

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**Dottorato di ricerca in
Oncologia e Patologia Sperimentale**

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: 05/G1

Settore Scientifico disciplinare: BIO/14

***Valutazione del coinvolgimento dei trasportatori ABC
e dell'oncogene C-MYC nella farmacoresistenza
dell'osteosarcoma ad alto grado***

Presentata da: **Marilù Fanelli**

Coordinatore Dottorato
Chiar.mo Prof.re Sandro Grilli

Relatore
Prof.re Pietro Ruggieri

Correlatore
Dott. Massimo Serra

Esame finale anno 2014

Indice

Capitolo I

| | |
|--|----------|
| Osteosarcoma | 1 |
| 1. Definizione..... | 1 |
| 1.1 Osteosarcoma Classico o Convenzionale..... | 1 |
| 1.2 Epidemiologia..... | 1 |
| 1.3 Eziologia..... | 2 |
| 1.3.1 Fattori genetici..... | 2 |
| 1.3.2. Fattori ambientali..... | 3 |
| 1.4 Terapia..... | 3 |
| 1.4.1 Doxorubicina..... | 5 |
| 1.4.2 Methotrexate..... | 5 |
| 1.4.3 Ifosfamide..... | 7 |
| 1.4.4 Cisplatino..... | 7 |

Capitolo II

| | |
|--|-----------|
| Oncogene C-MYC | 10 |
| 2.1 Origine dell'oncogene C-MYC e attività di regolatore trascrizionale..... | 10 |
| 2.2 Struttura proteica di C-MYC..... | 11 |
| 2.3 C-MYC e ciclo cellulare..... | 14 |
| 2.4 Regolazione della proteina C-MYC..... | 15 |
| 2.5 C-MYC e differenziamento cellulare..... | 18 |

Capitolo III

| | |
|--|-----------|
| Trasportatori ABC | 19 |
| 3.1 Generalità..... | 19 |
| 3.2 Struttura generale dei trasportatori ABC e meccanismo di trasporto..... | 21 |
| 3.2.1 Trasportatori ABC della Famiglia A..... | 23 |
| 3.2.2 Trasportatori ABC della Famiglia B (Multidrug resistance, MDR)..... | 24 |
| 3.2.3 Trasportatori ABC della famiglia C (Multidrug resistance protein, MRP)..... | 26 |
| 3.2.4 Trasportatori ABC della Famiglia D..... | 29 |
| 3.2.5 Trasportatori ABC delle Famiglie E ed F..... | 30 |
| 3.2.6 Trasportatori ABC della Famiglia G..... | 30 |
| 3.3 Funzioni fisiologiche dei trasportatori ABC..... | 31 |
| 3.4 Trasportatori ABC e Multidrug resistance (MDR)..... | 31 |
| 3.5 Trasportatori ABC e cellule staminali..... | 33 |
| 3.6 Trasportatori ABC e cellule staminali tumorali..... | 34 |
| 3.7 Strategie terapeutiche utilizzate per superare il fenomeno della multidrug resistance (MDR)..... | 34 |
| 3.7.1 Revertanti di prima generazione..... | 34 |
| 3.7.2 Revertanti di seconda generazione..... | 35 |
| 3.7.3 Revertanti di terza generazione..... | 35 |
| 3.7.4 Revertanti di quarta generazione (o revertanti di ultima generazione)..... | 35 |
| Scopo della ricerca | 36 |

Capitolo IV

| | |
|--|-----------|
| Materiali e metodi..... | 38 |
| 4.1 Farmaci..... | 38 |
| 4.2 Linee cellulari..... | 38 |
| 4.3 Campioni clinici..... | 39 |
| 4.4 Estrazione di RNA..... | 40 |
| 4.5 Retrotrascrizione e quantitative real-time PCR..... | 41 |
| 4.6 Immunofluorescenza su cellule fissate..... | 42 |
| 4.7 Immunistoichimica..... | 43 |
| 4.8 Esperimento di incorporazione di rodamina 123, calceina AM e doxorubicina in citofluorimetria..... | 45 |
| 4.9 Analisi citofluorimetrica dell'efflusso extracellulare di rodamina 123, calceina AM e DX..... | 45 |
| 4.10 Valutazione dell'incorporazione di rodamina 123, calceina AM e DX in microscopia a fluorescenza..... | 46 |
| 4.11 Silenziamento genico di ABCB1..... | 46 |
| 4.12 Valutazione della citotossicità <i>in vitro</i> di CBT-1 in linee cellulari di osteosarcoma umano..... | 46 |
| 4.13 Valutazione dell'azione revertante <i>in vitro</i> di CBT-1 in linee cellulari di osteosarcoma umano..... | 47 |
| 4.14 Analisi statistiche..... | 47 |

Capitolo V

| | |
|--|-----------|
| Risultati..... | 49 |
| 5.1.1 Espressione genica dei trasportatori ABC e dell'oncogene C-MYC..... | 49 |
| 5.1.2 Espressione genica e impatto clinico dei trasportatori ABC e dell'oncogene C-MYC su campioni clinici di pazienti affetti da osteosarcoma classico..... | 54 |
| 5.2.1 Espressione proteica dei trasportatori ABC in linee cellulari di osteosarcoma umano..... | 59 |
| 5.2.2 Valutazione dell'impatto prognostico del livello di espressione delle proteine ABCB1 e ABCC1..... | 63 |
| 5.3 Inibizione della funzionalità di ABCB1 e ABCC1..... | 64 |
| 5.3.1 Effetto di CBT-1 sull'attività di ABCB1..... | 64 |
| 5.3.2 Effetti di CBT-1 sull'incorporazione intracellulare e efflusso extracellulare di doxorubicina..... | 68 |
| 5.3.3 Effetto di CBT-1 sull'attività di ABCC1..... | 72 |
| 5.4.1 Silenziamento genico di ABCB1 e incorporazione di Calceina AM..... | 76 |
| 5.4.2 Silenziamento genico di ABCB1 e incorporazione intracellulare ed efflusso extracellulare di doxorubicina..... | 80 |
| 5.5 Reversione <i>in vitro</i> della resistenza alla doxorubicina..... | 81 |
| 5.6 Valutazione del coinvolgimento di ABCC1 nell'insorgenza della resistenza al cisplatino e al methotrexate..... | 81 |

Capitolo VI

| | |
|--------------------------|-----------|
| Discussione..... | 84 |
| Bibliografia..... | 90 |

Capitolo I

Osteosarcoma

1. Definizione

L'osteosarcoma (OS) è un tumore primitivo maligno dell'apparato scheletrico, caratterizzato dalla produzione di matrice osteoide ed ossea ad opera di cellule mesenchimali maligne che lo costituiscono (Campanacci, 1999; Klein & Siegal, 2006). Ha un picco di incidenza tra la seconda e terza decade di vita, durante il periodo di maggior crescita ossea come l'adolescenza. Esistono diverse varianti di osteosarcoma, usualmente suddivise in due grandi gruppi: osteosarcomi ad alto grado e osteosarcomi a basso grado. La maggior parte degli osteosarcomi di origine midollare sono di alto grado, mentre quelli che originano dalla superficie ossea sono tendenzialmente di basso grado.

I tumori ad alto grado di malignità (III e IV grado) rappresentano il 90% degli osteosarcomi, mentre quelli a basso grado di malignità (I e II grado) comprendono gli istotipi parostale, periostale e centrale a basso grado (Campanacci, 1999; Klein & Siegal, 2006; Picci, 2007).

1.1 Osteosarcoma Classico o Convenzionale

L'osteosarcoma classico o convenzionale rappresenta la stragrande maggioranza di tutti gli osteosarcomi. E' comunemente definibile come una neoplasia ad alto grado di malignità che colpisce prevalentemente le metafisi delle ossa lunghe in adolescenti e giovani adulti con età inferiore a 40 anni, con una lieve predominanza nel sesso maschile e che può presentare metastasi (soprattutto polmonari) già all'esordio clinico (Campanacci, 1999).

E' un tumore raro (0,2% di tutti i tumori maligni) con un'incidenza di 3 casi su 1.000.000 di persone all'anno (Campanacci, 1999; Picci, 2007). Quando si presenta in età adulta tendenzialmente è secondario a patologie quali il morbo di Paget, la sindrome di Li-Fraumeni e il retinoblastoma ereditario (Campanacci, 1999; Hattinger et al, 2010).

1.2 Epidemiologia

In base ai dati del SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) il tasso di incidenza per i tumori ossei e articolari, indipendentemente dall'età e dalla razza, è pari a 0,9 casi ogni 100.000 persone l'anno, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni pari al 67,9%. L'età media di diagnosi per questi tipi di tumore è pari a 39 anni, con il 27,8% dei pazienti di età

inferiore ai 20 anni. Per i bambini (0-14 anni) il tasso di incidenza per i tumori ossei e articolari è di 0,7 casi ogni 100.000 persone l'anno, con un tasso di mortalità di 0,1 casi ogni 100.000 persone l'anno. Aumentando l'intervallo di età da 0 a 19 anni, si passa a 0,9 casi ogni 100.000 persone l'anno, con un tasso di mortalità pari a 0,4 casi ogni 100.000 persone l'anno. L'osteosarcoma ha una distribuzione bimodale per età con un primo picco di incidenza durante l'adolescenza e un secondo in età adulta. Il primo picco è tra i 10-14 anni di età e coincide con una rapida crescita suggerendo una relazione stretta tra il rapido accrescimento osseo e il tumore stesso. Il secondo picco è tipico dell'età adulta, dai 65 anni in su, frequentemente secondario ad altri tumori e correlato spesso con il morbo di Paget (Campanacci, 1999). Tra i tumori tipici dell'età pediatrica, l'osteosarcoma è ottavo in incidenza generale e rappresenta il 2,4% dei tumori pediatrici. L'incidenza è maggiore nel sesso maschile con un tasso di 5,4 milioni di nuovi pazienti all'anno, contro i 4,0 milioni di nuovi pazienti all'anno nel sesso femminile.

Comunemente l'osteosarcoma colpisce l'estremità delle ossa lunghe in corrispondenza della cartilagine metafisaria. Il femore è il sito anatomico principalmente colpito (42%, di cui il 75% nella regione distale), seguito da tibia (19%, di cui l'80% nella regione prossimale) e omero (10%, di cui l'80% nella regione prossimale). Altre regioni anatomiche, non del tutto inusuali, sono rappresentate da mascella (8%) e bacino (8%) (Campanacci, 1999).

1.3 Eziologia

Le cause responsabili dell'insorgenza dell'osteosarcoma sono tuttora sconosciute. Tra i fattori maggiormente riportati come predisponenti all'insorgenza della neoplasia si possono citare l'aumentata attività osteoblastica ed osteogenica che si ha durante l'adolescenza, fattori genetici e fattori ambientali.

1.3.1 Fattori genetici

L'osteosarcoma è caratterizzato da un'elevata instabilità genetica. Le cellule tumorali presentano, infatti, cariotipi altamente complessi e non esistono aberrazioni specifiche di che possano essere utilizzate come marcatori genetici e molecolari per questo tumore. La messa a punto di tecniche quali l'ibridazione genomica comparativa (CGH, *comparative genomic hybridization*) e i DNA o cDNA *microarrays*, ha consentito negli ultimi 10-15 anni un rapido sviluppo ed un incremento delle conoscenze a questo riguardo, permettendo

di identificare le regioni cromosomiche e/o i geni maggiormente alterati nelle cellule osteosarcomatose.

Le alterazioni genetiche riscontrate più frequentemente nell'osteosarcoma ad alto grado di malignità consistono nell'inattivazione dei geni oncosoppressori *TP53* e *RBI* (gene del retinoblastoma) (Hattinger et al, 2009). Questo spiega perchè l'incidenza di osteosarcoma è aumentata in individui con malattie genetiche associate ad alterazioni nella linea germinale di tali geni (come i pazienti affetti da retinoblastoma o da sindrome di Li-Fraumeni) (Ottaviani, 2009). Da diversi studi sono emerse molteplici evidenze che indicano come l'alterazione coordinata di *TP53* e *RBI* sia un evento chiave per la trasformazione neoplastica delle cellule che danno poi origine all'osteosarcoma (Ottaviani, 2009; Longhi et al, 2006).

Altre alterazioni ritrovate abbastanza frequentemente nell'osteosarcoma classico sono l'amplificazione del gene *MDM2* (*mouse double minute 2 homolog*) e del gene *CDK4* (*cyclin-dependent kinase 4*) (Gamberi et al, 2000). Entrambe queste alterazioni sembrano essere indirettamente coinvolte nella patogenesi dell'osteosarcoma attraverso l'azione che espletano sui prodotti dei geni *TP53* e *RBI*. Il gene *MDM2* codifica infatti per una proteina che lega e inattiva la proteina p53 inibendone così la principale funzione legata all'arresto della progressione nel ciclo cellulare di cellule con rilevanti alterazioni genetiche, (impedendo pertanto la proliferazione di cellule trasformate o in via di trasformazione) (Nag et al, 2013). Il gene *CDK4* codifica per una proteina chinasi ciclina-dipendente che è in grado di inattivare la proteina codificata da *RBI* (pRB), inibendone l'attività oncosoppressiva (Baker & Reddy, 2012).

1.3.2. Fattori ambientali

Radiazioni ionizzanti, agenti alchilanti, virus e traumi sono fattori esterni per i quali è stato più volte ipotizzato un possibile ruolo nell'insorgenza di osteosarcoma. Le radiazioni ionizzanti sono l'unico fattore eziologico chiaramente riconosciuto come causa predisponente all'insorgenza di osteosarcoma in circa il 3% dei casi (Picci, 2007).

1.4 Terapia

Prima degli anni '70 il trattamento terapeutico per l'osteosarcoma prevedeva il ricorso alla chirurgia (soprattutto amputazione) o alla radioterapia, mai utilizzati in combinazione. Nonostante una buona risposta locale, molti pazienti morivano però in poco tempo per

l'insorgenza di metastasi, soprattutto polmonari (Bruland & Pihl, 1997; Chou & Gorlick, 2006; Hattinger et al, 2010).

Con la sola chirurgia, la sopravvivenza libera da malattia a 5 anni era pari al 12%, con il 75% dei pazienti che moriva entro 2 anni dalla diagnosi. A partire dall'inizio degli anni '70, l'introduzione di regimi di poli-chemioterapia pre- e post-operatoria ha migliorato la prognosi di questi pazienti, portando progressivamente la percentuale di sopravvivenza a 5 anni dell'osteosarcoma convenzionale all'attuale 60-65% (Bacci et al, 2006; Bruland & Pihl, 1997; Chou & Gorlick, 2006; Hattinger et al, 2010).

La comparsa e/o la frequente presenza di metastasi all'esordio sono i fattori che maggiormente pregiudicano le possibilità di guarigione dei pazienti con osteosarcoma, ed è per questo motivo che oggi il trattamento delle forme ad alto grado di malignità prevede l'utilizzo combinato di regimi di polichemioterapia pre- e post-operatoria (chemioterapia neoadjuvante).

L'introduzione della chemioterapia pre-operatoria ha anche reso possibile la valutazione dell'entità della risposta farmacologica da parte del tumore in corso di trattamento. La valutazione della necrosi tumorale nelle resezioni chirurgiche dopo la chemioterapia preoperatoria rappresenta infatti un parametro di estrema utilità prognostica e terapeutica perchè è indice della risposta del tumore al trattamento antitumorale e indirizza le fasi successive di chemioterapia postoperatoria (Picci et al, 1985; Bacci et al, 2006; Hattinger et al, 2010). Nella maggior parte dei protocolli infatti, una necrosi rilevabile in meno del 90% della massa tumorale viene considerata come indicativa di scarsa risposta ai farmaci chemioterapici utilizzati nella fase pre-operatoria ed indirizza il paziente verso una fase post-operatoria diversificata ed intensificata (Bacci et al, 2006; Bruland & Pihl, 1997; Chou & Gorlick, 2006). I farmaci maggiormente impiegati nei protocolli di chemioterapia dell'osteosarcoma ad alto grado sono la doxorubicina (DX), il cisplatino (CDDP), il methotrexate (MTX) e l'ifosfamide (IFO). Uno dei fattori maggiormente limitanti l'efficacia degli attuali schemi di trattamento risulta essere l'insorgenza di fenomeni di farmacoresistenza naturale e/o acquisita contro uno o più dei farmaci sopra citati (Hattinger et al, 2010) e quindi il possibile miglioramento della prognosi dei pazienti con osteosarcoma non può prescindere da una migliore conoscenza dei meccanismi cellulari e biomolecolari alla base di questi fenomeni.

