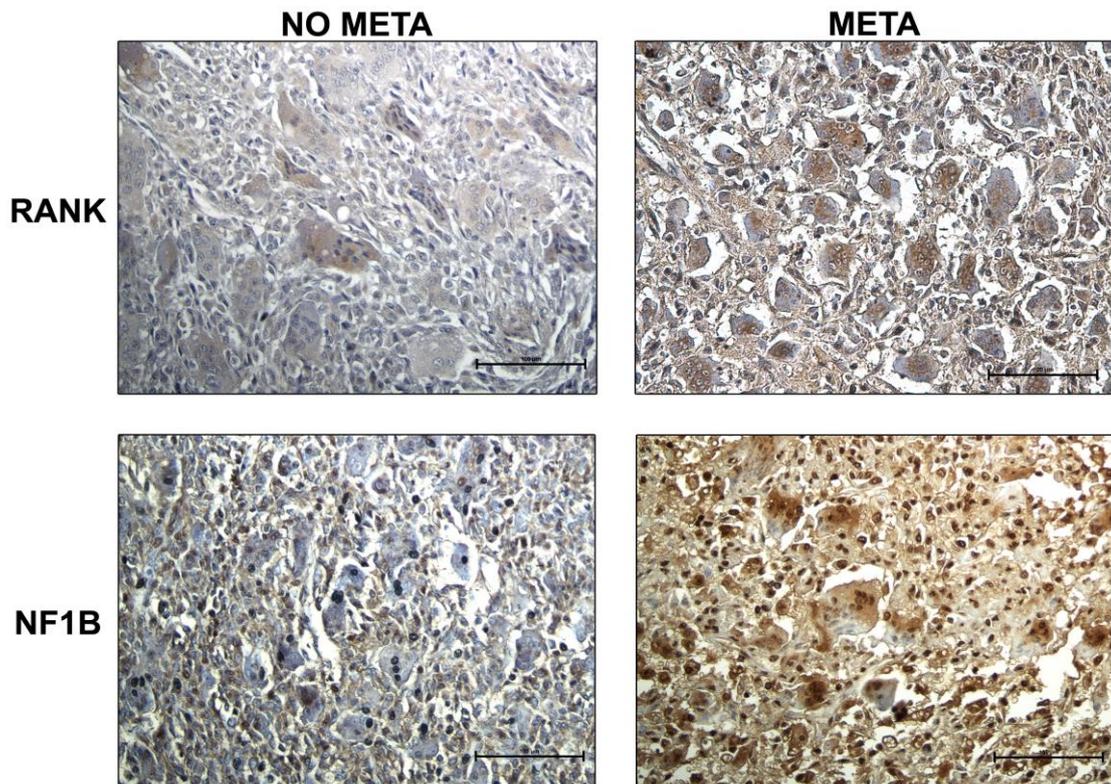


Figura 14 – Studio di immunoistochimica con gli anticorpi anti RANK e anti NF1B. Sezioni di pazienti con TCG non metastatico e metastatico.

Il 97% dei pazienti ricaduti con metastasi mostra un'over-espressione di RANK, mentre solo il 65% dei pazienti non metastatici è risultato positivo in termini di immunoreattività (Chi-quadrato di Fisher=13.3;  $p<0.0005$ ); considerando la casistica in termini di ricaduta locale l'83% dei pazienti con recidiva ha mostrato forte positività contro il 62% dei pazienti liberi da malattia (Chi-quadrato di Fisher=8.5;  $p=0.004$ ).

Le curve di sopravvivenza libera da metastasi (Figura 15 A) e da recidiva locale (Figura 15 B), mediante analisi di Kaplan Meier hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa (Log Rank test;  $p=0.001$  e  $p=0.008$  rispettivamente).

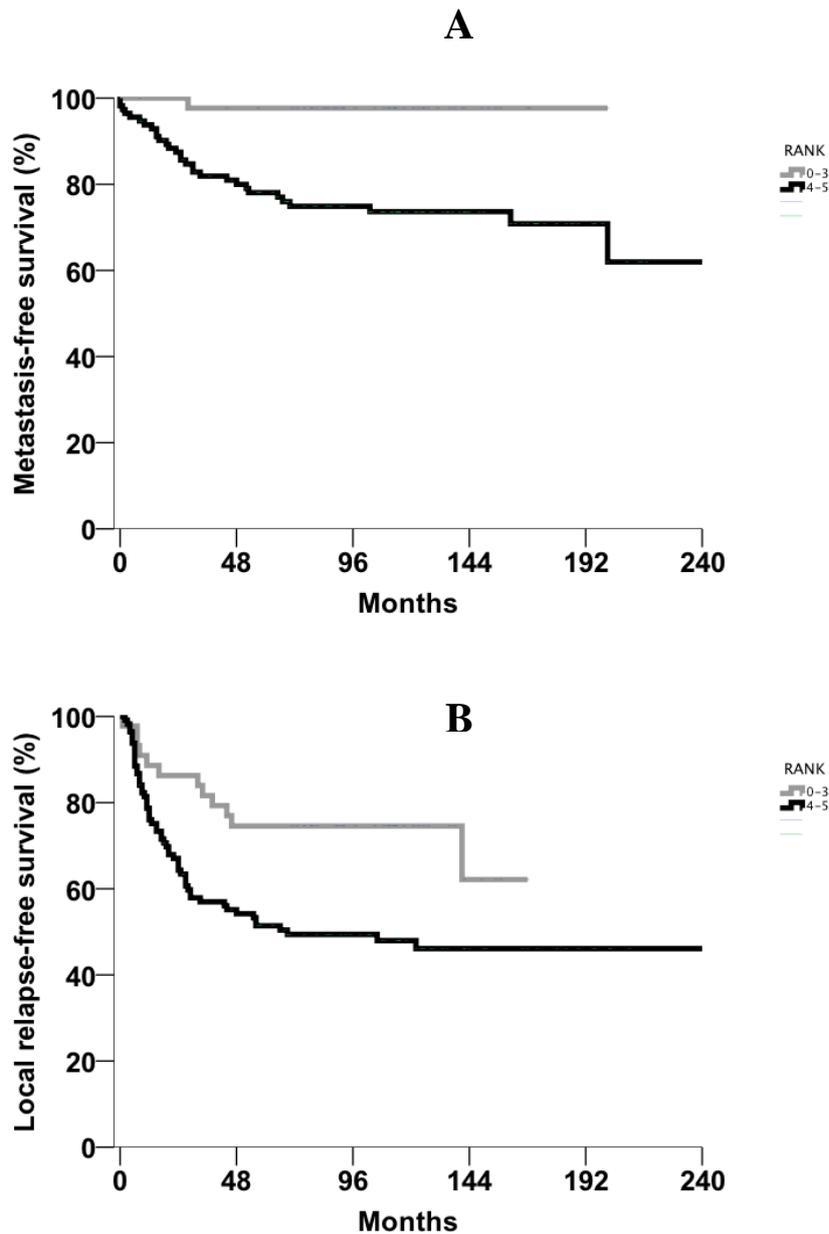


Figura 15 – Curva di sopravvivenza libera da metastasi (A) e da recidiva locale (B) in relazione all’immunoreattività di RANK. 0-3 indica una scarsa positività, considerata negativa; 4-5 indica una forte immunoreattività, considerata positiva.

Relativamente all’espressione di NF1B, il 100% dei pazienti ricaduti con metastasi ha mostrato intensa immunoreattività, e solo il 53% dei non metastatici ha mostrato positività nei confronti della proteina (Chi-quadrato di Fisher=24.4;  $p < 0.0005$ ). L’83% dei pazienti ricaduti localmente ha mostrato intensa immunoreattività contro il 62% dei pazienti liberi da malattia (Chi-quadrato di Fisher=23.8;  $p < 0.0005$ ).

Mediante analisi di Kaplan Meier abbiamo valutato la sopravvivenza libera da evento secondario ed è stato dimostrato che l’over-espressione della proteina

target NF1B risulta essere associata in modo significativo sia alla progressione metastatica (Log Rank test;  $p < 0.0005$ ) (Figura 16 A) che alla ricaduta locale (Log Rank test;  $p < 0.0005$ ) (Figura 16 B).

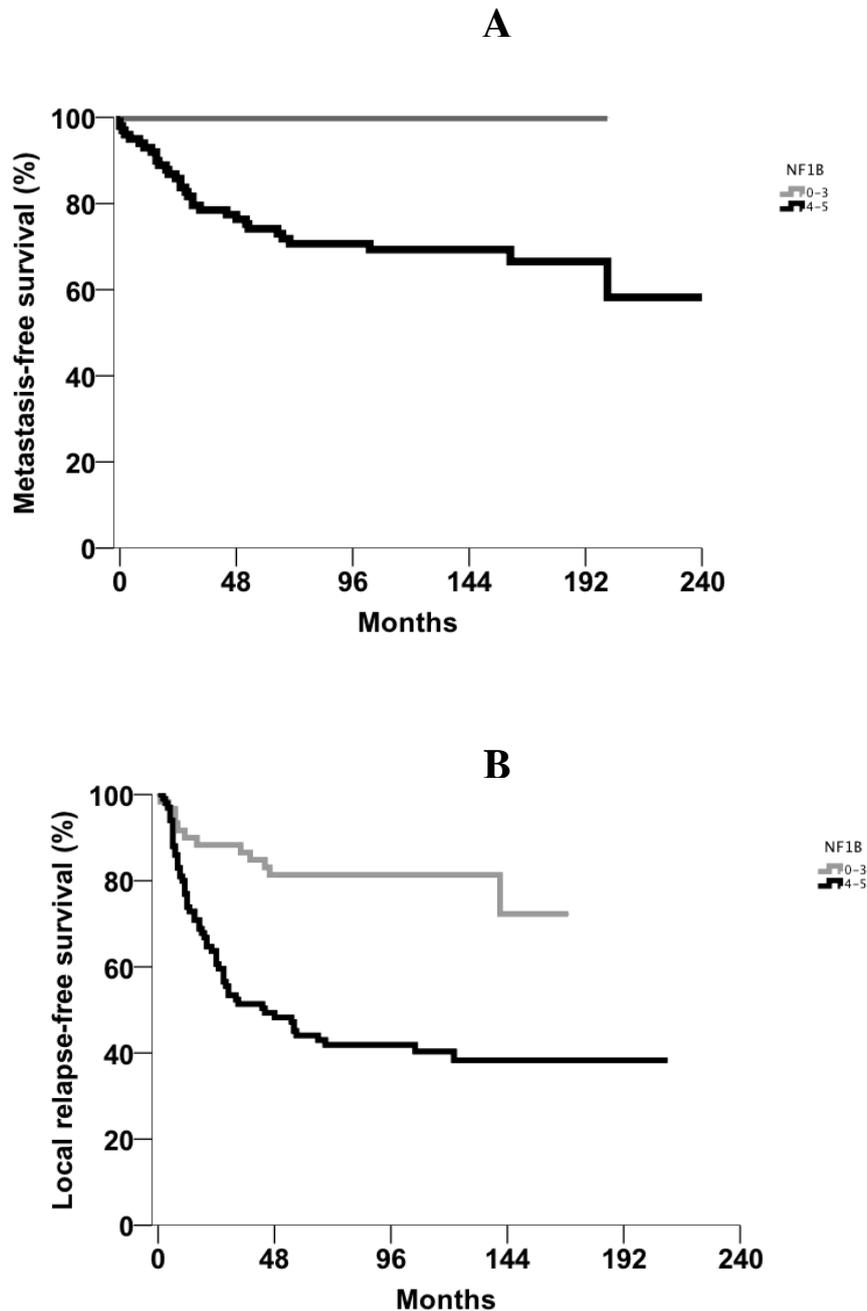


Figura 16 – Curva di sopravvivenza libera da metastasi (A) e da ricidiva locale (B) in relazione all’immunoreattività di NF1B. 0-3 indica una scarsa positività, considerata negativa; 4-5 indica una forte immunoreattività, considerata positiva.

Data la forte espressione di RANK, coinvolto nell’osteoclastogenesi e promotore del circolo vizioso e di NF1B legato alla trascrizione di proteine

coinvolte nell'adesione cellula-matrice extracellulare e all'espressione delle metalloproteasi, abbiamo voluto studiare l'espressione delle proteine strettamente correlate ad essi e note per partecipare al meccanismo di osteoclastogenesi, osteolisi e rimodellamento della matrice ossea ed extracellulare. I risultati espressi come percentuali di distribuzione di over-espressione tra gruppo di pazienti metastatici (M), non metastatici (NM), ricaduti con recidiva locale (RL) e liberi da malattia (DF) sono riassunti nella Tabella 10, è stato eseguito il Test di Fisher ed i valori di  $p \leq 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

<b>Proteina</b>	<b>M</b>	<b>NM</b>	<b>p</b>	<b>RL</b>	<b>DF</b>	<b>p</b>
RANKL	91%	54%	<0.0005	72%	54%	ns
Osteocalcin	87%	69%	ns	84%	64%	0.007
MMP-2	82%	57%	0.009	72%	53%	0.01
IL-6	81%	69%	ns	84%	62%	0.003
c-Fos	79%	54%	0.001	68%	52%	ns
MMP-9	66%	59%	ns	65%	57%	ns
CAII	80%	48%	0.002	57%	52%	ns
TRAF6	75%	63%	ns	72%	60%	ns
TGF- $\beta$	81%	60%	ns	61%	56%	ns
FN	83%	59%	ns	70%	59%	ns
IL-1 $\alpha$	84%	62%	ns	54%	35%	ns

Tabella 10 - Distribuzione dell'over-espressione (score 4-5) di molecole analizzate con immunistochemica su TMA nei diversi sottogruppi di TCG, M=metastatici, NM=non metastatici; RL=ricaduti localmente; DF=liberi da malattia.

RANKL ha una distribuzione piuttosto omogenea, appare localizzato nel citoplasma delle cellule mononucleate e sulla membrana delle cellule giganti; MMP-2 e MMP-9 hanno mostrato una localizzazione sia a livello citoplasmatico delle cellule giganti che di spazio extracellulare; c-Fos è localizzato sia a livello nucleare che citoplasmatico nelle cellule giganti e nelle cellule mononucleate; IL-6, IL-1 $\alpha$  e TGF- $\beta$  sono uniformemente distribuite nel citoplasma delle diverse popolazioni cellulari; le proteine CAII e TRAF6 si trovano esclusivamente nel citoplasma delle cellule giganti mentre

Osteocalcina e FN si trovano sia a livello del citoplasma delle cellule mononucleate che nello spazio extracellulare.

Abbiamo poi confrontato le curve di sopravvivenza libera da evento secondario (metastasi e recidiva locale) mediante il Log Rank Test in relazione all'espressione di ciascuna proteina, considerando positivi i valori di  $p < 0.05$  (Tabella 11):

Proteina	Sopravvivenza libera da metastasi		Sopravvivenza libera da recidiva locale	
	Log Rank	p	Log Rank	p
RANKL	16,0	<0,005	3,7	0,05
Osteocalcin	2,3	ns	5,5	0,02
MMP-2	4,6	0,033	4,4	0,037
IL-6	1,2	ns	7,9	0,005
c-Fos	4,9	0,028	3,6	ns
MMP-9	0,2	ns	1,4	ns
CAII	10,8	0,003	0,0	ns
TRAF6	1,0	ns	2,2	ns
TGF- $\beta$	2,7	ns	1,6	ns
FN	3,0	ns	1,4	Ns
Il-1 $\alpha$	2,1	ns	1,19	Ns

Tabella 11 – Valori di Chi-quadrato e p relativi all'analisi di sopravvivenza libera da metastasi e recidiva locale mediante analisi Log Rank secondo Kaplan-Meier.

La proteina MMP2 (Figura 17) appare essere significativamente legata sia alla comparsa dell'evento metastatico che alla comparsa della recidiva locale (Figura 18 A e B); RANKL, c-Fos e CAII (Figura 17) appaiono invece correlate esclusivamente alla comparsa delle metastasi (Figura 19 A, B e C), mentre Osteocalcin e IL-6 (Figura 17) sembrano essere collegate alla ricaduta in termini di recidiva locale (Figura 20 A e B).

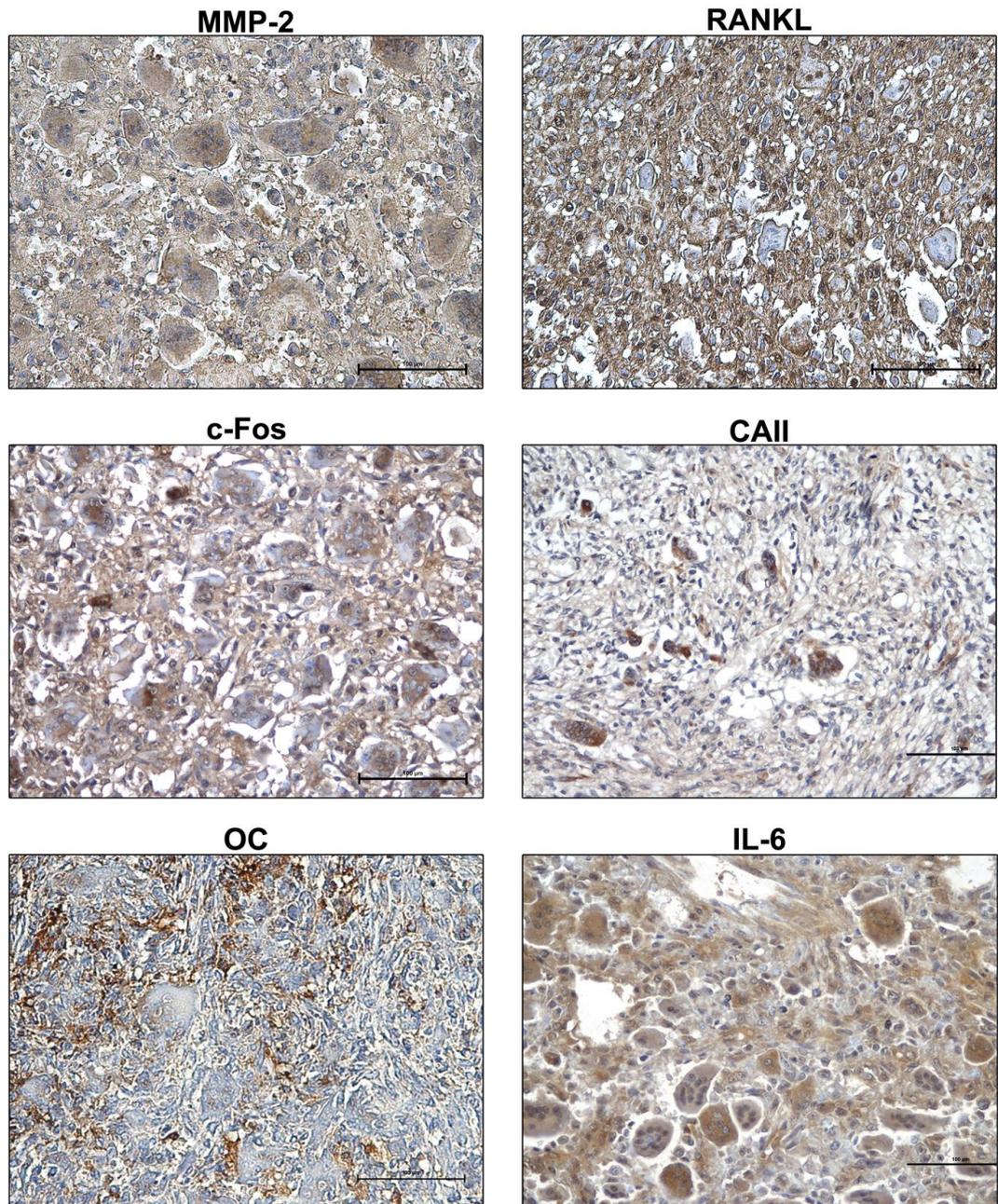
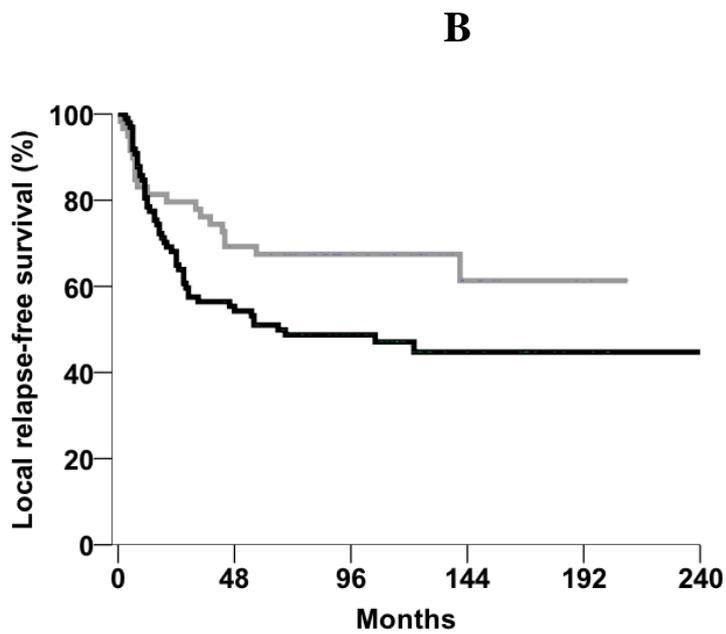
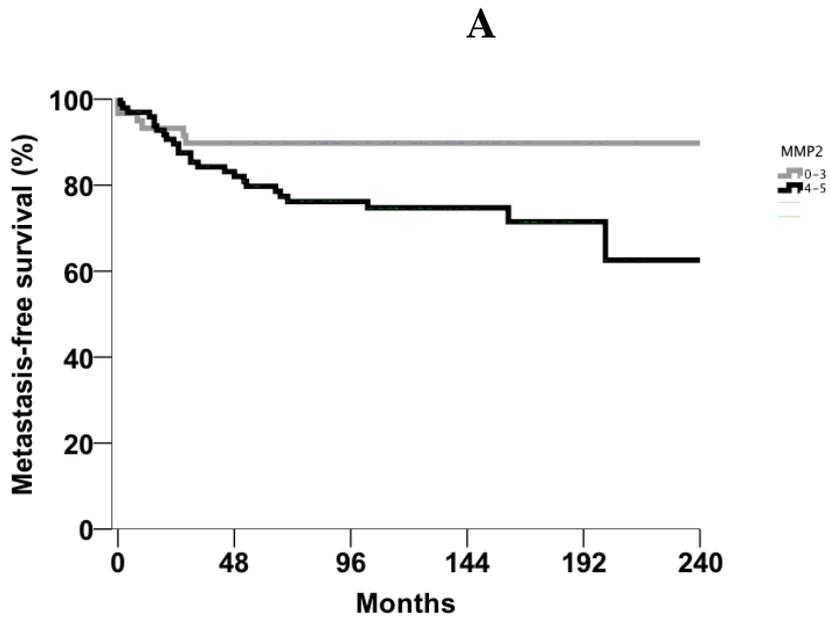