1.4.1 Doxorubicina

Gli antibiotici antraciclinici sono considerati tra i più utili farmaci antineoplastici mai sviluppati per la terapia di molte neoplasie. La *doxorubicina* (DX) e la *daunorubicina* (DNR) sono due analoghi isolati per la prima volta nel 1960 dal microrganismo *Streptomyces peucetius var. caesius*. La DX (**Figura 1A**), in particolare, è uno dei farmaci più efficaci ed utilizzati contro l'osteosarcoma convenzionale (Bruland & Pihl, 1997; Chou & Gorlick, 2006; Hattinger et al, 2010).

La DX si lega all'enzima topoisomerasi II, stabilizzandone il legame al DNA ed inibendone la funzione enzimatica, generando così un blocco della replicazione e della trascrizione del DNA stesso e, di conseguenza, della proliferazione cellulare che indirizza la cellula verso l'apoptosi. Oltre a questo, la DX genera anche radicali liberi che possono danneggiare il DNA o causare la perossidazione lipidica, con conseguenze spesso letali per la cellula. La produzione di radicali liberi, tra cui quelli dell'ossigeno, è probabilmente la causa principale che porta all'insorgenza della cardiotoxicità, che si esplica attraverso il danneggiamento delle membrane plasmatiche delle cellule del miocardio, principale effetto di tossicità collaterale associato al trattamento con DX (Zunino & Capranico, 1990; Chou & Gorlick, 2006).

Il principale meccanismo di resistenza alla DX riscontrato nell'osteosarcoma è rappresentato dalla sovraespressione del trasportatore ABCB1 (conosciuto anche come *multidrug resistance 1*, MDR1; *P-glycoprotein*; glicoproteina GP170) che trasporta attivamente questo farmaco al di fuori della cellula (Dean et al, 2001; Gillet et al, 2007). La sovraespressione di ABCB1 è infatti risultata essere associata ad una minore risposta clinica al trattamento chemioterapico e, conseguentemente, ad una prognosi avversa nei pazienti con osteosarcoma convenzionale trattati con protocolli di chemioterapia neoadjuvante (Baldini et al, 1995; Pakos & Ioannidis, 2003; Serra et al, 2003, 2006).

In modo meno chiaro, recentemente sono anche stati prodotti dati che indicano nell'aumentata espressione dell'oncogene C-MYC un possibile fattore prognostico avverso, legato probabilmente ad un'influenza indiretta sul livello di resistenza cellulare alla DX (Scionti et al, 2008).

1.4.2 Methotrexate

Il Methotrexate (*4-Amino-10-methylfolic acid hydrate*, MTX) è un antagonista dell'acido folico da cui differisce per la sostituzione di un gruppo amminico con un gruppo idrossilico

in posizione 4 dell'anello di pteridina (**Figura 1B**). Il MTX inibisce in modo competitivo e reversibile la di-idrofolato reduttasi (DHFR), un enzima che catalizza la conversione da acido diidrofolico ad acido tetraidrofolico, portando ad una inibizione della sintesi di DNA. Il MTX è dunque un farmaco fase S specifico, impiegato nel trattamento di patologie auto-immuni (artrite reumatoide) e neoplasie, tra cui l'osteosarcoma.

A basse dosi (inferiori a 10 μM) il methotrexate entra nella cellula per trasporto attivo attraverso l'interazione con il trasportatore di membrana, *Reduced Folate Carrier* (RFC), mentre a dosi più elevate il farmaco entra nella cellula principalmente per trasporto passivo.

Una volta all'interno della cellula, il methotrexate è immediatamente coniugato a residui di acido poliglutammino dall'enzima folipoligluttammato sintetasi (FPGS). La reazione di poligluttamminazione ha come conseguenza l'aumento di dimensioni della molecola di MTX e la sua ionizzazione che impedisce al farmaco di uscire dalla cellula per sola diffusione passiva, come avviene invece per i folato monogluttammati (Takimoto, 1996).

La resistenza delle cellule tumorali al MTX può derivare dai seguenti meccanismi:

1. riduzione del trasporto intracellulare del farmaco, dovuto a una riduzione dei livelli di espressione di RFC;
2. mutazioni a carico del gene che codifica per l'enzima DHFR con la conseguente sintesi di una molecola caratterizzata da minore affinità per il farmaco;
3. maggiore sintesi di DHFR in seguito ad amplificazione e/o sovraespressione del gene;
4. aumentato efflusso del farmaco a causa di alcuni trasportatori ABC (ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC6 e ABCG2);
5. aumento dei livelli dell'enzima *gamma-glutamyl hydrolase* che idrolizza i coniugati MTX-poligluttammato, favorendone la fuoriuscita dalla cellula per trasporto passivo.

Nel caso dell'osteosarcoma, la farmacoresistenza al MTX, sia sperimentale che clinica, è associata principalmente alla sovraespressione/amplificazione del gene *DHFR* e alla riduzione dell'espressione di *RFC* (Guo et al, 1999; Serra et al, 2004). In uno studio di immunoistochimica eseguito su una serie di campioni clinici di osteosarcoma ottenuti da pazienti trattati con protocolli chemioterapici basati principalmente sull'utilizzo di MTX è stato recentemente dimostrato che aumentati livelli di DHFR e dell'oncogene C-MYC alla diagnosi sono associati ad un decorso clinico sfavorevole (Scionti et al, 2008).

1.4.3 Ifosfamide

L'ifosfamide è un agente alchilante bifunzionale, analogo dell'oxazafosforina con un atomo di fosforo asimmetrico, impiegato nel trattamento di molti tumori (Allen & Creaven, 1972) (**Figura 1C**). È un farmaco strutturalmente molto simile alla ciclofosfamide, ma presenta uno spettro di attività e tossicità diversi.

Come tutti gli agenti alchilanti polifunzionali, esercita effetti citotossici attraverso il trasferimento di gruppi alchilici al DNA. Queste interazioni sono responsabili della scissione del DNA in seguito alla formazione di basi anomale o alla depurinazione del DNA da escissione della guanina. Anche se gli agenti alchilanti non sono ciclo-specifici, le cellule sono più sensibili all'alchilazione nella tarda fase G1 e in fase S con conseguente blocco in fase G2.

L'ifosfamide è un profarmaco attivato *in vivo* dal sistema microsomiale di ossidasi a funzione miste citocromo-P450 dipendente (CYP), in particolare dai sottotipi CYP3A4 e CYP2B6 che prendono parte all'idrossilazione dell'atomo di carbonio C⁴ dell'anello tetraidro-2H-1,3,2-oxazafosforina. La risultante 4-idrossiifosfamide (4-OH-IFO) è in equilibrio con l'aldoifosfamide, che una volta trasportata per via ematica ai tessuti normali e neoplastici è scissa in fosforamide mostarda (metabolita finale bi-alchilante del DNA) e in acroleina, composto nefrotossico.

La principale tossicità degli agenti alchilanti si ha a livello del midollo emopoietico con depressione dose-correlata (Katzung et al, 2006).

La farmacoresistenza a questi agenti è da ricondurre a una maggiore capacità di riparo dei danni al DNA, ad una ridotta permeabilità delle membrane, ad un'aumentata formazione di glutatione responsabile dell'inattivazione degli agenti alchilanti attraverso una reazione di coniugazione, o ancora ad un'aumentata sintesi di glutatione S-transferasi, che catalizza le reazioni di coniugazione (Dirven et al, 1995).

L'uso dell'ifosfamide nei regimi di chemioterapia per i tumori muscolo-scheletrici risale ai primi anni '80, ed attualmente viene utilizzata principalmente nelle fasi di intensificazione del trattamento farmacologico dell'osteosarcoma convenzionale (Ferrari et al, 2005).

1.4.4 Cisplatino

Il cisplatino (*cis-diclorodiamminoplatino^{II}*, CDDP) è tra i più potenti farmaci antitumorali, impiegato nel trattamento chemioterapico di molti tumori solidi, incluso l'osteosarcoma (Galanski et al, 2005). Il CDDP è un composto metallico inorganico neutro a geometria

planare quadra che interagisce con il DNA (**Figura 1D**). Gli addotti che si vengono a formare con le basi del DNA portano a distorsione e frammentazione del filamento di DNA con conseguente attivazione di apoptosi.

Il CDDP entra nella cellula essenzialmente mediante diffusione passiva, anche se recentemente è stato dimostrato che la proteina trasportatrice del rame (CTR1) potrebbe svolgere un ruolo di trasportatore attivo nell'incorporazione di questo farmaco (Holzer, Manorek & Howell, 2006).

All'interno della cellula il CDDP viene attivato attraverso una serie di reazioni chimiche che coinvolgono il legame con molecole di acqua (in particolare ioni ossidrili) in sostituzione degli ioni cloro. Questa reazione (comunemente denominata acquazione) è facilitata dal fatto che, all'interno della cellula, la concentrazione degli ioni cloro è significativamente più bassa (4 mM circa) rispetto al compartimento extracellulare.

Le molecole così generate interagiscono con le basi puriniche (adenina e guanina) in posizione N⁷ e le basi pirimidiniche (citosina e timina) in posizione N³ con conseguente formazione di addotti CDDP-DNA. La formazione di questi addotti causa, la distorsione e la frammentazione del filamento di DNA con conseguente attivazione dei *pathways* apoptotici che causano morte cellulare.

I più comuni meccanismi responsabili della resistenza al CDDP nelle cellule tumorali comprendono:

1. un aumento della detossificazione cellulare mediata dal sistema glutatione ridotto (GSH)/glutathione-S- transferasi (GST);
2. un minor accumulo intracellulare o un aumento dell'efflusso extracellulare del farmaco ad opera di trasportatori ABC;
3. un aumento dell'efficienza dei sistemi cellulari di riparazione del DNA;
4. diverse alterazioni di importanti vie di trasduzione del segnale che indirizzano la cellula verso l'apoptosi (MAPK, PI3K/Akt).

Per quanto concerne l'osteosarcoma, il principale meccanismo alla base della resistenza al CDDP sembra essere l'aumento dell'attività del sistema di detossificazione GSH/GST (Pasello et al, 2008).

Esistono, inoltre, evidenze sperimentali di un coinvolgimento del trasportatore ABCC2 (noto anche come MRP2, *multi-drug resistance-associated protein 2*) nella resistenza al CDDP nell'osteosarcoma, in quanto la sua sovraespressione potrebbe contribuire all'estrusione del farmaco (Chou & Gorlick, 2006).

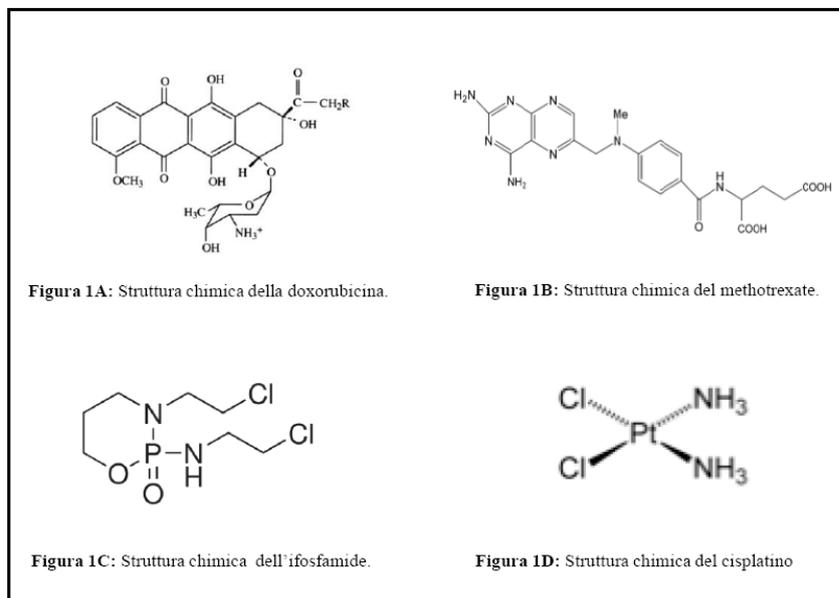


Figura 1. Struttura dei chemioterapici DX, MTX, CDDP e IFO utilizzati nel trattamento di pazienti affetti da osteosarcoma convenzionale.

Capitolo II

Oncogene C-MYC

2.1 Origine dell'oncogene C-MYC e attività di regolatore trascrizionale

Il gene *MYC* fu scoperto per la prima volta in pazienti affetti da linfoma di Burkitt. In questa neoplasia le cellule tumorali mostrano una tipica traslocazione cromosomica, t(8;14)(q24;q32), meno frequenti sono le traslocazioni t(8;22) o t(2;8). Tali traslocazioni comportano la fusione di parte dell'oncogene *C-MYC* con i geni per le catene pesanti o leggere delle immunoglobuline, determinando l'attivazione dell'oncogene *C-MYC* situato sul cromosoma 8 (8q24), fondamentale per la progressione tumorale (Taub et al, 1982; Dalla-Favera et al, 1982).

C-MYC è coinvolto in un ampio numero di processi cellulari come proliferazione, desensibilizzazione a stimoli inibitori per la crescita, immortalizzazione, trasformazione ed apoptosi; tutto questo spiega perché sia uno degli oncogeni più frequentemente attivati nei tumori umani (20% di tutte le neoplasie umane) (Dang et al, 2006; Vita & Henriksson, 2006; Hermeking, 2003). Negli ultimi anni ha suscitato particolare interesse la sua funzione di regolatore trascrizionale. Il prodotto del gene *MYC*, è infatti un fattore di trascrizione che, dopo eterodimerizzazione con la proteina MAX, si lega a migliaia di geni bersaglio (15% di tutti i geni) attivandone o reprimendone l'espressione. La maggior parte di questi geni bersaglio sono coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, nell'adesione delle cellule, nel metabolismo, nella biogenesi dei ribosomi, nella sintesi proteica, nell'apoptosi, nelle vie di segnalazione intracellulare e nella funzione mitocondriale (Dang et al, 2006; Vita & Henriksson, 2006; Hermeking, 2003).

Come detto prima, nell'osteosarcoma un'elevata espressione di C-MYC al momento della diagnosi è risultata essere correlata con una prognosi avversa in pazienti trattati con regimi di chemioterapia basati principalmente sull'utilizzazione di MTX e DX (Scionti et al, 2008). Oltre a questo, *C-MYC* è anche risultato essere amplificato e/o sovraespresso in linee di farmacoresistenti di osteosarcoma umano (Hattinger et al, 2009). Una possibile spiegazione di queste evidenze potrebbe consistere nel fatto che, tra i numerosi geni bersaglio di C-MYC, sono stati individuati diversi membri della famiglia dei trasportatori ABC che sono coinvolti in fenomeni di farmacoresistenza verso numerosi chemioterapici in diversi tumori umani (Dean et al, 2001; Gillet et al, 2007; Gatti et al, 2009). A conferma

di questa ipotesi, in studi precedenti condotti presso il laboratorio nel quale è stato svolto il suddetto programma di ricerca, è emerso in seguito a silenziamento genico di *C-MYC* su linee cellulari di osteosarcoma umano resistenti a DX, MTX e CDDP, che ad una riduzione dell'espressione genica e proteica dell'oncogene corrispondeva una riduzione dei livelli di espressione genica di diversi trasportatori ABC, in particolare alcuni membri delle famiglie C ed F (*dati non pubblicati*). Questi dati preliminari, affiancati da risultati ottenuti da esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina, che hanno confermato il legame di C-MYC al promotore dei trasportatori ABC presi in esame, supportano l'ipotesi di una modulazione trascrizionale dei geni ABC operata da C-MYC nell'osteosarcoma. Tuttavia sono necessarie ulteriori analisi per verificare se il coinvolgimento di C-MYC nella farmacoresistenza dell'osteosarcoma ad alto grado sia da attribuire alla sua attività di regolatore trascrizionale dei trasportatori ABC.

2.2 Struttura proteica di C-MYC

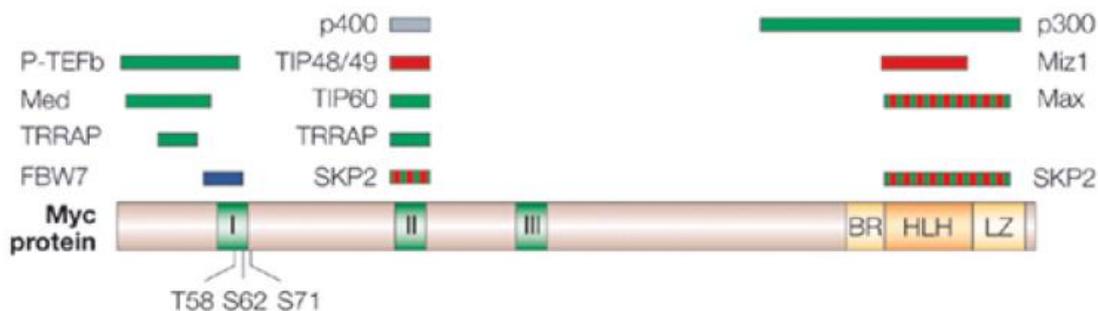
La proteina C-MYC appartiene alla famiglia MYC di fattori di trascrizione, che include anche i geni B-MYC, L-MYC, N-MYC e S-MYC, ma solo i geni L-MYC, N-MYC e C-MYC sono dei protooncogeni. I fattori di trascrizione appartenenti a tale famiglia contengono il dominio bHLH/LZ (*basic Helix-Loop-Helix/Leucine Zipper*). La proteina MYC, attraverso il suo dominio bHLH si può legare al DNA, mentre il dominio *leucine zipper* (LZ) permette la dimerizzazione con MAX, un altro fattore di trascrizione bHLH.

Il gene *C-MYC* è costituito da tre esoni e la sua espressione è regolata principalmente da due promotori distinti denominati P1 e P2. Il promotore P2 è il più attivo, infatti contribuisce all' 80-90% dell'espressione totale, e controlla la trascrizione di *C-MYC* permettendo la sintesi di un RNA messaggero di 2,25 kb, mentre la trascrizione regolata dal promotore P1 genera un trascritto lungo 2.4 kb (Taub et al, 1984). La maggior parte dell'estremità 5' del primo esone del gene *C-MYC* corrisponde ad una regione non tradotta perciò le due proteine relative ai due mRNA differiscono soltanto per 14 amminoacidi situati all'estremità N-terminale. La traduzione della proteina MYC1 parte in prossimità dell'estremità 3' del primo esone, mentre il sito di inizio della traduzione della proteina MYC2 è localizzato vicino all'estremità 5' del secondo esone.

L'estremità N-terminale contiene tre domini altamente conservati conosciuti come Mycbox I-II-III, di cui il dominio Mycbox I è essenziale per la completa attivazione o repressione di alcuni geni (Oster et al, 2003) ed il dominio Mycbox II è essenziale per

L'attivazione trascrizionale MYC dipendente in virtù dei siti di legame per i complessi proteici coinvolti nel rimodellamento della cromatina (Stone et al, 1987; Nikiforov et al, 2002). Sempre all'interno dell'estremità N-terminale è presente il dominio di transattivazione trascrizionale (TAD), che costituisce la zona di interazione tra MYC e le proteine necessarie per il rimodellamento della cromatina, tra cui l'istone acetiltransferasi (HAT) e le proteine del complesso SWI/SNF. Questo dominio quindi permette alla proteina MYC di agire a livello epigenetico sull'espressione dei suoi geni bersaglio (Amati et al, 2001). L'estremità C-terminale contiene invece un motivo di dimerizzazione *helix-loop-helix leucine zipper* (HLH/LZ) che media la dimerizzazione omotipica o eterotipica con altre proteine che possiedono lo stesso motivo (**Figura 2**). MYC è in grado di attivare trascrizionalmente una gran varietà di geni bersaglio formando un complesso eterodimerico con la proteina MAX (Dang et al, 1999). Nello specifico la dimerizzazione di MYC e MAX avviene attraverso il dominio HLH/LZ e permette alle regioni ricche di aminoacidi basici adiacenti alle regioni HLH/LZ delle due proteine di legare i domini E-box (*Enhancer Box*) del DNA (5'-CA [C/T] GTG-3'), sequenze esanucleotidiche specifiche che costituiscono il sito di riconoscimento di MYC, presente in tutti i geni bersaglio (Blackwood et al, 1991).

La proteina MAX, a differenza di MYC, oltre ad interagire con MYC stesso, può omodimerizzare o legarsi ad altre proteine HLH/LZ appartenenti alla famiglia delle proteine MAD. I complessi MAX-MAD inibiscono la trascrizione di geni bersaglio di MYC, competendo con i complessi contenenti MYC per il legame ai domini E-box e reclutando sul promotore un complesso proteico corepressorio contenente l'istone deacetilasi (HDAC) (Ayer & Eisenman, 1993). In alcuni casi MYC può funzionare anche da repressore trascrizionale. L'attività di inibizione della trascrizione non utilizza l'azione dell'enzima istone deacetilasi, ma coinvolge il legame con altre proteine tra cui Miz-1 (*Myc-interacting zinc finger protein 1*) (Gartel et al, 2001; Wu et al, 2003).



(Adhikary S. and Eilers M.; *Nat Rev Cell Biol* 2005)

Figura 2. Struttura della proteina C-MYC

La regione N-terminale contiene tre domini molto conservati detti Mycbox I-II-III. Sequenze di interazione con altre proteine situate tra i domini Mycbox I e II sono fondamentali per l'attività della proteina e compongono il dominio di attivazione trascrizionale (TAD). La treonina in posizione 58 (T58), la serina in posizione 62 (T62) e la treonina in posizione 71 (T71) sono i principali siti di fosforilazione di MYC e sono *target* rispettivamente delle chinasi GSK3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e ROCK (*rho-dependent kinase*). Nella regione C-terminale si trovano i domini *helix-loop-helix* (HLH) e *leucine zipper* (LZ) di dimerizzazione e la regione basica (BR) di interazione con il DNA. I domini di legame di MYC che interagiscono con specifiche proteine sono indicati sopra l'intera struttura proteica, se da tale interazione deriva un'attivazione trascrizionale i domini sono raffigurati in verde e se invece deriva una repressione trascrizionale sono rappresentati in rosso. Inoltre se tale interazione causa un'inibizione della funzione di MYC i domini di legame sono rappresentati in blu. Nel caso l'interazione sia in grado di attivare e di reprimere la trascrizione i domini sono tratteggiati. Infine i domini grigi indicano i domini di MYC che legano proteine la cui funzione non è ancora chiara. La proteina FBW7 (*F-box and WD repeat domain-containing 7*) non è un cofattore trascrizionale, ma fa parte del complesso ubiquitina ligasi E3 ed è implicata nella regolazione della stabilità di MYC. La proteina SKP2 (*S-phase kinase-associated protein 2*) può agire sia da cofattore cotrascrizionale di MYC sia come parte del complesso ubiquitina ligasi E3 che ne regola la degradazione proteosomica. P300 e TIP60 sono istone acetiltransferasi. TIP48, TIP49 e P400 sono ATPasi esameriche e fanno parte del complesso di rimodellamento della cromatina SWI/SNF. TRAPP è una proteina adattatrice indispensabile per l'azione delle acetiltransferasi.

2.3 C-MYC e ciclo cellulare

Una delle funzioni principali di C-MYC è la regolazione del ciclo cellulare. Studi *in vitro* dimostrano che nelle cellule quiescenti la sua espressione è pressochè nulla. Quando invece le cellule sono indotte a proliferare o con siero o con un qualsiasi altro stimolo mitogeno, l'RNA messaggero di C-MYC è rapidamente trascritto e tradotto ed i livelli della proteina aumentano nel giro di 1-2 ore e le cellule entrano nella fase G1 del ciclo cellulare. Successivamente i livelli di RNA messaggero e proteina si riducono notevolmente (Amati, 2004). Studi recenti indicano che l'ablazione di entrambi gli alleli del gene *C-MYC* in linee cellulari di fibroblasti di ratto provoca la riduzione del tasso di proliferazione e problemi generali a livello della sintesi di RNA messaggero e delle proteine (Mateyak et al, 1997). I meccanismi con cui C-MYC influenza il ciclo cellulare sono stati oggetto di studio da parte di molti gruppi di ricerca, che hanno evidenziato un elevato numero di funzioni cellulari e di geni bersaglio di C-MYC. Il quadro che ne emerge è tuttora notevolmente complesso. Tra i geni che sono direttamente stimolati da C-MYC ci sono molti geni chiave del ciclo cellulare, tra i quali le cicline. La deregolazione in senso positivo dell'espressione di tale oncogene porta ad un accumulo di ciclina D1, A ed E (Jansen-Durr et al, 1993; Daksis et al, 1994; Hanson et al, 1994; Hoang et al, 1994). Inoltre C-MYC è in grado di promuovere la trascrizione dei geni codificanti per le chinasi ciclina dipendenti CDK2 e CDK4, *partner* catalitici rispettivamente delle cicline E ed A e delle cicline D (Hermeking et al, 2000). L'attività del complesso CDK4-ciclina D porta all'iperfosforilazione di pRb, ed il conseguente rilascio del fattore di trascrizione E2F, fondamentale per la trascrizione delle cicline tra cui anche la ciclina E, che risulta essere attivata da C-MYC sia direttamente che indirettamente (Obaya & Sedivy, 2002). L'attività del complesso CDK2-ciclina E è poi fondamentale per la progressione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare (Steiner et al, 1995). Inoltre la proteina CDK4 indotta, in eccesso, da C-MYC è coinvolta nel sequestro di p21^{Cip1} e p27^{Kip1}, inibitori delle CDK (Hermeking et al, 2000). La stessa degradazione dell'inibitore p27^{Kip1} dipende da due geni, la cui trascrizione è regolata da C-MYC, *CUL1* (cullina) e *CKS*. Prevenendo il legame di p27^{Kip1} al complesso CDK2-ciclina E, C-MYC consente a tale complesso di essere accessibile alla fosforilazione da parte della chinasi CAK (*CDK-activating kinase*), che fosforila la ciclina e di conseguenza la attiva (Obaya et al, 2002).

2.4 Regolazione della proteina C-MYC

La proteina C-MYC è sottoposta a molti tipi di modificazioni post-traduzionali comprendenti glicosilazione, acetilazione, ubiquitinazione e fosforilazione. In particolare la fosforilazione si è dimostrata fondamentale per regolare la sua attività biologica. Studi *in vitro* hanno evidenziato che mutazioni a livello di siti di fosforilazione localizzati nella regione N-terminale aumentano l'attività trasformante di C-MYC agendo sulla sua attività trascrizionale oltre che sulla sua stabilizzazione. I siti di fosforilazione nella zona N-terminale sono la treonina 58 (T58) e le serine 62-71-82-164 (S62-71-82-164) (Lutterbach & Hann, 1999). I residui di fosforilazione più studiati sono stati la S62 e la T58 che si trovano all'interno del Mycbox I, poichè spesso sono mutati in diverse linee cellulari tumorali (Bhatia et al, 1993). E' stato dimostrato che la fosforilazione della serina 62 può essere effettuata da diverse chinasi attivate in risposta a stimoli mitogeni e che ha un effetto stabilizzante sulla proteina (Seth et al, 1991). Nel caso della treonina 58, invece, solo la chinasi GSK3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*) è in grado di fosforilarla (Gregory et al, 2003). Poiché la chinasi GSK3 β riconosce preferenzialmente proteine che hanno già una fosforilazione sui residui di serina, diversi studi indicano che la fosforilazione a livello della S62 facilita il riconoscimento di C-MYC da parte di GSK3 β (Lutterbach & Hann, 1994). Quindi la fosforilazione di T58 dipende sia dall'attività della GSK3 β che dall'attività delle chinasi che fosforilano S62. La fosforilazione del residuo T58, a differenza del residuo S62, ha un ruolo essenziale nella regolazione della proteolisi di C-MYC. La proteina C-MYC è altamente instabile ed ha un'emivita di 20-30 minuti (Hann et al, 1983). La regolazione della sua degradazione è molto critica, perché la perturbazione di questo meccanismo, dato il ruolo che C-MYC svolge nel controllo della proliferazione, può contribuire alla tumorigenesi (Shindo et al, 1993). Il principale meccanismo di proteolisi di C-MYC è la degradazione proteosomica mediata dall'ubiquitina. Difatti l'inibizione del proteosoma con inibitori specifici, quali ad esempio MG132, stabilizza fortemente C-MYC (Salghetti et al, 1999).

La prima proteina F-box identificata come partecipante al complesso ubiquitina ligasi E3 SCF^{SKP2}, specifico per C-MYC, è SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2). SKP2 è una proteina dotata del motivo strutturale di 50 residui aminoacidici, detto F-box, che è fondamentale nel riconoscimento del substrato da ubiquitinizzare (Kipreos & Pagano, 2000). I complessi SCF, che funzionano da ubiquitina ligasi E3, sono formati da 4 proteine principali: SKP1 (*S-phase kinase-associated protein 1*), CUL1(cullina), Rbx1 (*ring-box*

portein 1) e da una proteina F-box che conferisce la specificità di substrato. Mutazioni del residuo T58 di C-MYC non interferiscono con l'ubiquitinizzazione SKP2-dipendente, che quindi non richiede la fosforilazione di questo residuo e che indirizza C-MYC verso la degradazione nel proteosoma (Von der Lehr et al, 2003). Inoltre SKP2 agisce anche da cofattore trascrizionale, in quanto partecipa con i complessi che si legano al dominio di transattivazione di C-MYC ed è in grado di attivare o di reprimere la trascrizione di diversi geni, tra cui i geni che codificano per la protomiosina e la ciclina D2 (Muratani & Tansey, 2003).

Un altro complesso ubiquitina ligasi che riconosce fra i vari substrati anche C-MYC è SCF^{FBW7}, in cui la proteina F-box è FBW7 (*F-box and WD repeat domain-containing 7*) (Welcker et al, 2008). Tale complesso è in grado di ubiquitinare il TAD di C-MYC in modo fosforilazione dipendente, richiedendo infatti che C-MYC sia doppiamente fosforilato sui residui S62 e T58 (Welcker et al, 2004). Dal momento che la fosforilazione di T58 richiede l'attività della chinasi GSK3 β , se quest'ultima è inibita viene anche inibita la degradazione di C-MYC mediata dal complesso SCF^{FBW7}. Il gene FBW7 codifica per tre diverse isoforme, FBW7 α - β - γ , localizzate in differenti compartimenti subcellulari. Sia l'isoforma nucleoplasmatica FBW7 α che l'isoforma nucleolare FBW7 γ legano C-MYC, mentre la forma citoplasmatica FBW7 β non lo lega. La proteina C-MYC è stabilizzata da USP28 (*ubiquitin specific protease 28*), proteasi ubiquitina specifica che interagisce con FBW7 α , antagonizzandone l'attività e che è attivata in molte forme di tumore colon-rettile (Popov et al, 2007). USP28 è, quindi, in grado di de-ubiquitinizzare e quindi stabilizzare C-MYC nel nucleoplasma e non nel nucleolo dove C-MYC interagisce con FBW7 γ , che ne media la degradazione (Welcker et al, 2004). Il ruolo di C-MYC a livello del nucleolo non è ancora chiaro. Le evidenze attuali indicano che C-MYC possa interagire con la RNA polimerasi I nucleolare e stimolare l'espressione degli RNA ribosomiali (Grandori et al, 2005). A differenza di SKP2, la cui espressione aumenta in seguito allo stimolo mitogeno raggiungendo un picco massimo nella fase S, l'espressione di FBW7 è continua e non è regolata dal ciclo cellulare, ma come detto sopra, la sua attività è regolata dalla fosforilazione GSK3 β dipendente.

La **Figura 3**, schematizza i due pathway principali che regolano la degradazione di C-MYC, uno attivo durante il ciclo cellulare e l'altro in assenza di stimoli mitogeni. Durante il ciclo cellulare, gli stimoli mitogeni innescano delle cascate di traduzione del segnale che causano l'attivazione della cascata chinasi RAS-RAF-MAPK-ERK. Tra i geni bersaglio

di queste chinasi, C-MYC è fosforilato nel residuo S62 ed una volta stabilizzato da questa fosforilazione esplica la sua attività trascrizionale, promuovendo la progressione del ciclo cellulare. L'attivazione di altre vie della trasduzione del segnale come quella della fosfatidil-inositolo 3 chinasi (PI3K) risulta invece nella disattivazione di GSK3 β . Durante il ciclo cellulare la degradazione di C-MYC è quindi regolata dal complesso SCF^{SKP2}. Al cessare degli stimoli mitogeni la chinasi GSK3 β non è più inibita ed è perciò in grado di fosforilare il residui T58 di C-MYC. La proteina C-MYC, fosforilata sia a livello del residuo T58 sia a livello del residuo S62, è riconosciuta da una prolyl isomerasi (PIN1) che adopera un cambio conformazionale da cis a trans necessario per il riconoscimento da parte della serina/treonina protein fosfatasi 2 (PP2A) che defosforila il residuo S62. A questo punto il complesso SCF^{FBW7} si lega a C-MYC mediandone la poliubiquitinizzazione e la successiva degradazione a carico del proteosoma. Questo tipo di degradazione è ciclo cellulare indipendente (Amati, 2004).