Figura 17 – Analisi di Immunoistochimica, sezioni di TCG con anticorpi: anti MMP-2, anti RANKL, anti c-Fos, anti CAII, anti Osteocalcin (OC) e anti IL-6.



**Figura 18** – Curva di sopravvivenza libera da metastasi (A) e recidiva locale (B) in relazione all'immunoreattività di MMP2. 0-3 indica una scarsa positività, considerata negativa; 4-5 indica una forte immunoreattività, considerata positiva.

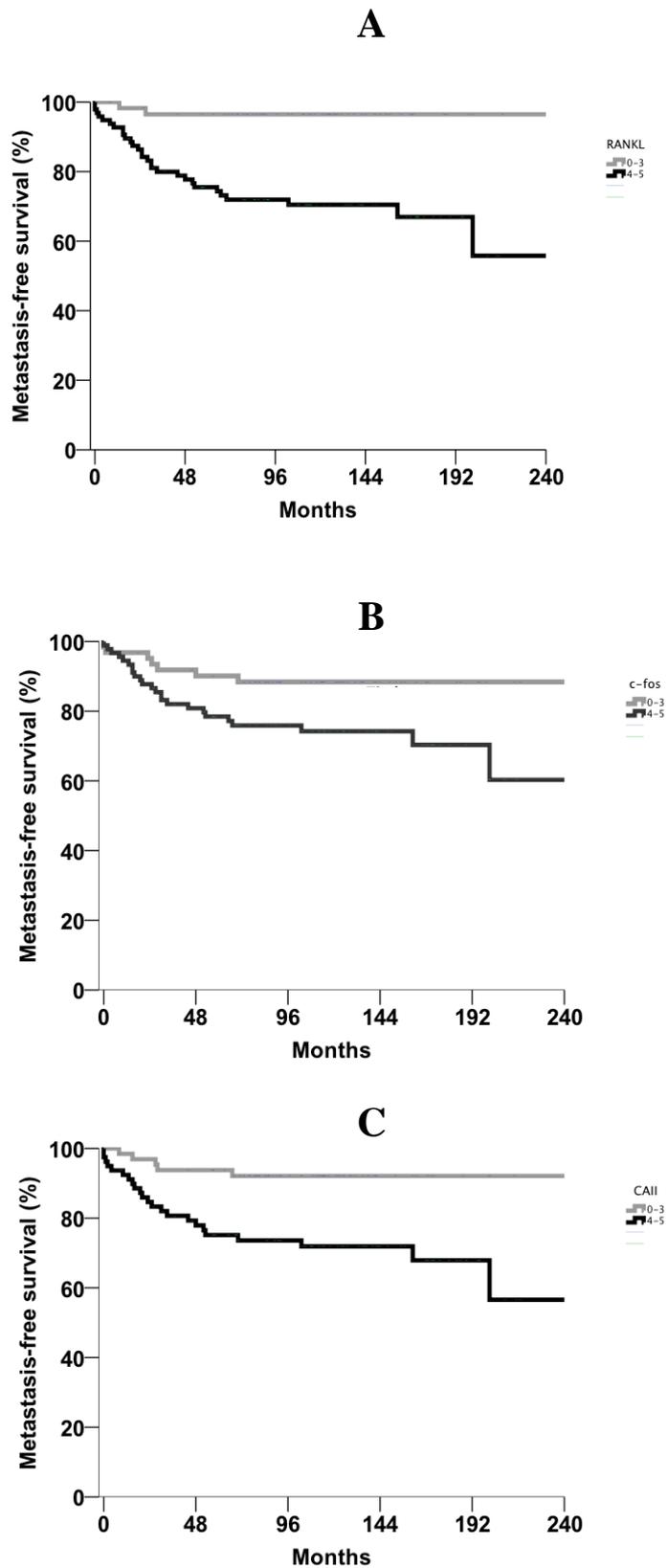


Figura 19 – Curva di sopravvivenza libera da metastasi in relazione all'immunoreattività di RANKL (A), c-Fos (B) e CAII (C). 0-3 indica una scarsa positività, considerata negativa; 4-5 indica una forte immunoreattività, considerata positiva.

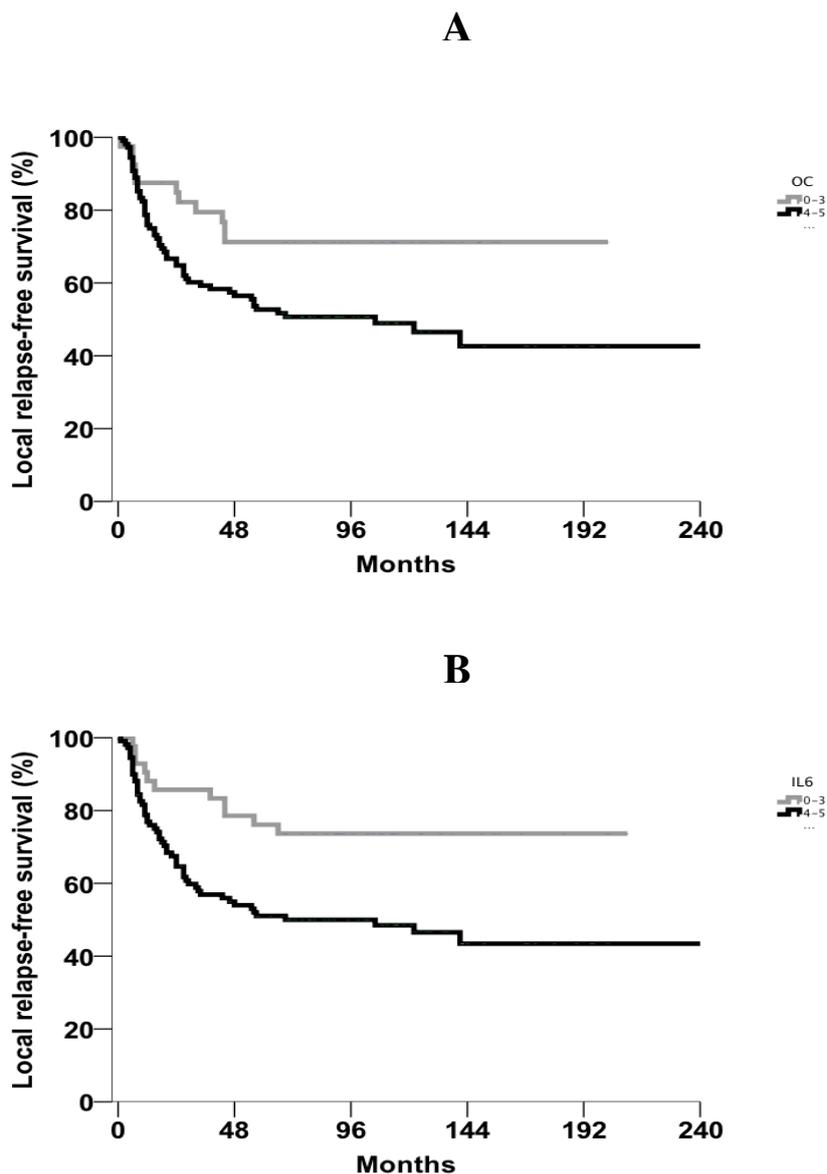


Figura 20 – Curva di sopravvivenza libera da recidiva locale in relazione all'immunoreattività di OC (Osteocalcin) (A) e IL-6 (B). 0-3 indica una scarsa positività, considerata negativa; 4-5 indica una forte immunoreattività, considerata positiva.