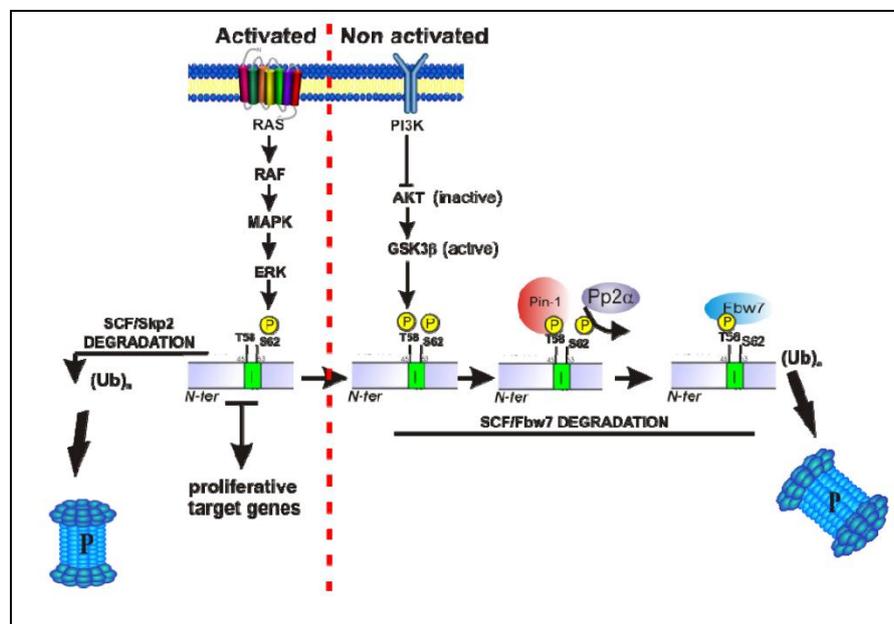


Figura 3. Regolazione della degradazione della proteina C-MYC

2.5 C-MYC e differenziamento cellulare

Numerosi studi hanno sottolineato l'importanza del network di C-MYC/MAX/MAD nel regolare il passaggio dalla proliferazione al differenziamento (Grandori et al, 2000). In generale l'espressione dei differenti membri della famiglia MAD/MXII coincide con la down-regolazione dell'espressione di C-MYC non appena le cellule iniziano il processo differenziativo. La proteina C-MYC è espressa nelle cellule proliferanti immature mentre le proteine della famiglia MAD, che competono con C-MYC per il legame a MAX, sono espresse in cellule differenziate o che differenziano (James & Eisenman, 2002). Nonostante si possa affermare che la riduzione dell'espressione di C-MYC sia fondamentale per il processo differenziativo, rimangono ancora numerosi aspetti da chiarire.

Capitolo III

Trasportatori ABC

3.1 Generalità

Un trasportatore di membrana è un polipeptide transmembrana in grado di mediare il trasporto di ioni o molecole polari di medie dimensioni (amminoacidi, zuccheri, nucleotidi) all'interno o all'esterno della cellula o tra compartimenti diversi della cellula.

La presenza di trasportatori di membrana è indispensabile, in quanto solamente alcuni composti sono in grado di diffondere liberamente attraverso la membrana plasmatica; tutti gli altri hanno bisogno di metodi alternativi. Sebbene esista un gran numero di diversi trasportatori, questi possiedono alcune caratteristiche in comune:

- il trasporto è selettivo per il substrato che deve essere trasportato ed è basato su interazioni steriche tra il trasportatore e la molecola trasportata;
- la traslocazione attraverso la membrana è legata ad un cambiamento conformazionale della proteina trasportatrice, e più specificamente all'apertura/chiusura di un canale all'interno del polipeptide;
- il trasporto può richiedere o meno dispendio energetico, dando vita rispettivamente ad un trasporto attivo o passivo;
- tutte le molecole trasportatrici conosciute sono proteine transmembrana, che attraversano cioè integralmente la membrana plasmatica.

I trasportatori di membrana possono essere suddivisi in quattro classi principali:

- ATPasi di trasporto: sono delle pompe ioniche che sfruttano l'idrolisi di ATP per trasportare ioni o protoni contro il gradiente di concentrazione.
- Canali ionici: sono delle proteine costituite tendenzialmente da più subunità, inserite nelle membrane cellulari in modo da formare un canale, e mediano il trasporto di ioni tra l'ambiente extracellulare ed il citoplasma o tra compartimenti diversi della cellula. Il trasporto è passivo e segue il gradiente degli ioni interessati, con una velocità proporzionale alla concentrazione più alta presente su uno dei due lati della membrana.
- Permeasi: sono solitamente costituite da 12 regioni transmembrana poste in posizione concentrica a formare un canale e sono responsabili del trasporto passivo di piccole e medie molecole polari, come zuccheri, aminoacidi e nucleotidi,

all'interno della cellula.

- Cotrasportatori: sono proteine che mediano il trasporto simultaneo di due ioni, o di una ione e una molecola. Le due molecole possono essere internalizzate in antiporto, quando la direzione di movimento delle due è opposta, o in simporto, quando la direzione di movimento delle due è la stessa. I cotrasportatori sono in grado di trasportare un substrato contro il suo gradiente di concentrazione, sfruttando l'energia ricavata dalla differenza di concentrazione dell'altro substrato.

I trasportatori ABC sono una famiglia di 50 proteine di membrana (suddivise in 7 sottofamiglie: A, B, C, D, E, F, G) che condividono omologie di sequenza e di struttura, legano l'ATP e ne usano l'energia per veicolare diverse molecole (composti idrofobici, ioni metallici, peptidi, zuccheri, ecc) attraverso le membrane cellulari (membrana plasmatica, reticolo endoplasmatico, perossisomi, mitocondri).

I geni che codificano per tali trasportatori sono localizzati su 16 diversi cromosomi autosomici e 2 geni (ABCB7 e ABCD1) sono localizzati sul cromosoma X (**Tabella 1**).

| Symbol | Alias | Location | Mouse Location | Expression | Function |
|--------|-----------------|------------|----------------|------------------------|--------------------------------|
| ABCA1 | ABC1 | 9q51.1 | 4 29.1 | Ubiquitous | Cholesterol efflux onto HDL |
| ABCA2 | ABC2 | 9q34 | 2 12.6 | Brain | Drug resistance |
| ABCA3 | ABC3, ABCC | 16p13.3 | | Lung | |
| ABCA4 | ABCR | 1p22.1-p21 | 3 61.8 | Rod photoreceptors | N-retinidiene-PE efflux |
| ABCA5 | | 17q24 | 11 69 | Muscle, heart, testes | |
| ABCA6 | | 17q24 | 11 69 | Liver | |
| ABCA7 | | 19p13.3 | 10 44 | Spleen, thymus | |
| ABCA8 | | 17q24 | 11 69 | Ovary | |
| ABCA9 | | 17q24 | 11 69 | Heart | |
| ABCA10 | | 17q24 | | Muscle, heart | |
| ABCA12 | | 2q34 | | Stomach | |
| ABCA13 | | 7p11-q11 | | Low in all tissues | |
| ABCB1 | PGY1, MDR | 17p21.1 | 5 1.0 | Adrenal, kidney, brain | Multidrug resistance |
| ABCB2 | TAP1 | 6p21 | 17 18.6 | All cells | Peptide transport |
| ABCB3 | TAP2 | 6p21 | 17 18.6 | All cells | Peptide transport |
| ABCB4 | PGY3 | 7q21.1 | 5 1.0 | Liver | PC transport |
| ABCB5 | | 7p14 | | Ubiquitous | |
| ABCB6 | MTABC3 | 2q36 | | Mitochondria | Iron transport |
| ABCB7 | ABC7 | Xq12-q13 | X 39 | Mitochondria | Fe/S cluster transport |
| ABCB8 | MABC1 | 7q36 | | Mitochondria | |
| ABCB9 | | 13q24 | | Heart, brain | |
| ABCB10 | MTABC2 | 1q42 | 8 67 | Mitochondria | |
| ABCB11 | SPGP | 2q24 | 2 39 | Liver | Bile salt transport |
| ABCC1 | MRP1 | 16p13.1 | 16 | Lung, testes, PBMC | Drug resistance |
| ABCC2 | MRP2 | 10q24 | 19 43 | Liver | Organic anion efflux |
| ABCC3 | MRP3 | 17q21.3 | | Lung, intestine, liver | Drug resistance |
| ABCC4 | MRP4 | 13q32 | | Prostate | Nucleoside transport |
| ABCC5 | MRP5 | 3q27 | 16 14 | Ubiquitous | Nucleoside transport |
| ABCC6 | MRP6 | 16p13.1 | | Kidney, liver | |
| CFTR | ABCC7 | 7q31.2 | 6 3.1 | Exocrine tissues | Chloride ion channel |
| ABCC8 | SUR | 11p15.1 | 7 41 | Pancreas | Sulfonylurea receptor |
| ABCC9 | SUR2 | 12p12.1 | 6 70 | Heart, muscle | |
| ABCC10 | MRP7 | 6p21 | | Low in all tissues | |
| ABCC11 | | 16q11-q12 | | Low in all tissues | |
| ABCC12 | | 16q11-q12 | | Low in all tissues | |
| ABCC13 | | 21q11.2 | | Fetal, liver | |
| ABCD1 | ALD | Xq28 | X 29.5 | Peroxisomes | VLCEFA transport regulation |
| ABCD2 | ALDL1, ALDR | 13q11-q12 | 15 E-F | Peroxisomes | |
| ABCD3 | FXMP1, PMP70 | 1p22-p21 | 3 56.6 | Peroxisomes | |
| ABCD4 | PMP60, P70R | 14q24.3 | 12 39 | Peroxisomes | |
| ABCE1 | OABP, RNS4f | 4q51 | | Ovary, testes, spleen | Oligoadenylate binding protein |
| ABCF1 | ABCS0 | 6p21.33 | 17 20.5 | Ubiquitous | |
| ABCF2 | | 7q36 | 13 40 | Ubiquitous | |
| ABCF3 | | 3q25 | 16 22 | Ubiquitous | |
| ABCG1 | ABCS, White | 21q22.3 | 17 A2-B | Ubiquitous | Cholesterol transport? |
| ABCG2 | ABCP, MXR, BCRP | 4q22 | 6 28-29 | Placenta, intestine | Toxin efflux, drug resistance |
| ABCG3 | | 14q22 | | Spleen, thymus | Peptide transport |
| ABCG4 | White2 | 11q23 | 5 59 | Liver | |
| ABCG5 | White3 | 2p21 | 17 | Liver, intestine | Sterol transport |
| ABCG8 | | 2p21 | 17 | Liver, intestine | Sterol transport |

PBMC, peripheral blood mononuclear cells; VLCEFA, very long chain fatty acids.

Tabella 1. Lista dei geni ABC (tratta da Dean et al, J Lipid Res 2001).

3.2 Struttura generale dei trasportatori ABC e meccanismo di trasporto

Generalmente un trasportatore ABC, contiene due siti di legame per l'ATP (*ATP-binding domains* o *nucleotide binding folds* = *NBF*) localizzati sul lato citoplasmatico, e due gruppi di domini transmembrana (TM), tipicamente contenenti 6 α -eliche transmembrana ciascuno, nel caso di un "trasportatore completo" (*full transporters*). Esistono però anche trasportatori aventi domini TM con un numero variabile di α -eliche, che va da 6 ad 11, per esempio il trasportatore ABCC1 contiene 17 α -eliche totali (Hollenstein et al, 2007). Ci sono anche trasportatori ABC definiti "emitrasportatori" (*half transporters*) che contengono un solo sito NBF, un solo dominio TM e 3 eliche transmembrana, che si assemblano in forma di omodimeri o eterodimeri per formare un trasportatore completo (**Figura 4**).

I siti di legame per l'ATP (NBF) contengono tre domini, denominati "*Walker A e B domains*" presenti in tutte le proteine che legano ATP (*ATP-binding proteins*), assieme a domini caratteristici (domini C) localizzati in prossimità del *Walker B domain*. Il dominio C è specifico dei trasportatori ABC e li distingue dalle altre *ATP-binding proteins*. Nei vertebrati i trasportatori delle famiglie A e C sono composti esclusivamente da trasportatori completi, i membri delle famiglie D, G ed F da emitrasportatori ed infine i membri della famiglia B da entrambi i tipi. I membri appartenenti alle famiglie E ed F sono costituiti da proteine che contengono due siti NBF e nessun dominio TM. Queste proteine non sono dei veri e propri trasportatori, ma discendono chiaramente dalla famiglia dei trasportatori ABC a causa dei loro domini NBF (Dean, 2005).

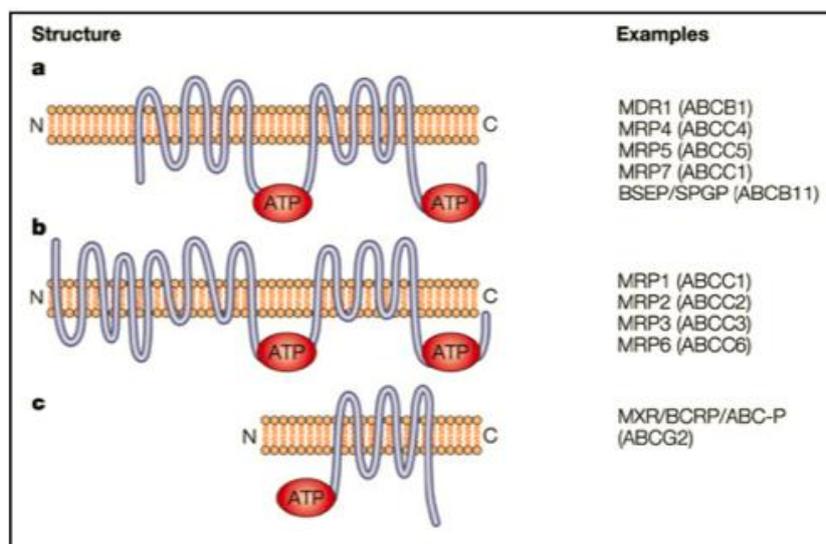


Figura 4. Struttura dei trasportatori ABC (tratto da Gottesman et al, Nat Rev Cancer, 2001)

I trasportatori ABC trasportano i loro substrati unidirezionalmente, tipicamente dal citoplasma al di fuori della cellula. Il meccanismo di trasporto richiede l'idrolisi di 2 molecole di ATP e comprende varie fasi (**Figura 5**):

- 1) riconoscimento e legame dei domini TM con il substrato da trasportare;
- 2) il legame del substrato con il dominio TM induce l'attività ATPasica del trasportatore che, in seguito all'idrolisi di una prima molecola di ATP, va incontro ad un cambiamento conformazionale con conseguente trasporto del substrato in una regione intra-membrana;
- 3) il substrato viene poi veicolato al di fuori della membrana plasmatica con conseguente idrolisi di una seconda molecola di ATP, necessaria anche per riportare il trasportatore allo stato conformazionale iniziale ed essere così pronto per legare e trasportare un'altra molecola di substrato (completamento del ciclo catalitico) (Altemberg, 2004; Sauna et al, 2001).

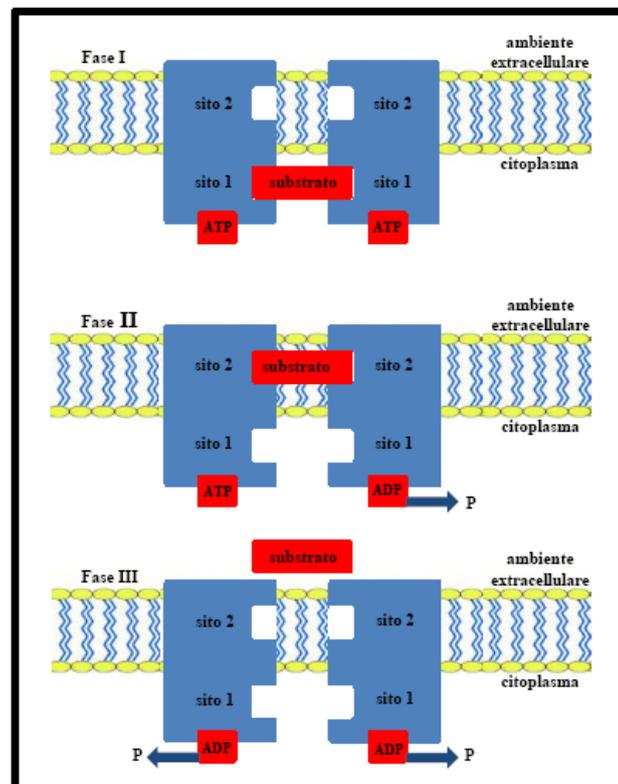


Figura 5. Meccanismo d'azione dei trasportatori ABC

3.2.1 Trasportatori ABC della Famiglia A

La famiglia A è composta da 12 trasportatori ABC denominati da A1 ad A13, suddivisa a sua volta in 2 sottofamiglie. La prima sottofamiglia include 7 geni (ABCA1-A4, A7, A12, A13) che si localizzano su 6 diversi cromosomi, mentre la seconda sottofamiglia include 5 geni (ABCA5-A6, A8-A10) che si localizzano tutti sul braccio lungo del cromosoma 17 (17q24). Strutturalmente sono tutti trasportatori completi, con una catena amminoacidica che va da 1543 a 5058 amminoacidi. Confrontando le sequenze amminoacidiche di questi trasportatori si possono osservare omologie di sequenza che vanno dal 28% (ABCA8/ABCA12) al 72% (ABCA8/ABCA9). L'analisi filogenetica suggerisce che tutti i geni della famiglia A si siano evoluti da un gene ancestrale comune per poi disperdersi all'interno del genoma.