Abbiamo quindi effettuato un'analisi multivariata di Cox sui parametri risultati significativi all'analisi univariata (overespressione di NF1B, RANK, RANKL, MMP-2, C-Fos, CAII e stadio 3), i risultati sono mostrati nella tabella 12:

Variabili	EXP (B)	95,0% CI		p
	(Odds ratio)	Inferiore	Superiore	
<b>RANK</b>	0.264	0,06	1.158	0,08
<b>NF1B</b>	10227.9	0.000	1.302E+078	0.9
<b>RANKL</b>	0.741	0.361	1.523	0,415
<b>c-Fos</b>	1.122	0.609	2.068	0,7
<b>CAII</b>	1.608	0.759	3.407	0,2
<b>MMP-2</b>	1.274	0.622	2.609	0,5
<b>Stadio 3</b>	7.279	2.15	24.63	<b>0,001</b>

Tabella 12 – Analisi multivariata di Cox in relazione al rischio metastatico considerando i parametri risultati significativi all’analisi univariata.

L’unico parametro a risultare significativo è lo stadio 3; tuttavia, i valori di Odds Ratio e p relativi alla proteina NF1B, ed il fatto che nessuna proteina fosse risultata significativa nonostante l’alta significatività nell’analisi univariata, ci hanno suggerito la possibile presenza di correlazioni tra le proteine selezionate.

Poiché 32 dei 33 metastatici presentava espressione di NF1B associata a RANKL o associata a RANK e RANKL, abbiamo ipotizzato che esistesse una forte correlazione proprio tra questi 3 fattori che all’analisi univariata presentavano un alto grado di significatività ( $p < 0.001$ ), abbiamo quindi eseguito un test non parametrico misurando il coefficiente tau di Kendall (Tabella 13).

Proteina	Proteina	Coefficiente Tau	p
RANK	NF1B	0.799	<0.0005
RANK	RANKL	0.466	<0.0005
RANKL	NF1B	0.472	<0.0005

Tabella 13 – Risultati dell’analisi non parametrica del Tau di Kendall in merito a RANK, RANKL e NF1B.

I dati ottenuti confermano la presenza di una stretta correlazione tra RANK, RANKL e NF1B, in particolare tra RANK ed NF1B, abbiamo quindi studiato le possibili combinazioni in merito alla positività-negatività delle stesse ed abbiamo stimato i casi di metastatici ad esse associate. Abbiamo quindi suddiviso la popolazione in 3 gruppi, gruppo rischio zero, nel quale i pazienti mostrano positività verso al massimo una delle proteine selezionate, gruppo rischio 1, nel quale i pazienti mostrano positività verso almeno 2 proteine e gruppo rischio 2 nel quale i pazienti mostrano immunoreattività verso tutte le proteine.

Abbiamo eseguito uno studio statistico della sopravvivenza libera da metastasi secondo Kaplan Meier e stimato la differenza tra le curve mediante il Log Rank test (analisi dei confronti a coppie) stabilendo che i pazienti appartenenti al gruppo rischio 2 hanno una maggiore tendenza alla ricaduta con metastasi (Tabella 14 e figura 21).

Gruppi		Rischio 0		Rischio 1		Rischio 2	
		Chi-quadrato	Sig	Chi-quadrato	Sig	Chi-quadrato	Sig
<b>Log Rank (Mantel-Cox)</b>	<b>Rischio 0</b>	-	-	5,443	0,02	20,13	<0,0005
	<b>Rischio 1</b>	5,443	0,02	-	-	5,67	0,01
	<b>Rischio 2</b>	20,13	<0,0005	5,67	0,01	-	-

Tabella 14 –Analisi dei confronti a coppie secondo Kaplan Meier (Log Rank Test). Il gruppo rischio 0 rappresenta i pazienti che mostrano positività verso al massimo una delle proteine selezionate, il gruppo rischio 1 si riferisce ai pazienti che presentano positività verso almeno due proteine, il gruppo rischio 2 definisce i pazienti che mostrano positività verso tutte e 3 le proteine considerate.

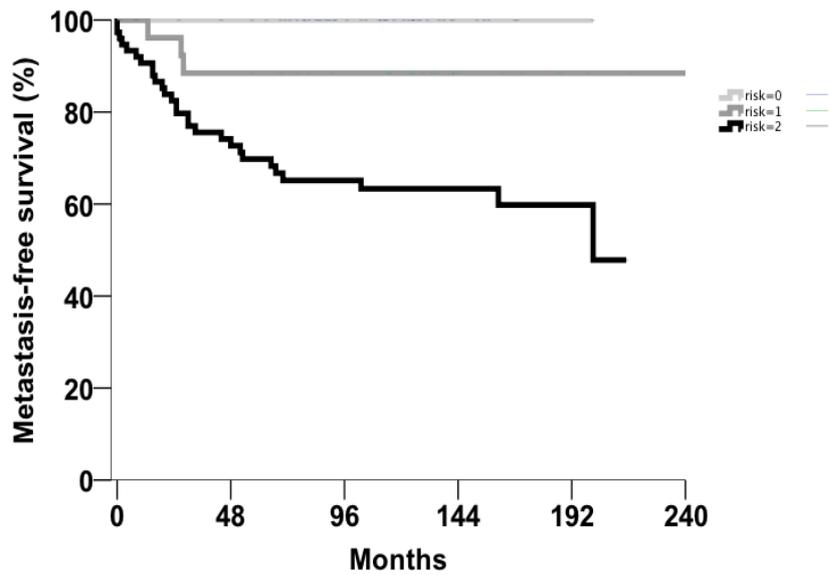


Figura 21 – Curva di sopravvivenza libera da metastasi nei diversi gruppi di popolazione: Rischio 0, Rischio 1 e Rischio2.

Specificità e sensibilità di questo modello prognostico sono state valutate mediante la curva ROC e l'area sottostante la curva (Figura 22 e tabella 15).

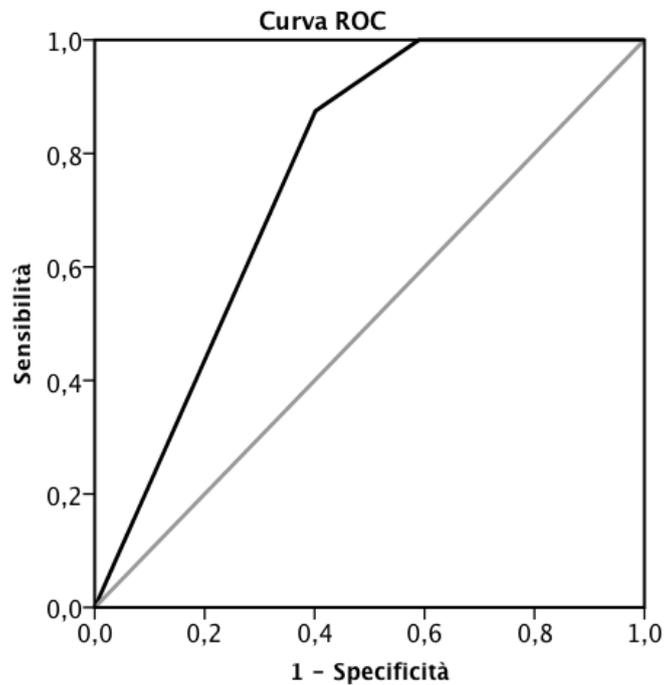


Figura 22 – Curva ROC, basata sul modello prognostico in base all'appartenenza del gruppo rischio 0, gruppo rischio 1 o gruppo rischio 2.

Area sotto la curva			Intervallo di confidenza al 95% asintotico	
Area	Errore standard	Sign. Asintotica	Limite inf.	Limite sup.
0.782	0.039	<0.0005	0.686	0.839

**Tabella 15** – Valori dell’area sotto la curva in riferimento alla curva ROC stimata in base al modello che prevede la popolazione suddivisa in 3 gruppi di rischio.

La curva suggerisce che il modello considerato è moderatamente accurato. utile quindi nell’individuare i soggetti a maggiore rischio di ricaduta metastatica; il modello indica quindi che una positività verso RANK, RANKL ed NF1B (pazienti appartenenti al gruppo rischio 2) sia un parametro altamente indicativo per una possibile ricaduta sistemica.

Abbiamo infine effettuato l’analisi multivariata di Cox con i parametri risultati significativi all’analisi univariata in merito alla ricaduta locale (NF1B, RANK, Osteocalcin, MMP-2, IL-6) e la proteina NF1B ha mostrato valori significativi, pertanto risulta non solo essere correlata ad un potenziale metastatico ma anche ad un’aggressività locale (Tabella 16).

Variabili	EXP (B)	95,0% CI		p
	(Odds ratio)	Inferiore	Superiore	
<b>NF1B</b>	3.57	1.91	6.66	<0.0005
<b>RANK</b>	0.207	0.26	1.67	0.14
<b>Osteocalcin</b>	1.445	0.66	3.14	0.35
<b>MMP-2</b>	3.67	0.83	16.2	0.08
<b>IL-6</b>	0.99	0.96	1.03	0.84

**Tabella 16** – Analisi multivariata di Cox in relazione alla ricaduta locale considerando i parametri risultati significativi all’analisi univariata.

I 26 pazienti in trattamento con anticorpo monoclonale anti-RANKL RANK sono tutti di grado 3, pertanto abbiamo voluto studiare il probabile impatto di un inibitore dell’osteoclastogenesi sui livelli di espressione delle proteine

maggiormente coinvolte in questo processo (RANK, RANKL, NF1B, c-Fos, MMP-2 e CAII). Abbiamo quindi valutato l'intensità e la distribuzione della espressione di queste proteine nelle biopsie prelevate prima della somministrazione del trattamento, e nei campioni chirurgici post-trattamento.

RANK risulta essere fortemente e uniformemente espresso nelle cellule giganti di tutte le 26 biopsie, ma diviene negativo nella totalità dei campioni post trattamento in quanto le cellule giganti scompaiono. La positività permane a livello della matrice ossea in neo-apposizione (Figura 23).

NF1B nel 100% delle biopsie risulta espresso diffusamente, sia nei nuclei che nel citoplasma delle cellule tumorali in crescita e delle cellule giganti in fase attiva; in tutti i 26 campioni post trattamento questa positività tende a rimanere focalizzata nei nuclei delle cellule mononucleate (Figura 23).

RANKL non mostra particolari differenze di espressione, in tutti i campioni pre-trattamento è diffusamente espresso, soprattutto localizzato nel citoplasma delle cellule mononucleate e negli spazi intracellulari che separano le popolazioni mononucleate dalle cellule giganti multinucleate; in tutti i campioni prelevati dopo il trattamento la positività si riduce in quanto una parte di popolazione (la popolazione di cellule tumorali) non è più presente e quindi viene secreta una minor quantità di RANKL (Figura 23).

MMP-2 e CAII presenti con forte positività in tutte e 26 le biopsie dimostrano una riduzione di espressione nella totalità dei campioni prelevati dopo il trattamento (Figura 23).

C-Fos fortemente espresso nelle 26 biopsie a livello delle cellule mononucleate e delle cellule giganti si riduce in tutte le sezioni chirurgiche dopo la somministrazione della terapia, in quanto non più presenti le cellule giganti (Figura 23).

Dato lo scarso numero dei pazienti e l'esiguità delle informazioni cliniche in nostro possesso, non è stato possibile effettuare analisi statistiche ma solo studi osservazionali e che forniscono una preliminare indicazione di quello che accade dopo l'interruzione di un meccanismo osteolitico patologico.

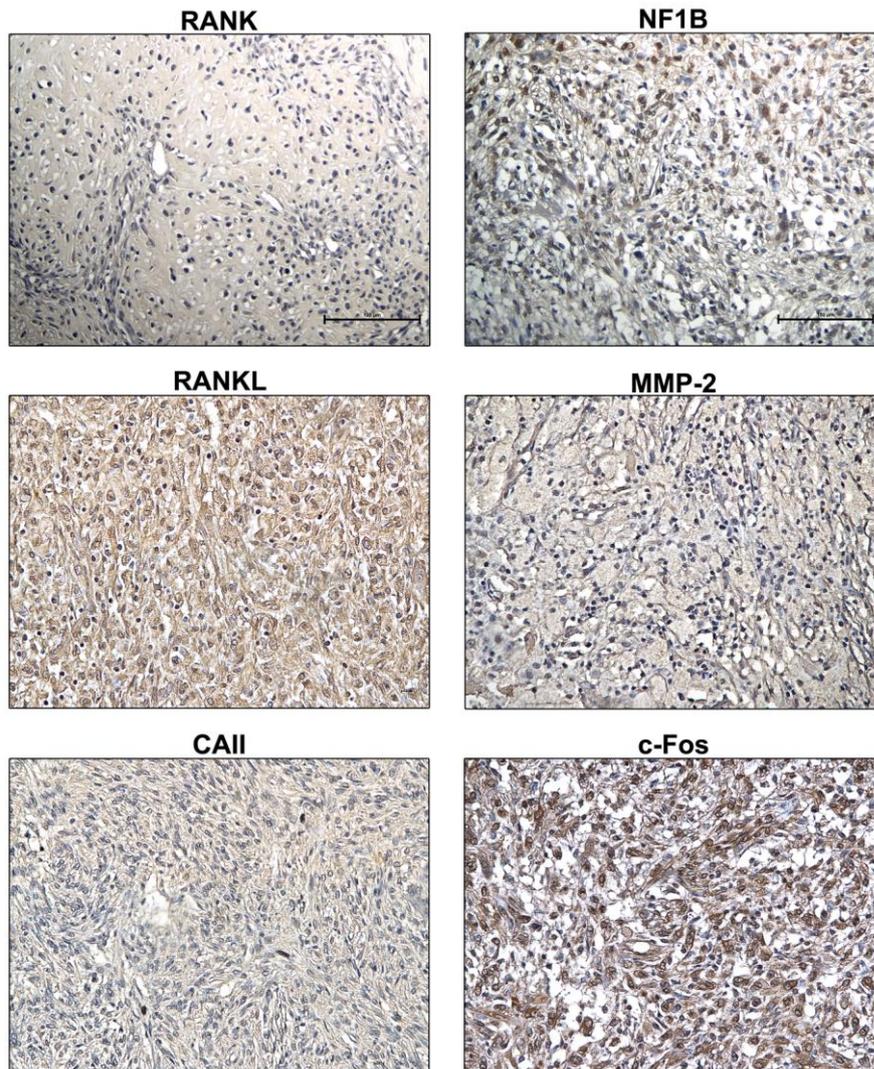


Figura 23 – Sezioni di tessuto di pazienti affetti da TCG dopo trattamento con anticorpo monoclonale.

## 5 - Discussione

In questo progetto è stata analizzata l'espressione di miRNA selezionati sulla base di studi effettuati nel Laboratorio di Oncologia Sperimentale dell'Istituto Ortopedico Rizzoli, in TCG a differente decorso clinico (localizzato, con recidiva locale, metastatico) al fine di validare il loro coinvolgimento non solo nella trasformazione neoplastica ma anche nella progressione della malattia a carattere prevalentemente benigno.

Il TCG è caratterizzato dalla presenza di cellule giganti polinucleate derivate dalla serie monocito/macrofagica [9], da una popolazione mononucleata di forma rotondeggiante e da una popolazione di cellule mononucleate di forma fusata che costituisce il pattern tumorale. La localizzazione prediletta dal TCG è la meta-epifisi delle ossa lunghe [2].

Da recenti studi è ormai accertato il coinvolgimento dei miRNA nei tessuti tumorali nei quali si osserva una loro espressione deregolata rispetto a pazienti sani e ciò comporta una variazione nella modulazione dei loro geni target i quali, per lo più, sono coinvolti in diversi pathway di segnalazione fondamentali per le cellule [84].

Abbiamo dapprima effettuato un'analisi mediante microRNA Array identificando miRNA differenzialmente espressi tra pazienti metastatici e pazienti liberi da malattia; la successiva validazione degli stessi mediante tecnica di RealTime PCR ha confermato una differente espressione dei miRNA in pazienti metastatici e pazienti liberi da malattia sebbene con differenze rispetto alla precedente analisi in termini quantitativi, forse a causa della differente sensibilità delle due tecniche.

Usando come normalizzatore il gene RNU44 e come calibratore un pool di linfociti sani, è stato calcolato il  $2^{-\Delta\Delta CT}$  dei miRNA selezionati rivelando una minore espressione del miR-1, miR-934 e miR-136 nei pazienti metastatici rispetto ai non metastatici, mentre un risultato opposto è stato ottenuto per il miR-513a-5p e per il let-7a.

Il miR-1 sembra essere coinvolto in numerose neoplasie tra cui il sarcoma endometriale [96] ed il rhabdomyosarcoma [97] che vedono una sua sottoregolazione rispetto al tessuto sano; questi risultati sono stati confermati anche da Novello C et al. negli osteosarcomi; approfondendo questo risultato è emersa la proprietà anti-proliferativa del miR-1 il quale induce un blocco a livello del check-point G1/S [98].

Il let-7a risulta essere altamente conservato in diverse specie ed il suo nome deriva dal fatto che larve mutanti per tale miRNA mostravano un fenotipo letale [99]. È considerato un soppressore tumorale e uno dei suoi ruoli è proprio la soppressione della proteina oncogenica RAS. Presenta anche altri target per lo più coinvolti nella differenziazione di alcune linee cellulari. Data l'attività che svolge non è dunque strano osservare una sua sottoregolazione in diversi tipi di tumore e, di conseguenza, un'espressione aumentata della proteina RAS [100].

Il miR-513a-5p invece mostra un'azione pro-apoptotica [101] e viene regolato dal TNF $\alpha$ ; per quanto riguarda il miR-934 non sono stati ancora scoperti i possibili ruoli.

Il miR-136 risulta essere overespresso nei tumori polmonari murini [102]. Uno dei suoi target è il soppressore tumorale PTEN [103] e ciò farebbe pensare ad un suo ruolo nello sviluppo e/o progressione tumorale; al contrario, nelle cellule di glioma umano potrebbe svolgere un'attività di soppressione del tumore inducendo un effetto pro-apoptotico andando a bersagliare due geni antiapoptotici quali AEG-1 e Bcl-2. In questo tumore il miR-136 risulta essere di fatto down-regolato e, di contro, si ha una overespressione di Bcl-2 la quale inibisce l'apoptosi [104].

Nel presente studio abbiamo posto la nostra attenzione proprio su quest'ultimo miRNA in quanto il test non parametrico di Mann-Whitney, eseguito sui dati ottenuti mediante RealTime PCR tra il gruppo metastatico e quello non metastatico, ha evidenziato una differenza statisticamente significativa ( $p=0.04$ ) (Tabella 8). È comunque da sottolineare che anche il miR-1, il miR-934 e il miR-513a-5p presentano differenze importanti di espressione tra i due gruppi, anche se non raggiungono la significatività statistica a causa della rarità

dei casi metastatici (3-5% del totale), in un tumore ad aggressività prevalentemente locale come il TCG.

Per meglio approfondire il ruolo del miR-136, la sua espressione è stata confrontata con un gruppo di 6 campioni di osso normale, proveniente da pazienti non oncologici. L'analisi di RealTime PCR ha evidenziato una maggiore espressione nel gruppo dei pazienti sani rispetto ai pazienti con TCG sia metastatico che non metastatico e questa differenza è risultata essere significativa (Kruskal Wallis test;  $p=0.001$ ) suggerendo un suo coinvolgimento nella comparsa della malattia. Mediante l'utilizzo di un software bioinformatico quale TargetScan, e grazie a precedenti studi svolti nel laboratorio di Oncologia Sperimentale riguardante il profilo di espressione genica in pazienti affetti da TCG a diverso decorso clinico [105-107], abbiamo individuato due target del miR-136: l'NF1B ed il RANK. Il ruolo di NF1B nello sviluppo e nella progressione di vari tumori è stato trattato in vari studi. Risulta essere un target per il tumore al seno negativo verso il recettore degli estrogeni [108]. Questa proteina regola la vitalità e proliferazione cellulare durante la trasformazione tumorale e funziona da oncogene nel carcinoma polmonare a piccole cellule (SCLC) [109]. Una sua maggiore espressione è frequentemente rilevata nelle metastasi dell'SLCL presenti nei linfonodi e nel fegato nel modello murino. Il silenziamento del gene NF1B nel cancro al seno riduce la proliferazione cellulare ed esalta la via di segnalazione apoptotica dimostrando così il ruolo di tale proteina nello sviluppo e progressione di questo tipo di tumore [108].