I trasportatori ABC della famiglia A sembrano mediare il trasporto di una grande quantità di composti lipidici fisiologici. Mutazioni che causano una loro perdita di funzione portano all'insorgenza di diverse patologie. ABCA1 è espresso in una moltitudine di organi umani, soprattutto nella placenta, nel fegato, nei polmoni, nelle ghiandole surrenali e nei tessuti fetali.

ABCA1 è coinvolto nella regolazione dell'omeostasi lipidica in quanto è implicato nel controllo del passaggio di fosfolipidi di membrana, principalmente fosfatidilcolina, e di colesterolo che vanno a legarsi alle apolipoproteine, costituenti delle lipoproteine, deputate al trasporto di colesterolo e trigliceridi attraverso la circolazione ai vari organi e tessuti.

L'espressione di ABCA1 è a sua volta influenzata dall'omeostasi lipidica, infatti è up-regolata dall'entrata di colesterolo nei macrofagi ed è soppressa dall'efflusso di colesterolo mediato dalla lipoproteina ad alta densità 3 (HDL, *High Density Lipoprotein 3*), una caratteristica che condivide con altri trasportatori ABC della famiglia A. Mutazioni di ABCA1 causano l'insorgenza della sindrome familiare da carenza di HDL, in quanto ABCA1 è il principale regolatore del metabolismo delle HDL (Dean et al, 2001).

ABCA2 è altamente espresso negli oligodendrociti cerebrali dove sembra svolgere un ruolo importante nell'omeostasi lipidica. Inoltre studi recenti hanno evidenziato un suo coinvolgimento nell'insorgenza di fenomeni di farmacoresistenza verso diversi chemioterapici, tra cui doxorubicina, methotrexate, vinblastina e mitoxantrone (Gatti et al, 2009).

ABCA3 è maggiormente espresso nel polmone (nei corpi lamellari degli alveoli), ma è anche espresso nel cervello, nel cuore e nel pancreas. In particolare a livello polmonare è

coinvolto nel metabolismo del surfattante, miscela di lipidi costituita prevalentemente da fosfolipidi e proteine, che è essenziale per la normale respirazione perché riveste le vie aeree ed abbassa la tensione superficiale dell'interfaccia aria-liquido impedendo così il collasso degli alveoli alla fine dell'espiazione. Mutazioni a carico del gene che codifica per ABCA3 portano all'insorgenza della sindrome neonatale da carenza di surfattante (*neonatal surfactant deficiency*) (Kaminski et al, 2006).

ABCA4 è espresso solo a livello della retina. Se mutato causa retinopatia in quanto si genera un accumulo di derivati retinici tossici che causano una degenerazione delle cellule retiniche.

La funzione dell'ABCA7 non è ancora del tutto chiara, anche se il *pattern* di espressione suggerisce un suo ruolo nell'omeostasi lipidica delle cellule del sistema immunitario. Risulta infatti essere espresso principalmente nella milza, nel timo, nei linfonodi, nella trachea, nel midollo osseo e nel cervello (Tanaka et al, 2011). Altri studi dimostrano che ABCA7 causa un accumulo a livello del doppio strato lipidico delle membrane cellulari di ceramide e ne regola il trasporto durante il differenziamento dei cheratinociti (Kielar et al, 2003). Nel cervello ABCA7 è espresso prevalentemente nelle cellule della microglia, cellule deputate alla rimozione tramite fagocitosi di detriti apoptotici. Si suppone che ABCA7 in tali cellule promuova la rimozione delle placche amiloidi e dei detriti neuronali derivati da malattie neurodegenerative, tra cui l' Alzheimer. Infatti la presenza di ABCA7 porta all'inibizione della secrezione della proteina β -amiloide, maggiore costituente delle placche amiloidi, anche se il meccanismo attraverso il quale avviene questa inibizione resta ancora sconosciuto. ABCA7 quindi sembra essere un fattore di protezione dall'Alzheimer (Piehler et al, 2012).

Infine ABCA12 è espresso nella placenta, nella pelle, nei testicoli e nel cervello fetale. Se mutato causa ittiosi, ossia una serie di disordini genetici della pelle che comportano lo sviluppo di una pelle secca, ispessita e squamosa (Kaminski et al, 2006).

3.2.2 Trasportatori ABC della Famiglia B (*Multidrug resistance, MDR*)

I trasportatori appartenenti alla famiglia B sono 11, di cui 4 sono trasportatori completi e 7 sono emitrasportatori. Questa sottofamiglia di proteine è l'unica ad avere entrambi i tipi di trasportatore.

Il gene *MDR1* (*multidrug resistance 1*), localizzato sul braccio corto del cromosoma 7 (7p21), codifica per il trasportatore ABCB1 che è stato il primo trasportatore ABC ad

essere scoperto. In condizioni fisiologiche tale trasportatore è espresso principalmente nel fegato, nei reni e nella barriera ematoencefalica, dove esplica la sua funzione protettiva nei confronti di tossine endogene, derivanti dal metabolismo cellulare e da tossine esogene, quali per esempio i chemioterapici. ABCB1 è risultato essere sovraespresso in parecchie linee cellulari tumorali che manifestano fenomeni di farmacoresistenza pleiotropica (MDR, *multidrug resistance*). Tale trasportatore è infatti in grado di trasportare una gran varietà di substrati idrofobici, tra cui diversi chemioterapici che mostrano struttura chimica e funzione anche molto diverse tra loro, come per esempio la doxorubicina, la colchicina, la vinblastina, il methotrexate, ed il mitoxantrone. Nell'osteosarcoma il livello di espressione di ABCB1 è un fattore prognostico molto importante in quanto l'elevata espressione del trasportatore, al momento della diagnosi, correla con una prognosi avversa (Baldini et al, 1995; Pako & Ioannidis, 2003; Serra et al, 2003, 2006).

I trasportatori ABCB4 e ABCB11 sono entrambi espressi nel fegato, il primo è coinvolto nella secrezione della fosfatidilcolina mentre il secondo nella secrezione dei sali biliari. Mutazioni a carico di tali trasportatori causano diverse forme di colestasi intraepatica familiare progressiva (PFIC: *progressive familial intrahepatic cholestasis*), caratterizzate da un'alterata secrezione della bile che comporta un accumulo nel plasma di sostanze che, in condizioni fisiologiche, sono escrete nella bile come gli acidi biliari, il colesterolo e la bilirubina.

I trasportatori ABCB2 e ABCB3, codificati rispettivamente dai geni *TAP1* e *TAP2*, sono degli emitrasportatori che formano degli eterodimeri coinvolti nel processo di presentazione dell'antigene. Infatti gli antigeni dopo essere stati fagocitati e digeriti in piccoli peptidi vengono veicolati dai trasportatori ABCB2 e ABCB3 nel reticolo endoplasmatico dove si associano ai geni del complesso di istocompatibilità di classe I (MHC I) per poi essere esposti sulla superficie cellulare ed innescare la risposta immunitaria da parte dei linfociti t. Difetti in questi trasportatori causano una condizione di grave immunosoppressione.

Gli emitrasportatori appartenenti a questa famiglia sono espressi nei lisosomi (ABCB9) e nei mitocondri (ABCB6, B7, B8, B10), e sembrano mediare la biogenesi delle proteine contenenti cluster ferro-zolfo e l'omeostasi del ferro. Mutazioni a carico di questi trasportatori sono causa di parecchi disturbi, soprattutto al fegato, organo in cui sono maggiormente espressi, ai reni e alla mammella (Dean et al, 2001).

3.2.3 *Trasportatori ABC della famiglia C (Multidrug resistance protein, MRP)*

La famiglia C è costituita da 12 trasportatori completi, che svolgono diversi ruoli tra cui il trasporto di ioni e la secrezione di tossine, inoltre sono coinvolti in meccanismi di trasduzione del segnale. Recentemente è stato scoperto il tredicesimo membro appartenente a tale famiglia, il trasportatore ABCC13, codificato da uno pseudogene che non è in grado di codificare una proteina funzionale. ABCC13 è espresso ad elevati livelli nel fegato fetale ed in maniera molto ridotta nel midollo osseo adulto e nei linfociti presenti nel sangue periferico e non è espresso nelle cellule ematopoietiche differenziate. Tutto questo fa supporre un coinvolgimento di ABCC13 nell'emopoiesi, anche se non è ancora noto in che modo tale trasportatore possa essere coinvolto (Yabuuchi et al, 2002).

I geni *MRP1-5* codificano i trasportatori ABCC1-5, che sono tutti delle pompe di anioni organici, ma che differiscono per specificità di substrato, distribuzione tissutale e localizzazione intracellulare. I membri di questa famiglia sono suddivisi in 2 diversi gruppi, in base alla loro struttura proteica, un primo gruppo costituito da trasportatori con 17 domini TM (ABCC1, 2, 3 e 6) ed un secondo gruppo costituito da trasportatori con 12 domini TM (ABCC4, 5, 10 e 11). Il trasportatore ABCC7, più noto come CFTR (*cystic fibrotransmembrane conductance regulator*) è presente sulla membrana apicale delle cellule epiteliali delle vie aeree, del pancreas, dell'intestino, delle ghiandole sudoripare, delle ghiandole salivari e dei dotti deferenti. ABCC7 è l'unica proteina ABC ad essere un canale transmembrana del cloro, attivato dalla proteina chinasi A mediante AMP ciclico, che regola gli scambi elettrolitici tra l'interno e l'esterno delle cellule di molte ghiandole dell'organismo (Quinton et al, 1999). La sua alterazione è legata allo sviluppo della fibrosi cistica (FC), malattia genetica caratterizzata da anomalie del trasporto di ioni cloro attraverso le membrane cellulari e, in generale, della produzione delle secrezioni esocrine dell'organismo, che risultano dense e viscosi, causando un danno progressivo degli organi coinvolti.

Il trasportatore ABCC8 è espresso unicamente nel pancreas, noto anche come SUR-1 (recettore per le sulfoniluree), che insieme a KIR6 costituisce le subunità che formano il canale del potassio ATP-dipendente nelle cellule β -pancreatiche. Il metabolismo del glucosio aumentando il rapporto ATP/ADP, inibisce i canali e quindi la fuoriuscita di K^+ , a questo consegue la depolarizzazione della membrana cellulare e l'apertura dei canali del calcio che innalzano la concentrazione intracellulare degli ioni Ca^{++} causando la secrezione di insulina. Anomalie di ABCC8 sono collegate all'insorgenza della ipoglicemia da

iperinsulinemia persistente dell'infanzia (PHHI: *persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy*), malattia genetica caratterizzata da elevati livelli di insulina che comportano un costante stato di ipoglicemia (Dean et al, 2001). Il trasportatore ABCC9, noto anche come SUR-2, costituisce, invece, la parte regolatoria del canale del potassio ATP-dipendente nelle cellule β -pancreatiche. Anomalie di tale trasportatore causano malattie metaboliche come per esempio il diabete.

I restanti 9 membri della famiglia C sono geni coinvolti nell'insorgenza di farmacoresistenza (geni *MRP*). ABCC1 (*MRP1*) è stato il primo trasportatore di questa famiglia ad essere stato identificato ed è in grado di trasportare molti composti tossici allo stato nativo o dopo coniugazione con il glutatione (GSH), tra cui farmaci come solfato o glucuronato, farmaci anionici, farmaci anfipatici e anche ossianioni. Gli ossianioni, arsenito e antimonite, e i farmaci basici sono cotrasportati con il GSH. Nonostante questa enorme gamma di substrati trasportati, l'espressione di ABCC1 non è ubiquitaria (Borst & Elferink, 2002).

Come ABCB1, ABCC1 trasporta e conferisce resistenza ad un'ampia varietà di substrati tossici, ma non è essenziale per la crescita e lo sviluppo. ABCC1 può trasportare anche leucotriene C₄, un potente fattore chemiotattico che controlla la migrazione delle cellule dendritiche dai tessuti periferici ai linfonodi (Dean et al, 2001). Nel cervello ABCC1 ha un'importante funzione nel rimuovere i composti tossici dal fluido cerebrospinale. Le cellule cerebrali normalmente contengono alti livelli di ABCC1 nella loro membrana basolaterale, un'assenza di tale trasportatore causa un accumulo eccessivo di farmaci quali per esempio l'etoposide causando gravi problemi di tossicità.

I trasportatori ABCC1 e ABCC2 hanno circa la stessa dimensione e la stessa conformazione strutturale, entrambi trasportano una vasta gamma di anioni organici. Tuttavia, la distribuzione tissutale di ABCC2 è molto più limitata rispetto ad ABCC1, inoltre ABCC2 è espresso sulla membrana apicale delle cellule epiteliali, mentre ABCC1 sulla membrana basolaterale.

ABCC2 svolge un'importante funzione nell'escrezione biliare di metaboliti endogeni come la bilirubina glucuronata, e di molti composti esogeni. ABCC2 è espressa non solo nel fegato, ma anche nei reni e nell'intestino. Mutazioni di ABCC2 causano la sindrome di Dubin – Johnson, una forma di iperbilirubinemia ereditaria, dove la bilirubina può entrare negli epatociti ed essere coniugata con il glucuronato, ma non è secreta nella bile (Dean et al, 2001).

ABCC3 è un trasportatore di anioni organici, espresso come ABCC1 sulla membrana basolaterale delle cellule epiteliali (Kool et al, 1999), ed è presente principalmente, come ABCC2, nel fegato, nell'intestino e nei reni. La forte sovraespressione di ABCC3 nel fegato in caso di colestasi e la sua capacità di trasportare alcuni sali biliari (Hirohashi et al, 2000) portano ad ipotizzare che tale proteina potrebbe svolgere un ruolo importante nel riciclaggio enteroepatico dei sali biliari e nella rimozione degli anioni organici tossici dagli epatociti (Kool et al, 1999).

Diversamente da ABCC1 e ABCC2, ABCC3 non è in grado di trasportare il glutatione (Kool et al, 1999). Questo può spiegare perché le cellule trasfettate con ABCC3 non sono resistenti alla maggior parte dei farmaci antitumorali che sono probabilmente co-transportati con il glutatione da ABCC1-2. ABCC3 è espresso in molte linee cellulari tumorali, ed è in grado di trasportare diversi chemioterapici come methotrexate, cisplatino ed etoposide.

I trasportatori ABCC4 e ABCC5 sono entrambi pompe di anioni organici e sono anche in grado di trasportare nucleotidi ciclici e analoghi di nucleotidi, una classe di anioni organici apparentemente non trasportati da ABCC1-3 o 6. Il trasporto di analoghi di nucleotidi, mediato da ABCC4 e ABCC5, può causare resistenza ai nucleosidi e agli analoghi dei nucleotidi usati in clinica, come è stato osservato su diversi modelli cellulari sovraesprimenti tali trasportatori.

Gli studi iniziali su ABCC5 hanno dimostrato che questa proteina è una pompa anionica organica, in grado di trasportare coloranti organici acidi, s -2,4- dinitrofenilglutatione (GS – DNP), GSH, ed è inibita dal sulfonpirazone. Tuttavia, è stata trovata una correlazione tra l'insorgenza della resistenza al trattamento farmacologico e l'espressione di ABCC5 solo per la 6-mercaptopurina (6MP) e la tioguanina (TG), due basi puriniche non acide (Borst et al, 2002). Cellule con alta espressione di ABCC4 sono altamente resistenti a 9-2-fosfometossietil-adenina (PMEA), analogo dell'adenina, e all'azidotimidina (AZT) e molto meno resistenti ad altri analoghi nucleosidici utilizzati nella terapia antivirale, come per esempio la lamivudina (Schuetz et al, 1999). ABCC4, ma non ABCC5, causa l'insorgenza di resistenza verso il MTX .