RANK appartiene alla famiglia dei Tumor Necrosis Factor (TNF) ed è coinvolto nei processi di osteoclastogenesi; una volta che viene legato dal suo unico ligando, RANKL, permette l'attivazione e la maturazione degli osteoclasti con conseguente erosione della matrice extracellulare. Quest'ultima, in risposta alla lesione, rilascia fattori quali interleuchine, in particolare modo l'IL-1 $\alpha$  e l'IL-6 [69], e fattori di crescita tra i quali il TGF- $\beta$  [70] che a loro volta stimolano la differenziazione degli osteoblasti i quali producono RANKL. In tal modo si ha un'amplificazione dell'attivazione di RANK. Nel tessuto sano questa via di distruzione ossea fa parte del normale turnover dove viene bilanciata dal pathway mediato da OPG che legandosi a RANKL ne

impedisce il legame con RANK. Nei pazienti affetti da TCG le cellule stromali sovraesprimono RANKL alterando il normale equilibrio RANKL/RANK/OPG con conseguente aumento del riassorbimento osseo che si traduce in una marcata osteolisi che è tipica di questo tumore.

Dato il coinvolgimento delle proteine RANK ed NF1B in diverse neoplasie abbiamo studiato i livelli di espressione delle stesse sia a livello di trascritto primario (mRNA) che a livello proteico ampliando la casistica che comprende pazienti con ricaduta metastatica e/o locale e pazienti con sopravvivenza libera da eventi secondari.

Nonostante l'Istituto Ortopedico Rizzoli disponga di una delle più ampie casistiche di TCG metastatici a livello mondiale il numero di pazienti che presenta metastasi è logicamente molto ridotto. Abbiamo eseguito una validazione di questi target del miR-136 mediante RealTime PCR su 6 campioni di tessuto metastatico e 14 non metastatici (tabella 1).

L'analisi dell'espressione del gene NF1B ha dimostrato in tutti i casi studiati aumentati valori rispetto al calibratore e una più alta espressione nei pazienti ricaduti, con metastasi e/o con recidiva locale, rispetto ai pazienti con sopravvivenza libera da eventi. Questo dato conferma non solo NF1B come target di miR-136 ma anche il suo probabile ruolo nel promuovere il potenziale aggressivo del TCG.

RANK presenta una marcata overespressione in tutti i campioni tumorali analizzati con valori molto alti rispetto al valore del calibratore. Quando abbiamo suddiviso i pazienti in base al decorso della malattia abbiamo dimostrato che i pazienti con recidiva locale presentano livelli di RANK più alti rispetto ai pazienti liberi da eventi, mentre i pazienti metastatici hanno valori lievemente inferiori rispetto a quelli non metastatici. Questo potrebbe far pensare che RANK abbia un maggior coinvolgimento nei meccanismi di aggressività locale che non nello sviluppo di metastasi polmonari.

Tuttavia quando è stata valutata l'espressione dei loro prodotti proteici, mediante analisi di Western Blot sui 10 campioni di partenza (5 metastatici e 5 non metastatici) e su 5 campioni di osso provenienti da pazienti non oncologici, non solo entrambe le proteine RANK e NF1B sono risultate maggiormente espresse nei pazienti con TCG rispetto ai sani, ma anche nei

metastatici rispetto ai non metastatici, confermando quindi i risultati ottenuti con la RealTime PCR.

Il miR-136, maggiormente espresso nei sani avrebbe dunque un ruolo nel ridurre l'espressione e la funzione dei prodotti proteici dei geni target, al contrario, la maggiore espressione di RANK e NF1B nei pazienti metastatici conferma quindi il loro coinvolgimento nella progressione della malattia.

Per verificare il possibile ruolo prognostico di queste proteine target è stata eseguita un'analisi di immunoistochimica su Tissue Microarray (TMA) ampliando così la casistica a 163 pazienti. Sfruttando tale tecnica è stato possibile visionare una serie di proteine strettamente associate a RANK e a NF1B che hanno un ruolo fondamentale nei pathway di segnalazione in cui sono coinvolte. In particolare, RANKL rappresenta il ligando di RANK e il loro legame attiva TRAF6 [55] che a sua volta, mediante l'attivazione di diverse vie di segnalazione, innesca il processo di osteoclastogenesi [66]. La distruzione della matrice ossea mediata dall'attività di MMP-2, MMP-9 [40] e CAII [110] porta alla liberazione di molecole solubili quali IL-6 e Osteocalcina che alterano ulteriormente il rimodellamento osseo.

Nel presente lavoro RANK, NF1B e MMP-2 risultano essere più frequentemente espresse nei pazienti ricaduti sia con metastasi polmonare che con recidiva locale rispetto a coloro che sono liberi da eventi e quindi sembrano avere un ruolo prognostico nella aggressività tumorale sia locale che sistemica; RANKL, c-Fos e CAII risultano maggiormente associati alla comparsa dell'evento metastatico mentre la frequenza di espressione di IL-6 e OC è significativamente maggiore nei pazienti con recidive locali rispetto ai non ricaduti piuttosto che nei metastatici rispetto ai non metastatici, limitando un potenziale ruolo prognostico alle recidive locali. Le altre proteine studiate, seppur frequentemente espresse nei tessuti provenienti dai pazienti ricaduti sia con recidiva locale che con metastasi, non sembrano avere ruoli decisivi nella progressione metastatica o nella comparsa di recidive locali.

Attraverso l'analisi multivariata di Cox non è stato possibile stabilire un modello prognostico utile a predire la comparsa delle metastasi poiché risultava significativo solo lo stadio 3 del tumore. Tuttavia l'alta significatività dimostrata da RANK, NF1B e RANKL nell'analisi univariata ci ha suggerito

una loro possibile stretta correlazione che abbiamo dimostrato calcolando il coefficiente Tau di Kendall (RANK vs RANKL tau = 0.466; RANK vs NF1B tau = 0.799; RANKL vs NF1B tau = 0.472).

Poiché l'84% dei pazienti metastatici dimostra avere forte positività verso tutte le 3 proteine e il 58% verso almeno 2 di esse, abbiamo stimato una differenza di sopravvivenza libera da ricaduta in termini di metastasi con analisi di Kaplan Meier e Log Rank che è risultata significativa, dimostrando una peggiore prognosi per i pazienti che mostrano over-espressione verso RANK, RANKL ed NF1B. Questo modello prognostico, è stato confermato mediante la curva di ROC (Area: 0.782; 95% CI = 0.686 – 0.839;  $p < 0.0005$ ), ed indica che i pazienti positivi per le 3 proteine hanno una minor sopravvivenza libera da metastasi.

NF1B risulta essere l'unica proteina significativa all'analisi multivariata di Cox in grado di predire anche una possibile ricaduta locale, confermando un suo ruolo centrale nell'aggressività del tumore.

RANK, NF1B, MMP-2, c-Fos e CAII sono state studiate, in termini di espressione proteica, su una serie di campioni ottenuti da 26 pazienti in trattamento con un anticorpo monoclonale anti-osteolitico; le proteine sono state valutate nel tessuto bioptico, prelevato prima della somministrazione del trattamento, e nei campioni chirurgici degli stessi pazienti dopo un periodo di trattamento. L'anticorpo monoclonale in questione è in grado di ridurre massivamente la presenza delle cellule giganti, infatti proteine recettoriali peculiari della superficie delle cellule giganti come RANK, o proteine che si trovano solo nel citoplasma delle stesse cellule come CAII e MMP-2 divengono negative nei campioni prelevati dopo la somministrazione del trattamento. NF1B e c-fos, uniformemente presenti nel nucleo e nel citoplasma delle cellule mononucleate e giganti, dopo la terapia permangono nel nucleo delle cellule mononucleate. Al contrario RANKL non dimostra avere evidenti cambiamenti di espressione.

Questi risultati potrebbero essere estremamente utili al clinico per definire una potenziale prognosi di ricaduta locale e metastatica del paziente con TCG, sembrano inoltre essere utili come marcatori di andamento terapeutico.

## 6 - Bibliografia

- [1] Jaffe HL, Lichtenstein L, Portis RB. **Giant cell tumor of bone. His pathologic appearance, grading, supposed variants and treatment.** Archives of Pathology, 1940; 30: 993-1031
- [2] Campanacci M. **Bone and soft tissue tumors.** II edizione, Nuova libreria Piccin, Padova, 1999.
- [3] Department of Musculo-Skeletal Oncology I.O.R. Bologna. **Syllabus. Atlas of musculos-skeletal pathology course.**
- [4] Masui F, Ushigome S, Fujii K. **Giant cell tumor of bone: a clinicopathologic study of prognostic factor.** Pathol Int. 1998 Sep;48(9):723-9
- [5] Turcotte RE, Wunder JS, Isler MH, Bell RS, Schachar N, Masri BA, Moreasu G, Davis AM. **Giant cell tumor of long bone: a Canadian Sarcoma Group Study.** Clin Orthop Relat Res. 2002 Apr;(397):248-58
- [6] Campanacci M, Bagnara G, Serra M, et al. **Giant cell tumor of bone: a model for the in vitro human osteoclast characterization.** Tumori. 1989 Aug 31;75(4):389-95
- [7] Prando A, de Santos LA, Wallace S, Murray JA. **Angiography in giant cell bone tumors.** Radiology. 1979 Feb;130(2):323-31
- [8] Goldring SR, Roelke MS, Petrisson KK, Bhan AK. **Human Giant Cell Tumors of Bone, Identification and Characterization of Cell Types.** J Clin Invest. 1987 Feb;79(2):483-91
- [9] Burmester GR, Winchester RJ, Dimitriu-Bona A, Klein M, Steiner G, Sissons HA. **Delineation of four cell types comprising the giant cell tumor of bone: Expression of Ia and monocyte-macrophage lineage antigens.** J Clin Invest. 1983 Jun;71(6):1633-48
- [10] Krober SM, Greschniok A, Bohm P, Kaiserling E. **Giant cell tumor of bone. Morphological, immunoistochemical, morphometric and DNA flow cytometry findings.** Verh Dtsch Ges Pathol. 1998;82:279-83
- [11] Werner M. **Giant cell tumor of bone: morphological, biological and histogenetical aspects.** Int Orthop. 2006 Dec;30(6):484-9
- [12] Johnston J. **Giant tumor of bone. The role of giant cell in orthopaedic pathology.** Orthop Clin North Am. 1977 Oct;8(4):751-70
- [13] Burger EH, Van der Meer JW, Van de Gevel JS, Gribnau JC, Thesingh GW, Van Furth R. **In vitro formation of osteoclasts from long-term cultures of bone marrow mononuclear phagocytes.** J Exp Med. 1982 Dec 1;156(6):1604-14
- [14] Horton MA, Lewis D, McNulty K, Pringle JAS, Chambers TJ. **Monoclonal Antibodies to Osteoclastomas (Giant Cell Bone Tumors): Definition of Osteoclast-specific Cellular Antigens.** Cancer Res. 1985 Nov;45(11 Pt 2):5663-9

- [15] Horton MA, Lewis D, Rimmer EF, Pringle JAS, Fuller K. **Human fetal osteoclast fail to express macrophage antigens.** Br J Exp Pathol. 1985 Feb;66(1):103-8
- [16] Chambers TJ, Magnus CJ. **Calcitonin alter behaviour of isolated osteoclast.** J Pathol. 1982 Jan;136(1):27-39
- [17] Chambers TJ. **Cell Surface characterization of the human osteoclast: phenotypic relationship to other bone marrow-derived cell types.** J Pathol. 1984 Dec;144(4):281-94
- [18] Chambers TJ, Fuller K, Darby JA, Pringle JAS, Horton MA. **Monoclonal Antibodies against osteoclasts inhibit bone resorption in vitro.** Bone Miner. 1986 Apr;1(2):127-35
- [19] Chambers TJ, Fuller K, McSheehy PML, Pringle JAS. **The effects of calcium regulatig hormones on bone resorption by isolated human osteoclastoma cells.** J Pathol. 1985 Apr;145(4):297-305
- [20] Chambers TJ, Horton MA. **Failure of cells of the mononuclear phagocyte series to resorb bone.** Calcif Tissue Int. 1984 Sep;36(5):556-8
- [21] Chambers TJ, Nevell PA, Fuller K, Athanasou NA. **Resorption of bone by isolated rabbit osteoclast.** J Cell Sci. 1984 Mar;66:383-99
- [22] Pollanen J, Saksela O, Salonen, et al. **Distinct localizations of urokinase and tissue type plasminogen activator and its type 1 inhibitor under cultured human fibroblast and sarcoma cells.** J Cell Biol. 1987 Apr;104(4):1085-96
- [23] Kwaan II. **The plasminogen-plasmin system in malignancy.** Cancer Metastasis Rev. 1992 Nov;11(3-4):291-311
- [24] Cheng YY, Huang L, Kumta SM, Lee KM, Lay FM, Tam JS. **Cytochemical and ultrastructural changes in the osteoclast-like giant cells of giant tumor of bone following bisphosfonate administration.** Ultrastruct Pathol. 2003 Nov-Dec;27(6):385-91
- [25] Cheng YY, Huang L, Lee KM, Xu J, Zheng MH, Kumta SM. **Bisphosfonates induce apoptosis of stromal tumor cells in giant cell tumor of bone.** Calcif Tissue Int. 2004 Jul;75(1):71-7
- [26] Campanacci M. **Bone and soft tissue tumors: clinical features, imaging, pathology and treatment.** 2<sup>nd</sup> ed. Piccin nuova libreria Padova, 1999.
- [27] Guise TA, Mundy GR. **Cancer and bone.** Endocr Rev. 1998 Feb;19(1):18-54
- [28] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Than HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. **Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density.** Cell. 1997 Apr 18;89(2):309-19
- [29] Kobayashi Y, Udagawa N, Takahashi N. **Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis.** Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2009;19(1):61-72

- [30] Wittrant Y, Theoleyre S, Chipoy C, Padrines M, Blanchard F, Heymann D, Redini F. **RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumors and associated osteolysis.** *Biochim Biophys Acta.* 2004 Sep 20;1704(2):49-57
- [31] Smith LT, Mayerson J, Nowak NJ, Suster D, Mohammed N, Long S, Auer H, Jones S, McKeegan C, Young G, Bos G, Plass C, Morrison C. **20q11.1 amplification in giant-cell tumor of bone: Array CGH, FISH, and association with outcome.** *Genes Chromosomes Cancer.* 2006 Oct;45(10):957-66
- [32] Bridge JA, Neff JR, Bhatia PS, Sanger WG, Murphey MD. **Cytogenetic findings and biologic behaviour of giant cell tumors of bone.** *Cancer.* 1990 Jun 15;65(12):2697-703
- [33] Gorunova L, Vult von Steyern F, Storlazzi CT, Bjerkehagen B, Follerås G, Heim S, Mandahl N, Mertens F. **Cytogenetic analysis of 101 giant cell tumors of bone: nonrandom patterns of telomeric associations and other structural aberrations.** *Genes Chromosomes Cancer.* 2009 Jul;48(7):583-602
- [34] Sawyer JR, Goosen LS, Binz RL, Swanson CM, Nicholas RW. **Evidence for telomeric fusion as a mechanism for recurring structural aberrations of chromosome 11 in giant cell of bone.** *Cancer Genet Cytogenet.* 2005 May;159(1):32-6
- [35] Wuelling M, Delling G, Kaiser E. **Differential gene expression in stromal cells of human giant cell tumor of bone.** *Virchows Arch.* 2004 Dec;445(6):621-30. Epub 2004 Sep 23
- [36] Gamberi G, Benassi MS, Bohling T, Ragazzini P, Molendini L, Sollazzo MR, Pompetti F, Merli M, Magagnoli G, Balladelli A, Picci P. **C-myc and c-fos in human osteosarcoma: prognostic value of mRNA and protein expression.** *Oncology.* 1998 Nov-Dec;55(6):556-63
- [37] Tsang KY, Cheung MC, Chan D, Cheah KS. **The developmental roles of the extracellular matrix: beyond structure to regulation.** *Cell Tissue Res.* 2010 Jan;339(1):93-110
- [38] Bissell MJ, Hall HG, Parry G. **How does the extracellular matrix direct gene expression?** *J Theor Biol.* 1982 Nov 7;99(1):31-68
- [39] Robbins C. **Le basi patologiche della malattia.** Piccin, Vol 1, Cap 7, 275-317. 2000
- [40] Benassi MS, Magagnoli G, Ponticelli F, Pazzaglia L, Zanella L, Gamberi G, Ragazzini P, Ferrari C, Mercuri M, Picci P. **Tissue and serum loss of metalloproteinase inhibitors in high grade soft tissue sarcomas.** *Histol Histopathol.* 2003 Oct;18(4):1035-40
- [41] Benassi MS, Gamberi G, Magagnoli G, Molendini L, Ragazzini P, Merli M, Chiesa F, Balladelli A, Manfrini M, Bertoni F, Mercuri M, Picci P. **Metalloproteinase expression and prognosis in soft tissue sarcomas.** *Ann Oncol.* 2001 Jan;12(1):75-80
- [42] Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ. **The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review.** *Int J Cancer.* 1997 Jul 3;72(1):1-22

- [43] Choong PF, Nadesapillai AP. **Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis.** Clin Orthop Relat Res. 2003 Oct;(415 Suppl):S46-58
- [44] Duffy MJ, Duggan C. **The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumor markers for the individualised management of patients with cancer.** Clin Biochem. 2004 Jul;37(7):541-8
- [45] Duffy MJ. **The urokinase plasminogen activator system : role in malignancy.** Curr Pharm Des. 2004;10(1):39-49
- [46] Fisher JL, Field CL, Zhou H, Harris TL, Henderson MA, Choong PF. **Urokinase plasminogen activator system gene expression is increased in human breast carcinoma and its bone metastase: a comparison of normal breast tissue, non-invasive and invasive carcinoma and osseous metastases.** Breast Cancer Res Treat. 2000 May;61(1):1-12
- [47] Foekens JA, Schmitt M, van Putten WL, Peters HA, Bontenbal M, Jänicke F, Klijn JG. **Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients.** Cancer Res. 1992 Nov 1;52(21):6101-5
- [48] Pedersen H, Brüner N, Francis D, Osterlind K, Rønne E, Hansen HH, Danø K, Grøndahl-Hansen J. **Prognostic impact of urokinase, urokinase receptor, and type 1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue.** Cancer Res. 1994 Sep 1;54(17):4671-5
- [49] Hofmann R, Lehmer A, Hartung R, Robrecht C, Buresch M, Grothe F. **Prognostic value of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in renal cell cancer.** J Urol. 1996 Mar;155(3):858-62
- [50] Gleeson NC, Gonsalves R, Bonnar J. **Plasminogen activator inhibitors in endometrial adenocarcinoma.** Cancer. 1993 Sep 1;72(5):1670-2
- [51] Kobayashi H, Fujishiro S, Terao T. **Impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 on prognosis in cervical cancer of the uterus.** Cancer Res. 1994 Dec 15;54(24):6539-48
- [52] Kuhn W, Pache L, Schmalfeldt B, Dettmar P, Schmitt M, Jänicke F, Graeff H. **Urokinase (uPA) and PAI-1 predict survival in advanced ovarian cancer patients (FIGO III) after radical surgery and platinum-based chemotherapy.** Gynecol Oncol. 1994 Dec;55(3 Pt 1):401-9
- [53] Buø L, Meling GI, Karlsrud TS, Johansen HT, Aasen AO. **Antigen levels of urokinase plasminogen activator and its receptor at the tumor-host interface of colorectal adenocarcinomas are related to tumor aggressiveness.** Hum Pathol. 1995 Oct;26(10):1133-8
- [54] Boyce BF, Xing L. **Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodelling.** Arch Biochem Biophys. 2008 May 15;473(2):139-46
- [55] Yasui T, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Matsumoto T, Masuda H, Hirose J, Omata Y, Yasuda H, Imamura T, Nakamura K, Tanaka S. **Regulation of RANKL-Induced Osteoclastogenesis by TGF- $\beta$  Through Molecular Interaction Between Smad3 and Traf6.** J Bone Miner Res. 2011 Jul;26(7):1447-56
- [56] Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. **Receptor activator of nuclear**

**factor  $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease.** *Endocr Rev* 29: 155-192

[57] Mazière C, Savitsky V, Galmiche A, Gomila C, Massy Z, Mazière JC. **Oxidized low density lipoprotein enhanced RANKL expression in human osteoblast-like cells. Involvement of ERK, NF $\kappa$ B and NFAT.** *Biochim Biophys Acta.* 2013 Oct;1832(10):1756-64

[58] Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. **The role of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implication.** *J Clin Endocrinol Metab* 92: 4514-4521

[59] Page G, Miossec P. **RANK and RANKL expression as markers of dendritic cell-T cell interactions in paired samples of rheumatoid synovium and lymph nodes.** *Arthritis Rheum.* 2005 Aug;52(8):2307-12

[60] Tan W, Zhang W, Strasner A, Grivennikov S, Cheng JQ, Hoffman RM, Karin M. **Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling.** *Nature.* 2011 Feb 24;470(7335):548-53

[61] Cappariello A, Mirabile E, Muraca M, Teti A. **Engineered tridimensional hydroxyapatite scaffold to support bone resorption.** *Bone Abstracts (2013)* 2 P68

[62] Lynch CC, Hikosaka A, Acuff HB, Martin MD, Kawai N, Singh RK, Vargo-Gogola TC, Begtrup JL, Peterson TE, Fingleton B, Shirai T, Matrisian LM, Futakuchi M. **MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL.** *Cancer Cell.* 2005 May;7(5):485-96

[63] Boyce BF, Xing L. **Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin.** *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 1:S1. Review

[64] Huang L, Cheng YY, Chow LTC, Zheng MH, Kumta SM. **Tumour cells produce receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) in skeletal metastases.** *J Clin Pathol* 2002;55:877-878

[65] McCarthy HS, Williams JH, Davie MW, Marshall MJ. **Platelet-derived growth factor stimulates osteoprotegerin production in osteoblastic cells.** *J Cell Physiol.* 2009 Feb;218(2):350-4

[66] Gohda J, Akiyama T, Koga T, Takayanagi H, Tanaka S, Inoue J. **RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis.** *EMBO J.* 2005 Feb 23;24(4):790-9.