Come ABCC4, ABCC5 può trasportare analoghi dei nucleotidi con un anello pirimidinico normale (Borst et al, 2002). L'elenco dei substrati trasportati da ABCC4 e ABCC5 è stato ampliato in modo sostanziale da studi di trasporto vescicolare. Jedlitschky e collaboratori, nel 2000, hanno scoperto che ABCC5 può trasportare il guanosin-monofosfato ciclico

(cGMP) e l'adenosina monofosfato ciclica (cAMP), e un anno dopo Hopper ha scoperto che entrambi i secondi messaggeri sono trasportati anche da ABCC4. L'affinità per cGMP è superiore a quella per cAMP. La distribuzione tissutale di ABCC4 e ABCC5 non è stata ancora del tutto esaminata, studi recenti mostrano la presenza di elevati livelli di ABCC4 nei reni e nella prostata. Mentre ABCC5 ha un'espressione ubiquitaria e mostra elevati livelli nel muscolo scheletrico e nel cervello. L'espressione di ABCC4 correla con una prognosi avversa in pazienti affetti da neuroblastoma ed è anche in grado di conferire resistenza all'irinotecano, inibitore dell'enzima topoisomerasi I, e al suo metabolita attivo SN-38 (Norris et al, 2005). Nessuna malattia umana è stata associata ad alterazioni di ABCC5, e topi *knock-out* per ABCC5 non hanno alcun fenotipo evidente. È possibile, tuttavia, che la sovrapposizione della specificità di substrato di ABCC5 e ABCC4 (e presumibilmente di ABCC11 e ABCC12) possano oscurare la funzione fisiologica di ABCC5.

ABCC6 è espresso principalmente nel fegato e nei reni ed in maniera decisamente ridotta in altri tessuti, se mutato causa pseudoxantoma elastico (PXE), una malattia ereditaria del tessuto connettivo caratterizzata dalla calcificazione e dalla frammentazione progressiva delle fibre elastiche della cute, della retina e della parete delle arterie (Borst et al, 2002; Hendig et al, 2008). Al momento non ci sono studi che dimostrano un coinvolgimento di ABCC6 in fenomeni di farmacoresistenza.

3.2.4 Trasportatori ABC della Famiglia D

I trasportatori appartenenti alla famiglia D sono 4, ABCD1-4, chiamati rispettivamente ALDP, ALDR, PMP70 e PMP69, e sono tutti degli emitrasportatori espressi esclusivamente nei perossisomi, organelli intracellulari contenenti vari enzimi utili per la β -ossidazione.

ACBD1 è responsabile dell'insorgenza dell'adrenoleucodistrofia legata al cromosoma X (ALD), una malattia genetica rara caratterizzata da fenomeni di neurodegenerazione che causano gravi disturbi neurologici. I pazienti affetti da ALD mostrano un accumulo di acidi grassi saturi ma non è ancora chiaro il ruolo di ABCD1 in questo processo. Non sono ancora note le funzioni dei trasportatori ABCD2-D3 e D4, ma vista l'elevata omologia di sequenza con il trasportatore ABCD1 si suppone che siano anch'essi coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi (Dean et al, 2001).

3.2.5 Trasportatori ABC delle Famiglie E ed F

I trasportatori ABC delle famiglie E e F possiedono domini NBD, ma non domini TMD. La famiglia E è costituita da un solo trasportatore, ABCE1, che riconosce l'adenilato prodotto dall'enzima adenilato sintetasi in risposta ad infezioni virali. L'adenilato prodotto attiva a sua volta una endoribonucleasi normalmente latente (RNasi L) nella cellula che degrada i genomi virali ad RNA (Dean et al, 2001). Quindi il trasportatore ABCE1 svolge una funzione di protezione ed è inoltre capace di regolare la stabilità di alcuni RNA messaggeri e della proliferazione cellulare (Dong et al, 2004).

Le conoscenze in merito ai membri della famiglia F sono davvero limitate, è emerso che tali trasportatori risultano essere associati ai ribosomi durante la traduzione delle proteine, anche se il loro ruolo rimane ancora per lo più incompreso (Dean et al, 2001).

3.2.6 Trasportatori ABC della Famiglia G

I membri appartenenti alla famiglia G sono i trasportatori scoperti più di recente ed in totale sono 7 emitrasportatori che hanno un dominio NBF nella parte ammino-terminale ed un dominio TM nella parte carbossi-terminale, esattamente il contrario rispetto agli altri trasportatori ABC.

ABCG1 è altamente espresso nei macrofagi, la sua espressione è indotta dalla presenza di colesterolo in eccesso ed è coinvolto nella regolazione del trasporto del colesterolo stesso. Mentre il trasportatore ABCG3 è altamente espresso nella milza e nel timo suggerendo un potenziale ruolo nel trasporto di specifici peptidi o composti idrofobi nei linfociti (Mickley et al, 2001).

Il trasportatore ABCG4 è altamente espresso nel cervello, dove si suppone svolga un ruolo protettivo. I geni che codificano per i trasportatori ABCG5 e ABCG8 sono entrambi mutati in soggetti affetti da sitosterolemia, malattia genetica causata dalla deregolazione dell'assorbimento del colesterolo e dell'accumulo di steroli, in particolare quelli di origine vegetale. Anche l'espressione e l'attività di questi due trasportatori è regolata dal colesterolo. In generale tali trasportatori ABC risultano essere coinvolti nell'omeostasi lipidica.

Diversi studi hanno dimostrato il coinvolgimento del trasportatore ABCG2 nell'insorgenza di fenomeni di farmacoresistenza in vari tumori umani. ABCG2, noto anche come BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*) è infatti in grado di trasportare diversi chemioterapici, tra cui doxorubicina, methotrexate, mitoxantrone e topotecani. È sovraespresso in

moltissime linee cellulari di tumori resistenti. Le sue funzioni fisiologiche sono numerose, ABCG2 è espresso nella mammella dove contribuisce alla secrezione di nutrienti nel latte materno (Huls et al, 2008), è espresso nei trofoblasti della placenta dove esercita una funzione di protezione nei confronti del feto rispetto a composti tossici presenti nel sangue materno (Dean et al, 2001; Fletcher et al, 2010). ABCG2 svolge ancora altre funzioni di protezione, per esempio blocca l'assorbimento di composti tossici a livello della membrana apicale dell'intestino, della barriera ematoencefalica e nelle membrane di progenitori ematopoietici ed infine sulla membrana apicale di epatociti e reni amplifica l'escrezione di xenobiotici potenzialmente tossici (Vlaming et al, 2009).

3.3 Funzioni fisiologiche dei trasportatori ABC

I trasportatori ABC svolgono ruoli fondamentali in molti processi cellulari. Tra le funzioni fisiologiche più conosciute, ci sono il trasporto di una grande quantità di composti come ioni metallici, peptidi, amminoacidi, zuccheri e lipidi, attraverso le membrane plasmatiche, per regolarne la concentrazione intracellulare. Inoltre il ruolo decisamente più conosciuto e importante è quello di protezione della cellula da agenti xenobiotici. Infatti gli ABC riconoscono ed estrudono dal citoplasma i composti tossici e i loro metaboliti. Sono espressi in diversi tessuti normali, in particolare nel fegato, nei reni, nell'intestino, nella mammella, nella placenta e nella barriera ematoencefalica.

ABCB1 ad esempio, largamente espresso a livello della barriera ematoencefalica, protegge il sistema nervoso centrale da tossine endogene (derivanti dal ciclo cellulare) ed esogene (farmaci). ABCC2 è localizzato sulla membrana apicale degli epatociti dove trasporta la bilirubina nella bile. Anche ABCC3 e ABCC6 sono localizzati sulla membrana degli epatociti e trasportano anioni organici dal fegato al circolo sanguigno. ABCG2 nella mammella contribuisce alla secrezione di nutrienti nel latte materno (Huls et al, 2008).

3.4 Trasportatori ABC e Multidrug resistance (MDR)

Le cellule tumorali possono presentare una resistenza naturale (o intrinseca) ai farmaci antitumorali o una resistenza acquisita dopo alcuni cicli di chemioterapia. La resistenza naturale è già presente all'esordio della malattia, prima di qualsiasi trattamento, dovuta alle caratteristiche genetiche dell'individuo, mentre la farmacoresistenza acquisita insorge in corso di trattamento farmacologico, a volte anche sulla base di una pre-esistente farmacoresistenza naturale di lieve entità.

I fattori che comportano la riduzione dell'accesso del farmaco alle cellule tumorali sono molteplici, tra cui per esempio un ridotto assorbimento, un aumentato metabolismo, un'aumentata eliminazione, una difficoltà di permeazione nella massa tumorale ed una ridotta irrorazione sanguigna della massa tumorale. Le cellule tumorali possono sviluppare resistenza al trattamento farmacologico attraverso diversi meccanismi che possono comportare un minor accumulo intracellulare del farmaco, un aumento dell'efflusso extracellulare del farmaco, un aumento dell'efficienza dei sistemi cellulari di riparazione del DNA e di detossificazione ed una ridotta suscettibilità all'apoptosi farmaco-indotta.

L'insorgenza di un meccanismo di resistenza piuttosto che un altro dipende sia dal fenotipo tumorale sia dalla classe di appartenenza del chemioterapico.

L'insorgenza di fenomeni coinvolti nello sviluppo della farmacoresistenza costituisce al momento la principale causa di mancata risposta al trattamento chemioterapico nei tumori e di conseguenza di mancata guarigione, nonostante l'introduzione di regimi di polichemioterapia in sostituzione di regimi di monochemioterapia. Le cellule tumorali spesso sviluppano resistenza simultanea a molti farmaci, anche strutturalmente e funzionalmente molto differenti. Questo fenomeno prende il nome di *multidrug resistance* (MDR) o farmacoresistenza pleiotropica multifattoriale. Una delle cause principali che portano all'insorgenza della farmacoresistenza è la sovraespressione di diversi trasportatori ABC nelle cellule tumorali che causano un aumento dell'efflusso extracellulare del chemioterapico e pertanto una ridotta risposta al trattamento farmacologico. Molti membri di questa famiglia sono costitutivamente sovraespressi in diversi tumori umani (farmcoresistenza intrinseca) o aumentano il loro livello di espressione in corso di trattamento chemioterapico (farmcoresistenza acquisita). L'elevata espressione di alcuni trasportatori ABC ha un valore predittivo della risposta alla chemioterapia e/o valore prognostico in termini di decorso clinico e probabilità di sopravvivenza dei pazienti. Sicuramente il trasportatore più noto e più studiato è ABCB1, principale trasportatore coinvolto nell'insorgenza di fenomeni di MDR in diversi tumori umani, in quanto è capace di trasportare un'ampia varietà di molecole farmacologiche, con struttura e funzione molto diverse tra loro, tra cui antracicline, alcaloidi, etoposide, mitoxantrone, bisantrene, methotrexate e vincristina. In particolare l'elevata espressione di ABCB1 in pazienti affetti da osteosarcoma ad alto grado al momento della diagnosi correla con una prognosi avversa (Baldini et al, 1995; Pako & Ioannidis, 2003; Serra et al, 2003, 2006).

Diversi membri appartenenti alla famiglia C sono a loro volta coinvolti nell'insorgenza di farmacoresistenza. Particolare interesse è stato rivolto al primo membro ad essere scoperto di tale famiglia, ossia il trasportatore ABCC1, denominato anche MRP1 (*Multidrug Resistance Protein 1*), coinvolto nell'insorgenza della resistenza a diversi chemioterapici tra cui doxorubicina, methotrexate, vincristina ed etoposide.

Negli ultimi anni è stato particolarmente studiato anche il trasportatore ABCG2 (o *Breast Cancer Resistance Protein, BCRP*), emitransportatore coinvolto nell'insorgenza della resistenza a chemioterapici come mitoxantrone, methotrexate ed etoposide (Nakanishi et al, 2003).

3.5 Trasportatori ABC e cellule staminali

Le cellule staminali possiedono specifiche caratteristiche che le differenziano dalle cellule mature e differenziate. Oltre alla capacità di auto-rinnovamento e di differenziamento in diversi tipi di cellule mature, esse possono anche rimanere quiescenti, attraverso divisioni cellulari molto lente e poco frequenti. Una delle caratteristiche peculiari delle cellule staminali è che esse esprimono in modo maggiore rispetto alle cellule differenziate diversi trasportatori ABC. Tra i trasportatori ABC più espressi in questo tipo di cellule ci sono per esempio ABCB1 nelle cellule staminali del colon (Gottesman et al, 2002), ABCC1 nelle cellule staminali del fegato e ABCG2 nel tessuto ematopoietico (Sharenberg et al, 2002; Allikmets et al, 1998). Questi tre trasportatori rappresentano i principali fattori coinvolti in fenomeni di MDR nelle cellule tumorali, sono capaci di trasportare substrati sia idrofobi che idrofili (Dean et al, 2001; Gottesman et al, 2002) ed in condizioni fisiologiche svolgono un importante ruolo di protezione, soprattutto a livello della placenta, dell'intestino e della barriera ematoencefalica.

Topi *knock-out* per ABCB1 e ABCC1 o per ABCG2 sono vitali, fertili e presentano normali compartimenti di cellule staminali. Questo significa che i geni che codificano per tali trasportatori non sono importanti per la crescita ed il mantenimento delle cellule staminali, ma bensì per la protezione da tossine in quanto topi *knock-out* per ABCB1 e ABCC1 o per ABCG2 sono molto più sensibili all'azione di farmaci come vinblastina, topotecano o mitoxantrone (Dean et al, 2005). L'elevata espressione di tali trasportatori nelle cellule staminali è quindi considerata un marcatore di staminalità, ed è anche causa della non-responsività di queste cellule a gran parte dei farmaci chemioterapici.

3.6 Trasportatori ABC e cellule staminali tumorali

Cellule con caratteristiche staminali sono state isolate anche da tumori maligni di origine ematopoietica ed in alcuni tumori solidi. Tali cellule sono state denominate cellule staminali tumorali. Anch'esse come le cellule staminali normali sono capaci di autorinnovarsi e di differenziarsi in diversi tipi cellulari, e quindi di dare luogo ad una ripresa del tumore, dopo una fase di regressione, che spesso risulta essere farmacoresistente in quanto le cellule staminali tumorali sovraesprimono diversi trasportatori ABC.

3.7 Strategie terapeutiche utilizzate per superare il fenomeno della multidrug resistance (MDR)

Sono ormai numerosi gli studi che dimostrano che la sovraespressione di diversi trasportatori ABC nelle cellule tumorali causa un aumento dell'efflusso extracellulare dei chemioterapici e pertanto una ridotta risposta al trattamento farmacologico. A fronte dell'importanza che tali trasportatori rivestono nell'insorgenza di fenomeni di farmacoresistenza, negli ultimi trent'anni sono state sviluppate diverse strategie terapeutiche basate sull'utilizzo di inibitori della loro funzione di trasporto (farmaci o agenti revertanti).

3.7.1 Revertanti di prima generazione

Le prime strategie utilizzate per superare la resistenza mediata dai trasportatori ABC risalgono agli anni '80 ed erano dirette principalmente contro il trasportatore ABCB1. Tra i revertanti di prima generazione furono identificate varie molecole, con struttura e funzione differente, già in commercio ed utilizzate per il trattamento di diverse patologie, tra cui bloccanti dei canali del calcio (es. verapamil), antagonisti della calmodulina, ormoni steroidei e antisteroidi (es. progesterone e tamoxifene), inibitori di proteine chinasi C, farmaci immunosoppressori (es. ciclosporina A), antibiotici (es. eritromicina), antimalarici (es. chinina), fenotiazine psicotrope e alcaloidi indolici (es. flufenazina e reserpina).

Nonostante questi agenti fossero risultati essere molto attivi *in vitro*, i primi studi clinici evidenziarono una loro scarsa efficacia terapeutica in quanto nei pazienti venivano sequestrati o inattivati dal legame con proteine seriche. Inoltre questi agenti risultavano avere una tossicità maggiore di quella prevista a causa dell'inibizione delle funzioni

fisiologiche dei trasportatori ABC legate alla detossificazione di farmaci e tossine a livello dei tessuti normali.