[67] Morlon A, Munnich A, Smahi A. **TAB2, TRAF6 and TAK1 are involved in NF- $\kappa$ B activation induced by the TNF-receptor, Edar and its adaptor Edaradd.** *Hum Mol Genet.* 2005 Dec 1;14(23):3751-7

[68] Han KY, Yang D, Chang EJ, Lee Y, Huang H, Sung SH, Lee ZH, Kim YC, Kim HH. **Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by sauchinone.** *Biochem Pharmacol.* 2007 Sep 15;74(6):911-23

[69] Ara T, Declerck YA. **Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression.** *Eur J Cancer.* 2010 May;46(7):1223-31

[70] Sato S, Futakuchi M, Ogawa K, Asamoto M, Nakao K, Asai K, Shirai T. **Transforming growth factor beta derived from bone matrix promotes cell**

**proliferation of prostate cancer and osteoclast activation-associated osteolysis in the bone microenvironment.** *Cancer Sci.* 2008 Feb;99(2):316-23

[71] Xian L, Wu X, Pang L, Lou M, Rosen CJ, Qiu T, Crane J, Frassica F, Zhang L, Rodriguez JP, Xiaofeng Jia, Shoshana Yakar, Shouhong Xuan, Argiris Efstratiadis, Mei Wan, XuCao. **Matrix IGF1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells.** *Nat Med.* 2012 Jul;18(7):1095-101

[72] Kiepe D, Ciarmatori S, Hoeflich A, Wolf E, Tönshoff B. **Insulin-like growth factor (IGF)I stimulates cell proliferation and induces IGF binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP 5 gene expression in cultured growth plate chondrocytes via distinct signalling pathways.** *Endocrinology.* 2005 Jul;146(7):3096-104

[73] Natsume H, Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Minamitani C, Otsuka T, Kozawa O. **Wnt3a regulates tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated interleukin-6 release in osteoblasts.** *Mol Cell Endocrinol.* 2011 Jan 1;331(1):66-72.

[74] Paget S. **The distribution of secondary growths in cancer of the breast.** *Cancer Metastasis Rev.* 1989 Aug;8(2):98-101

[75] Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massagué J, Mundy GR, Guise TA. **TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development.** *J Clin Invest.* 1999 Jan;103(2):197-20

[76] Ruvkun G. **The perfect storm of tiny RNAs.** *Nat Med.* 2008 Oct;14(10):1041-5

[77] Di Leva G, Croce CM. **Roles of small RNAs in tumor formation.** *Trends Mol Med.* 2010 Jun;16(6):257-67

[78] Kim VN, Nam JW. **Genomic of microRNA.** *Trends Genet.* 2006 Mar;22(3):165-73

[79] Bartel DP. **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281-97

[80] Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. **The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNAs processing.** *Genes Dev.* 2004 December 15; 18(24): 3016–3027

[81] Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. **An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional genes silencing in Drosophila cells.** *Nature.* 2000 Mar 16;404(6775):293-6

[82] Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. **The roles of microRNAs in cancer and apoptosis.** *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2009 Feb;84(1):55-71

[83] Dalmay T. **MicroRNA and cancer.** *J Intern Med.* 2008 Apr;263(4):366-75

[84] Kumar MS et al. **Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis.** *Nat Genet.* 2007 May;39(5):673-7

[85] Fabbri M, Calin GA. **Epigenetics and miRNAs in human cancer.** *Adv Genet.* 2010;70:87-99.

- [86] Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. **A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation.** *Cancer Res.* 2005 Nov 1;65(21):9628-32
- [87] Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. **The role of let-7 in cell differentiation and cancer.** *Endocr Relat Cancer.* 2010 Jan 29;17(1):F19-36
- [88] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. **Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival.** *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3753-6
- [89] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. **RAS is regulated by the let-7 microRNA family.** *Cell.* 2005 Mar 11;120(5):635-47
- [90] Krutzfeldt J, Kuwajima S, Braich R et al. **Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs.** *Nucleic Acids Res.* 2007;35(9):2885-92
- [91] Vester B, Wengel J. **LNA (locked nucleic acid):high affinity targeting of complementary RNA and DNA.** *Biochemistry.* 2004 Oct 26;43(42):13233-41
- [92] Lewis BP, Shih IH, Jones-rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. **Prediction of the mammalian microRNA targets.** *Cell.* 2003 Dec 26;115(7):787-98
- [93] Yousef M, Showe L, Showe M. **A study of microRNAs in silico and in vivo: bioinformatics approaches to microRNA discovery and target identification.** *FEBS J.* 2009 Apr;276(8):2150-6
- [94] Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. **The impact of microRNAs on protein output.** *Nature.* 2008 Sep 4;455(7209):64-71
- [95] Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. **MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing.** *Mol Cell.* 2007 Jul 6;27(1):91-105
- [96] Kowalewska M, Bakula-Zalewska E, Chechlinska M, Goryca K, Nasierowska-Guttmejer A, Danska-Bidzinska A, **Bidzinski M. microRNAs in uterine sarcomas and mixed epithelial-mesenchymal uterine tumors: a preliminary report.** *Tumour Biol.* 2013 Aug;34(4):2153-60
- [97] Rao PK, Missiaglia E, Shields L, Hyde G, Yuan B, Shepherd CJ, Shipley J, Lodish HF. **Distinct roles for miR-1 and miR-133a in the proliferation and differentiation of rhabdomyosarcoma cells.** *FASEB J.* 2010 Sep;24(9):3427-37
- [98] Novello C, Pazzaglia L, Cingolani C, Conti A, Quattrini I, Picci P, Benassi MS. **miRNA expression profile in human osteosarcoma: Role of miR-1 and miR-133b in proliferation and cell cycle control.** *Int J Oncol.* 2013 Feb;42(2):667-75
- [99] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. **The 21-nucleotide let-7 RNA regulates**

**developmental timing in *Caenorhabditis elegans*.** Nature. 2000 Feb 24;403(6772):901-6.

[100] Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. **The role of let-7 in cell differentiation and cancer.** Endocr Relat Cancer. 2010 Jan 29;17(1):F19-36.

[101] Shin S, Moon KC, Park KU, Ha E. **MicroRNA-513a-5p mediates TNF- $\alpha$  and LPS induced apoptosis via downregulation of X-linked inhibitor of apoptotic protein in endothelial cells.** Biochimie 2012 Jun 94(6):1431-6.

[102] Liu X, Sempere LF, Ouyang H, Memoli VA, Andrew AS, Luo Y, Demidenko E, Korc M, Shi W, Preis M, Dragnev KH, Li H, Drenzo J, Bak M, Freemantle SJ, Kauppinen S, Dmitrovsky E. **MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors.** J Clin Invest. 2010 Apr;120(4):1298-309

[103] Lee DY, Jeyapalan Z, Fang L, Yang J, Zhang Y, Yee AY, Li M, Du WW, Shatseva T, Yang BB. **Expression of versican 3'-untranslated region modulates endogenous microRNA functions.** PLoS One. 2010 Oct 25;5(10):e13599

[104] Yang Y, Wu J, Guan H, Cai J, Fang L, Li J, Li M. **MiR-136 promotes apoptosis of glioma cells by targeting AEG-1 and Bcl-2.** FEBS Lett. 2012 Oct 19;586(20):3608-12

[105] Mosakhani N, Pazzaglia L, Benassi MS, Borze I, Quattrini I, Picci P, Knuutila S. **MicroRNA expression profiles in metastatic and non-metastatic Giant Cell Tumor.** Histol Histopathol. 2013 May;28(5):671-8.

[106] Conti A, Rodriguez GC, Chiechi A, Blazquez RM, Barbado V, Krénacs T, Novello C, Pazzaglia L, Quattrini I, Zanella L, Picci P, De Alava E, Benassi MS. **Identification of potential biomarkers for giant cell tumor of bone using comparative proteomics analysis.** Am J Pathol. 2011 Jan;178(1):88-97

[107] Pazzaglia L, Conti A, Chiechi A, Novello C, Magagnoli G, Astolfi A, Pession A, Krénacs T, Alberghini M, Picci P, Benassi MS. **Differential gene expression in classic giant cell tumours of bone: Tenascin C as biological risk factor for local relapses and metastases.** Histopathology. 2010 Jul;57(1):59-72.

[108] Moon HG, Hwang KT, Kim JA, Kim HS, Lee MJ, Jung EM, Ko E, Han W, Noh DY. **NFIB is a potential target for estrogen receptor-negative breast cancers.** Mol Oncol. 2011 Dec;5(6):538-44

[109] Dooley AL, Winslow MM, Chiang DY, Banerji S, Stransky N, Dayton TL, Snyder EL, Senna S, Whittaker CA, Bronson RT, Crowley D, Barretina J, Garraway L, Meyerson M, Jacks T. **Nuclear factor I/B is an oncogene in small cell lung cancer.** Genes Dev. 2011 Jul 15;25(14):1470-5

[110] Zaidi M, Alam AS, Shankar VS, Bax BE, Bax CM, Moonga BS, Bevis PJ, Stevens C, Blake DR, Pazianas M, et al. **Cellular biology of bone resorption.** Biol Rev Camb Philos Soc. 1993 May;68(2):197-264.