3.7.2 Revertanti di seconda generazione

Sulla base dell'esperienza con i revertanti di prima generazione, sono stati sintetizzati e valutati inibitori di seconda generazione, soprattutto di ABCB1, dotati di maggiore efficacia e minore tossicità collaterale come ad es. il PSC833 (Valspodar). Nonostante questo, i risultati clinici in termini di risposta al trattamento sono stati deludenti, soprattutto a causa dell'aumento degli effetti di tossicità collaterale. Questo accadeva perchè i revertanti inibiscono anche il citocromo P450 (isoforma 3A4), deputato alla detossificazione dei chemioterapici, causando un innalzamento dei livelli plasmatici dei chemioterapici stessi e, di conseguenza, un aumento della loro tossicità collaterale (Leonard, 2002).

3.7.3 Revertanti di terza generazione

Per superare i problemi sopra menzionati, sono stati quindi sintetizzati revertanti di terza generazione (es. biricodar, tariquidar) che a differenza dei precedenti non sono metabolizzati dall'isoforma 3A4 del citocromo P450.

I risultati clinici in termini di risposta al trattamento chemioterapico non sono però stati all'altezza delle aspettative in quanto non sono stati ottenuti significativi miglioramenti rispetto ai protocolli convenzionali.

3.7.4 Revertanti di quarta generazione (o revertanti di ultima generazione)

Sulla base dell'esperienza accumulata con le prime tre generazioni di revertanti, è stata avviata la sintesi di una quarta generazione di queste molecole con l'intento di superare i problemi riscontrati in precedenza. I revertanti di quarta o ultima generazione sono infatti agenti in grado di inibire la funzionalità di pochi o diversi trasportatori ABC, interagendo molto poco o quasi per niente con il citocromo P450, ed agendo a concentrazioni molto più basse di quelle dei revertanti delle generazioni precedenti. Queste caratteristiche dovrebbero quindi portare ad una reversione della farmacoresistenza ABC-mediata senza aumentare i problemi di tossicità collaterale.

Alcuni revertanti di quarta generazione sono attualmente in corso di valutazione clinica, e per alcuni di essi sono anche stati riportati risultati preliminari abbastanza promettenti.

Capitolo III

Scopo della ricerca

L'insorgenza di fenomeni coinvolti nello sviluppo della farmacoresistenza costituisce al momento la principale causa di mancata risposta al trattamento chemioterapico nell'osteosarcoma, e più in generale nei tumori umani. Infatti nonostante l'introduzione di regimi di polichemioterapia in sostituzione di regimi di monochemioterapia permane un rilevante numero di pazienti affetti da osteosarcoma (30-35%), con caratteristiche di farmacoresistenza naturale e/o acquisita, che non risponde al trattamento farmacologico e che va incontro ad un decorso clinico sfavorevole, con esito fatale entro 2-3 anni dall'esordio (Bramwell, 2000; Serra et al, 2003; Chou & Gorlick, 2006; Ferrari & Palmerini, 2007).

L'obiettivo principale del programma di ricerca di questa Tesi è stato quello di valutare in modo dettagliato i fattori coinvolti nello sviluppo di farmacoresistenza delle cellule di osteosarcoma e la validazione *in vitro* di agenti in grado di migliorare la risposta al trattamento dei tumori non-responsivi alla chemioterapia.

Da studi precedenti, condotti nel laboratorio nel quale è stato svolto il suddetto programma di ricerca, è emerso che l'elevata espressione del trasportatore ABCB1 e dell'oncogene *C-MYC* in pazienti affetti da osteosarcoma, al momento della diagnosi, correla con una ridotta risposta al trattamento e pertanto con una prognosi avversa (Baldini et al, 1995; Serra et al, 2003, 2006; Scionti et al, 2008).

Attualmente nell'osteosarcoma non è ancora stata eseguita un'ampia analisi dei trasportatori ABC, ad eccezione di ABCB1, che potrebbero essere coinvolti nella farmacoresistenza contro i chemioterapici convenzionali utilizzati, per tale motivo in questo studio sono stati analizzati per la prima volta 16 trasportatori ABC, selezionati in base al loro coinvolgimento nella farmacoresistenza in diverse patologie umane (Dean et al, 2001; Gillet et al, 2007; Gatti et al, 2009; Fletcher et al, 2010) e/o perchè notoriamente regolati dall'oncogene *C-MYC* (Porro et al, 2010).

Il fine ultimo dello studio è stato quello di chiarire i meccanismi attraverso i quali *C-MYC* sia in grado di indurre resistenza ai farmaci nelle cellule di osteosarcoma, portare all'identificazione dei trasportatori ABC associati al fenotipo farmacoresistente di questo

tumore, e verificare l'efficacia *in vitro* di revertanti di ultima generazione in grado di inibire la funzionalità dei trasportatori ABC emersi come i più rilevanti nel corso dello studio.

Capitolo IV

Materiali e metodi

4.1 Farmaci

I chemioterapici Cisplatino (CDDP), Doxorubicina (DX) e Methotrexate (MTX) sono stati forniti rispettivamente da Teva Italia (Milano, Italia), Sandoz (Varese, Italia) e Wyeth Lederle (Latina, Italia). Le soluzioni madri di MTX (25 mg/ml) e CDDP (500 µg/ml) sono state mantenute a 4°C, mentre quella di DX (2 mg/ml) è stata aliquotata e conservata a -20°C.

Il revertante CBT-1 è stato gentilmente donato dalla ditta CBA International Inc. (Lexington, KY) ed è stato ricostituito in H₂O alla concentrazione di 0,01 M, aliquotato e conservato a -20°C.

Per tutti i farmaci, le concentrazioni d'uso sono state preparate diluendo le soluzioni madri nel mezzo di coltura immediatamente prima dell'uso.

4.2 Linee cellulari

Le linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS, Saos-2, HOS e MG-63 sono state acquistate dall'*American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD), mentre le linee IOR/OS9, IOR/OS10, IOR/OS14, IOR/OS15, IOR/OS18, IOR/MOS e SARG sono state stabilizzate da campioni biotipici ottenuti da pazienti con osteosarcoma classico ricoverati presso gli Istituti Ortopedici Rizzoli (Bologna, Italia) (Benini et al, 1999).

Le varianti farmacoresistenti a DX, MTX e CDDP sono state ottenute esponendo le linee cellulari farmacosensibili U-2OS e Saos-2 a concentrazioni progressivamente crescenti di ciascun farmaco (Serra et al, 1993, 2004; Pasello et al, 2008). Le varianti farmacoresistenti sono state denominate utilizzando il nome della linea cellulare parentale, seguito dalla sigla e dalla concentrazione del farmaco impiegato per la selezione. La concentrazione del farmaco si intende in ng/ml o, quando chiaramente specificato, in µg/ml (**Tabella 2**).

Tutte le linee cellulari sono state coltivate in *Iscove's modified Dulbecco's medium* (IMDM, Lonza, Verviers, Belgio) addizionato con penicillina (100 U/ml)/streptomicina (100 µg/ml) (Invitrogen Ltd, Paisley, UK) e con il 10% di siero fetale bovino scomplementato (FBS; Biowhittaker Europe, Cambrex-Verviers, Belgio). Ciascuna linea

cellulare farmacoresistente è stata coltivata in terreno di coltura addizionato del farmaco alla concentrazione usata per la selezione.

Gli osteoblasti umani normali (Lonza, Walkersville, MD, USA) sono stati coltivati in *Osteoblast Growth Medium* (OGM, Lonza, Walkersville, MD, USA) contenente il 10% di siero fetale bovino scomplementato, acido ascorbico e gentamicina/amfotericina B.

Tutte le linee cellulari sono state mantenute a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

| Linee cellulari farmacoresistenti | |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| Varianti della linea U-2OS | Varianti della linea Saos-2 |
| U-2OS/DX30 | Saos-2/DX30 |
| U-2OS/DX100 | Saos-2/DX100 |
| U-2OS/DX580 | Saos-2/DX580 |
| U-2OS/MTX3 | Saos-2/MTX30 |
| U-2OS/MTX30 | Saos-2/MTX100 |
| U-2OS/MTX100 | Saos-2/MTX300 |
| U-2OS/MTX300 | Saos-2/MTX1µg |
| U-2OS/CDDP300 | Saos-2/CDDP300 |
| U-2OS/CDDP1µg | Saos-2/CDDP1µg |
| U-2OS/CDDP4µg | Saos-2/CDDP6µg |

Tabella 2. Pannello delle varianti resistenti a DX, MTX e CDDP derivate dalle linee cellulari farmacoresistenti U-2OS e Saos-2.

4.3 Campioni clinici

Per gli studi di espressione genica sono state utilizzate due diverse serie di campioni bioptici ottenuti da pazienti affetti da osteosarcoma classico. La prima serie è costituita da una casistica di 34 pazienti mentre la seconda serie comprende 66 pazienti, le cui caratteristiche clinico-patologiche sono elencate nella **Tabella 3A-B**. Tutte le analisi di espressione genica sono state eseguite su campioni bioptici ottenuti alla diagnosi, prima dell'inizio del trattamento chemioterapico. Tutti i pazienti sono stati trattati con un protocollo di chemioterapia neoadiuvante basati sull'impiego di DX, MTX, CDDP e ifosfamida.

| A | | | B | | |
|------------------------------------|---------|-------------|------------------------------------|---------|-------------|
| Caratteristica | N° Casi | Percentuale | Caratteristica | N° Casi | Percentuale |
| <u>Genere</u> | | | <u>Genere</u> | | |
| M | 19 | 56 | M | 41 | 62 |
| F | 15 | 44 | F | 25 | 38 |
| <u>Età</u> | | | <u>Età</u> | | |
| < 14 | 9 | 26 | < 14 | 18 | 27 |
| ≥ 14 | 25 | 74 | ≥ 14 | 48 | 73 |
| <u>Istologia</u> | | | <u>Istologia</u> | | |
| Osteoblastico | 16 | 47 | Osteoblastico | 38 | 58 |
| Condrolastico | 5 | 15 | Condrolastico | 10 | 15 |
| Fibroblastico | 9 | 26 | Fibroblastico | 13 | 20 |
| Teleangectasico | 1 | 3 | Teleangectasico | 2 | 3 |
| Non specificato | 3 | 9 | Non specificato | 3 | 4 |
| <u>Sede</u> | | | <u>Sede</u> | | |
| Femore | 21 | 62 | Femore | 40 | 60 |
| Tibia | 4 | 12 | Tibia | 12 | 18 |
| Omero | 3 | 8 | Omero | 7 | 11 |
| Altro | 6 | 18 | Altro | 7 | 11 |
| <u>Chirurgia</u> | | | <u>Chirurgia</u> | | |
| Resezione | 26 | 76 | Resezione | 56 | 85 |
| Amputazione | 8 | 24 | Amputazione | 10 | 15 |
| <u>Margini chirurgici</u> | | | <u>Margini chirurgici</u> | | |
| Adeguati | 34 | 100 | Adeguati | 66 | 100 |
| Inadeguati | 0 | 0 | Inadeguati | 0 | 0 |
| <u>Necrosi</u> | | | <u>Necrosi</u> | | |
| Buona (necrosi tumorale ≥ 90%) | 14 | 54 | Buona (necrosi tumorale ≥ 90%) | 35 | 58 |
| Scarsa (necrosi tumorale < 90%) | 12 | 46 | Scarsa (necrosi tumorale < 90%) | 25 | 42 |
| <u>Decorso clinico</u> | | | <u>Decorso clinico</u> | | |
| Ricaduti | 17 | 50 | Ricaduti | 33 | 50 |
| Senza segni di malattia | 17 | 50 | Senza segni di malattia | 33 | 50 |

Tabella 3. Caratteristiche clinico-patologiche delle due casistiche di osteosarcoma classico composte rispettivamente da 34 pazienti (A) e da 66 pazienti (B).

4.4 Estrazione di RNA

Per le linee cellulari, l'RNA è stato estratto da *pellet* cellulari. Per i campioni clinici, l'RNA totale è stato estratto da campioni biotipici congelati e conservati a -80°C, previa valutazione istologica della rappresentatività del campione stesso. Tutte le estrazioni sono

state eseguite utilizzando il reagente TRIzol (Invitrogen), seguendo il protocollo fornito dalla ditta. Completata la fase di estrazione, la concentrazione e la qualità di ogni RNA sono state valutate, rispettivamente, attraverso analisi spettrofotometrica tramite NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) ed elettroforesi su gel di agarosio all'1,5%.

4.5 Retrotrascrizione e quantitative real-time PCR

Per ogni singolo gene analizzato, 500 ng di RNA totale sono stati retrotrascritti in cDNA utilizzando il kit *High Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems, Foster city, CA), seguendo il protocollo fornito dal produttore. L'espressione genica dei trasportatori ABC e dell'oncogene *C-MYC* è stata valutata, tramite *quantitative real-time PCR*. Per quantificare il livello di espressione genica di ciascun trasportatore ABC e di *C-MYC* sono stati utilizzati i seguenti assay:

- *ABCA2 TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_00242232_m1)
- *ABCB1 TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_00184491_m1)
- *ABCC1 TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_00219905_m1)
- *ABCC2 TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_00166123_m1)
- *ABCC3 TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_00358677_m1)
- *ABCC4 TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_00195260_m1)
- *ABCC5 TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_00194701_m1)
- *ABCC6 TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_01081201_m1)
- *ABCC10 TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_00375701_m1)
- *ABCC11 TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_00261567_m1)
- *ABCC12 TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_00264354_m1)
- *ABCE1 TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_00759267_m1)
- *ABCF1 TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_00153703_m1)
- *ABCF2 TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_00606493_m1)
- *ABCF3 TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_00217977_m1)
- *ABCG2 TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_00184979_m1)
- *C-MYC TaqMan Gene Expression Assay* (Hs_Hs00153408_m1)

Come gene di riferimento, per normalizzare i dati ottenuti, è stato utilizzato il gene che codifica l'enzima GAPDH (gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi) (*Assay ID*: Hs99999905_m1).

Le reazioni di amplificazione per ciascun campione sono state realizzate in triplicato utilizzando la *TaqMan Universal Master Mix* (Applied Biosystem) in un volume totale di 25 μ l con un programma standard di 40 cicli (95°C per 5 sec, 60°C per 20 sec, 72°C per 30 sec), dopo un iniziale ciclo di 95°C per 10 sec. Lo strumento utilizzato per la reazione di amplificazione è ABI PRISM 7900 SDS (Applied Biosystem). Ogni determinazione è stata replicata almeno due volte.

Come calibratore per le analisi sulle linee farmacosensibili è stato usato un *pool* di osteoblasti (OBL) umani normali, mentre per le varianti farmacoresistenti sono state usate le corrispondenti linee parentali U-2OS e Saos-2.

Per determinare il livello di espressione dei geni studiati, una volta individuato il loro valore di Ct e quello del gene di riferimento (GAPDH), è stata calcolata la loro differenza Δ Ct. Comparando ciascun Δ Ct così ottenuto con il Δ Ct del campione di controllo, o calibratore, si è ottenuto il valore $\Delta\Delta$ Ct. Il valore $2^{-\Delta\Delta$ Ct} rappresenta la variazione del livello di espressione del gene d'interesse rispetto al calibratore.

All'interno di ognuna delle serie di pazienti considerate, per ogni gene è stata calcolata la mediana del valore $2^{-\Delta\Delta$ Ct}, sulla base della quale i pazienti sono stati categorizzati come "pazienti con elevata espressione del gene" (comprendenti i pazienti con valori di $2^{-\Delta\Delta$ Ct \geq mediana; definiti come "high") o come "pazienti con bassa espressione del gene" (comprendenti i pazienti con valori di $2^{-\Delta\Delta$ Ct < mediana; definiti come "low").

4.6 Immunofluorescenza su cellule fissate

Per valutare il livello di espressione proteica dei trasportatori, le cellule sono state tripsinizzate e sono stati allestiti dei *pellet* di 800.000 cellule cadauno. I campioni sono poi stati lavati una volta in *Phosphate Buffered Saline* (PBS), due volte in *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS, Sigma-Aldrich Co.) con acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico 0.01M (Hepes 0.01M, Sigma-Aldrich Co.), e infine fissati con paraformaldeide al 4% (PFA 4%, Sigma-Aldrich Co) per 5 minuti. Dopo un lavaggio in HBSS-Hepes 0.01M, le cellule sono state permeabilizzate con una soluzione di saponina allo 0,1% (Sigma-Aldrich Co.) in HBSS-Hepes 0.01M per 5 minuti e incubate con i seguenti anticorpi primari diluiti in HBSS-saponina 0,1% per 40 minuti:

- anticorpo anti-ABCB1, clone MRK16 (monoclonale di topo, Kamiya. Diluizione 1:100)

- anticorpo anti-ABCC1, clone MRPm5 (monoclonale di topo, Abcam. Diluizione 1:20)
- anticorpo anti-ABCC2, clone M2III-6 (monoclonale di topo, Abcam. Diluizione 1:20)
- anticorpo anti-ABCC3, clone M3II-21 (monoclonale di topo, Santa Cruz Biotechnology. Diluizione 1:100)
- anticorpo anti-ABCC4, clone M4I-10 (monoclonale di ratto, Novus Biologicals. Diluizione 1:20)
- anticorpo anti-ABCC5, clone M5II-54 (monoclonale di ratto, Abcam. Diluizione 1:20)
- anticorpo anti-ABCC6, clone M6II-31 (monoclonale di ratto, Novus Biologicals. Diluizione 1:20)
- anticorpo anti-ABCC10, clone M7I-3 (monoclonale di ratto, Abnova. Diluizione 1:20)
- anticorpo anti-ABCG2, clone 5D3 (monoclonale di topo, Santa Cruz Biotechnology. Diluizione 1:50)
- anticorpo anti-C-MYC, clone 9E10 (monoclonale di topo, Abcam. Diluizione 1:100)

Dopo un lavaggio in HBSS-saponina 0,1%, i campioni sono stati incubati per 40 minuti con un anticorpo secondario *anti-mouse* coniugato con fluoresceina (Sigma-Aldrich Co; diluizione 1:100 in HBSS-saponina 0,1%) oppure con un anticorpo secondario *anti-rat* coniugato con fluoresceina (KPL; diluizione 1:100 in HBSS-saponina 0,1%) . Terminata l'incubazione i campioni sono stati lavati due volte in HBSS-saponina 0, 1% ed una volta in HBSS-Hepes 0.01M. Per il controllo negativo, le cellule sono state incubate con HBSS-saponina 0,1% senza l'anticorpo primario. I campioni sono stati analizzati mediante citometria di flusso (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA).

4.7 Immunoistochimica

Per le rilevazioni in immunoistochimica è stato utilizzato il metodo del complesso avidina-biotina perossidasi (*Vectastain ABC kit, Vector Laboratories*) utilizzando l'anticorpo anti-ABCC1, clone MRPm5 (monoclonale di topo, Abcam. Diluizione 1:20) e l'anticorpo anti-vimentina V9 (monoclonale di topo, Roche. Diluizione 1:50). L'analisi è stata eseguita su

sezioni tissutali di campioni biotici di pazienti trattati con il protocollo ISG-SSG1, per i quali era già stata eseguita la valutazione di ABCB1 (Serra et al, 2006).

Le sezioni istologiche sono state deparaffinate e idratate a temperatura ambiente attraverso passaggi sequenziali in:

- xilolo (2 passaggi da 30 minuti cadauno)
- etanolo assoluto (3 passaggi da 5 minuti cadauno)
- etanolo 95% (1 passaggio da 5 minuti)
- etanolo 70% (1 passaggio da 5 minuti)
- acqua distillata (1 passaggio da 5 minuti)

Per inibire l'attività perossidasi endogena, i campioni sono stati incubati in una soluzione al 1% di perossido di idrogeno-metanolo a temperatura ambiente per 30 minuti. I campioni sono stati incubati con siero normale di cavallo (*Vector, Burlingham, CA*), diluito 1:50 per 15 minuti e successivamente con l'anticorpo primario specifico per 16 ore a +4°C. Dopo un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente con un anticorpo *anti-mouse* biotinilato diluito 1:300, i campioni sono stati incubati con il complesso avidina-biotina perossidasi per ulteriori 30 minuti. Il prodotto dell'immunoreazione è stato messo in evidenza incubando i campioni con una soluzione all'1% di diaminobenzidina (DAB) in tampone salino in presenza di perossido di idrogeno.

Previa colorazione di contrasto nucleare per 30 secondi-1 minuto con ematossilina, i campioni sono stati disidratati a temperatura ambiente attraverso passaggi sequenziali in:

- etanolo 70% (1 passaggio da 2 minuti)
- etanolo 95% (1 passaggio da 2 minuti)
- etanolo assoluto (3 passaggi da 5 minuti cadauno)
- xilolo (2 passaggi da 5 minuti cadauno)

È stato infine apposto un vetrino coprioggetto su ogni campione utilizzando poche gocce di eukitt, un comune mezzo di montaggio per istologia (*Entellan*). I campioni sono stati valutati al microscopio e classificati in base all'intensità ed alla distribuzione della colorazione ottenuta dalla rilevazione degli immunocomplessi tramite DAB.

In ogni esperimento sono stati inclusi anche controlli positivi (incubati con l'anticorpo anti-vimentina V9, diluito 1:50; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germania) e controlli negativi (incubati senza l'anticorpo primario). Sezioni istologiche di rene umano normale sono state usate come tessuto di controllo per calibrare lo sviluppo della reazione di detezione.

Nei campioni clinici, come citato sopra, è stata valutata la positività per ABCC1, mentre quella per ABCB1 era già stata valutata in uno studio precedente (Serra et al, 2006).

Sulla base della percentuale di cellule positive ad ABCC1 rispetto al totale di quelle analizzate è stato definito il seguente gradiente (*score*) di positività:

- *Score* 0, assenza di immunoreazione (campione “negativo” o senza sovraespressione di ABCC1)
- *Score* 1, campione con positività in meno del 10% delle cellule (considerato ancora come campione “negativo” o senza sovraespressione di ABCC1)
- *Score* 2, campione con positività in un numero di cellule compreso tra il 10% ed il 50% del totale (considerato come campione “positivo” con sovraespressione di ABCC1)
- *Score* 3, campione con positività in oltre il 50% delle cellule (considerato come campione “positivo” con sovraespressione di ABCC1)

4.8 Esperimento di incorporazione di rodamina 123, calceina AM e doxorubicina in citofluorimetria

Per ogni linea cellulare sono stati allestiti dei *pellet* di 250.000 cellule. I campioni sono quindi stati incubati o con DX 5 μM o con rodamina123 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich Co.), substrato di ABCB1, o con acetossi-metil calceina 0.1 μM (calceina AM, Invitrogen), substrato di ABCB1 e/o ABCC1. Le incubazioni sono state eseguite per 30 minuti a 37°C, 3 ore nel caso della DX, in presenza o assenza di CBT-1 alle dosi 0,5-1,0-10 μM . I campioni sono stati analizzati mediante citometria a flusso (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA)

4.9 Analisi citofluorimetrica dell'efflusso extracellulare di rodamina 123, calceina AM e DX

Per ogni linea cellulare sono stati preparati dei *pellet* di 250.000 cellule. Dopo una prima incubazione per 30 minuti a 37°C con rodamina123 0.5 $\mu\text{g/ml}$ o calceina AM 0.1 μM , e per 3 ore nel caso di DX 5 μM , in presenza o assenza di CBT-1 alle dosi 0,5-1,0-10 μM (tempo 0), seguita da una quantificazione della fluorescenza al citofluorimetro, è stato eseguito un lavaggio in PBS per eliminare il substrato di ABCB1 e/o ABCC1 (molecola fluorescente) e sono state effettuate ulteriori incubazioni in presenza o assenza di CBT-1 alle dosi 0.5-1.0-10 μM per 30-60-120 minuti a 37°C (40-80-140 minuti nel caso della DX 5 μM) con rispettive letture al citofluorimetro.

4.10 Valutazione dell'incorporazione di rodamina 123, calceina AM e DX in microscopia a fluorescenza

Le linee cellulari sono state seminate in piastre Petri da 60 mm di diametro in IMDM al 10% di FBS. Raggiunta una parziale confluenza, le cellule sono state incubate per 30-40 minuti a 37°C con rodamina123 0.5 µg/ml o calceina AM 0.1 µM, e per 3 ore nel caso di DX 5 µM, in presenza o assenza di CBT-1 alle dosi 0,5-1,0-10 µM in PBS. Negli ultimi 10 minuti di incubazione è stato aggiunto HOECHST 33342 0.5 µg/ml (fluorescenza blu, λ 350-460, Sigma), un colorante vitale che si intercala tra le basi del DNA. Al termine dell'incubazione, il monostrato cellulare è stato lavato con PBS, coperto con un vetrino coprioggetto e immediatamente osservato al microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse 90i per valutare l'incorporazione intracellulare di DX (fluorescenza rossa, λ 500-800 nm), rodamina 123 (fluorescenza rossa, λ 500-650 nm) e calceina AM (fluorescenza verde, λ 485-520 nm).

4.11 Silenziamento genico di ABCB1

Le cellule U-2OS/DX580 sono state seminate in piastre da 6 pozzetti alla densità di 200.000 cellule in IMDM al 10% di FBS privo di antibiotici. Dopo 24 ore, il terreno di coltura è stato cambiato con IMDM, privo di FBS e antibiotici, ed integrato con 2.5 µl/ml di Lipofectamine 2000 (Invitrogen) e con un *pool* costituito da 3 oligonucleotidi antisense anti-ABCB1 usati alla concentrazione finale di 50 nM (IDT Screening DsiRNA Duplex pool, HSC.RNAI.N000927.12.1_10nm; HSC.RNAI.N000927.12.2_10nm; HSC.RNAI.N000927.12.3_10nm). Come controllo negativo è stato usato un oligonucleotide non silenziante noto come “*scramble*” (SCR, IDT Negative Control, DS NC1 – trifecta) utilizzato sempre alla dose di 50 nM. Il controllo non trattato è stato incubato solo con IMDM, privo di FBS e antibiotici. Dopo 5 ore dalla trasfezione il terreno di coltura è stato sostituito con IMDM al 10% di FBS senza antibiotici e le cellule sono state mantenute in coltura per 96 ore.

4.12 Valutazione della citotossicità in vitro di CBT-1 in linee cellulari di osteosarcoma umano

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla densità di 2000 cellule/pozzetto in IMDM al 10% di FBS. Dopo 24 ore, le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di CBT-1 (da 0.01 a 100 µM).

La sensibilità *in vitro* di ciascuna linea cellulare è stata calcolata attraverso la valutazione della curva dose-risposta ottenuta o con il kit *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dephenyltetrazolium bromide (MTT) assay* (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germania) o con il kit *CellTiter-Fluor™ Fluorescent Cell Viability (FCV) assay* (Promega, Italia) ed è stata espressa in termini di IC₅₀ (concentrazione di farmaco che inibisce del 50% la crescita cellulare dopo 96 ore di trattamento).

4.13 Valutazione dell'azione revertante in vitro di CBT-1 in linee cellulari di osteosarcoma umano

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla densità di 2000 cellule/pozzetto in IMDM al 10% di FBS. Dopo 24 ore, le cellule sono state trattate con una dose fissa di CBT-1 (0.5 µM) e concentrazioni crescenti di DX o MTX o CDDP. La sensibilità *in vitro* di ciascuna linea cellulare è stata calcolata attraverso la valutazione della curva dose-risposta ottenuta con il *kit MTT assay* o con il *kit FCV assay* ed è stata espressa in termini di IC₅₀, come descritto sopra. Per ogni linea cellulare è stato calcolato il *dose modifying factor* (DMF) dividendo il valore di IC₅₀ ottenuto dal trattamento con il solo chemioterapico ed il valore di IC₅₀ ottenuto con il trattamento combinato del chemioterapico in associazione a CBT-1 0.5 µM.

Così facendo, il DMF risulta essere un fattore indicativo dell'entità della riduzione del valore di IC₅₀ del trattamento combinato in relazione al trattamento singolo, indice di reversione del livello di farmacoresistenza cellulare. La resistenza relativa (RR), calcolata dividendo il valore di IC₅₀ ottenuto dal trattamento con il solo chemioterapico della linea farmacoresistente con quello della linea parentale, risulta invece essere un fattore indicativo del livello di resistenza della variante farmacoresistente rispetto alla corrispondente linea parentale.

4.14 Analisi statistiche

L'analisi della correlazione tra il livello di espressione di ogni singolo trasportatore ABC con il livello di espressione dell'oncogene *C-MYC* è stata eseguita utilizzando il *Fisher's test*.

L'analisi dell'impatto sul decorso clinico in termini di sopravvivenza libera da malattia (*event-free survival, EFS*) e sopravvivenza globale (*overall survival, OVS*) del livello di

espressione di ogni singolo gene (categorie high e low) o proteina (casi positivi e negativi) è stata eseguita utilizzando il *log-rank test* ed il metodo di *Kaplan-Meyer*.

Capitolo V

Risultati

5.1.1 Espressione genica dei trasportatori ABC e dell'oncogene C-MYC

Dal momento che una delle cause principali che portano all'insorgenza della farmacoresistenza è la sovraespressione di diversi trasportatori ABC nelle cellule tumorali e che recentemente sono emerse indicazioni sulla possibile modulazione dell'espressione di diversi geni ABC da parte di *C-MYC*, un approfondimento di questo aspetto potrebbe anche chiarire e spiegare l'impatto prognostico sull'osteosarcoma di questo oncogene (Scionti et al, 2008). In questo studio quindi, è stata valutata, tramite *quantitative real-time PCR*, l'espressione genica di 16 trasportatori ABC [*ABCA2*, *ABCB1*(*MDR1*), *ABCC1* (*MRP1*), *ABCC2* (*MRP2*), *ABCC3* (*MRP3*), *ABCC4* (*MRP4*), *ABCC5* (*MRP5*), *ABCC6* (*MRP6*), *ABCC10* (*MRP7*), *ABCC11* (*MRP8*), *ABCC12*, *ABCE1*, *ABCF1*, *ABCF2*, *ABCF3*, *ABCG2* (*BCRP*)] e dell'oncogene *C-MYC* su un ampio pannello di linee cellulari di osteosarcoma umano e su due diverse casistiche composte rispettivamente da 34 e da 66 campioni clinici di osteosarcoma classico.

I modelli sperimentali utilizzati comprendono 11 linee cellulari isolate da pazienti con osteosarcoma classico e non sottoposte a nessun tipo di selezione *in vitro* (linee farmacosensibili) e 20 varianti con diversi livelli di resistenza a DX, MTX e CDDP derivanti dalle linee parentali U-2OS e Saos-2 (linee farmacoresistenti).

Nell'ambito delle linee cellulari, il livello di espressione della maggior parte dei trasportatori ABC e di *C-MYC* risulta essere tendenzialmente più elevato nelle linee cellulari farmacoresistenti rispetto alle linee cellulari farmacosensibili (**Figura 7**). Il trasportatore *ABCC12* è stato omesso dal grafico riportato in **Figura 7** e nelle figure successive in quanto non espresso a livelli rilevabili in nessuna linea cellulare ed in nessun campione clinico.

Le 11 linee cellulari farmacosensibili presentano un livello di espressione di *C-MYC* più basso rispetto agli osteoblasti (OBL) umani normali (**Figura 8**). Nelle stesse linee, l'espressione della maggior parte dei trasportatori ABC è risultata essere simile o inferiore a quella degli OBL normali, ad eccezione di *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCC4*, *ABCC6* e *ABCG2* che sono risultati essere tendenzialmente sovraespressi nelle linee cellulari farmacosensibili rispetto alle cellule normali (**Figura 8**).

Al fine di evidenziare una possibile relazione con lo sviluppo di farmacoresistenza, nelle varianti resistenti a DX, MTX e CDDP, il livello di espressione di ogni singolo gene è stato comparato con quello della corrispondente linea parentale farmacosensibile.

Nelle varianti farmacoresistenti della linea U-2OS, sia la maggior parte dei trasportatori ABC che *C-MYC* risultano essere sovraespressi rispetto alla linea parentale (**Figura 9**). Come evidenziato nella **Figura 10**, nell'ambito del gruppo delle varianti farmacoresistenti, l'aumento del livello di espressione dei singoli trasportatori ABC varia all'interno dei sottogruppi delle linee resistenti a DX, MTX e CDDP, indicando un possibile diverso coinvolgimento di ciascun ABC nella resistenza ad ognuno di questi chemioterapici. Per quanto riguarda *C-MYC*, si osserva un più alto livello di espressione di questo oncogene solo nelle varianti resistenti a MTX e CDDP (**Figura 10**).

Un'analoga valutazione eseguita sulla serie delle varianti farmacoresistenti della linea Saos-2 ha messo, invece, in evidenza come il livello di espressione di quasi tutti i trasportatori ABC (ad eccezione di *ABCB1*, *ABCC2* e *ABCE1*) e di *C-MYC* sia simile a quello della linea parentale (**Figura 11**). Il trasportatore *ABCC11* è stato omissso dal grafico riportato in **Figura 11** in quanto non espresso a livelli rilevabili in nessuna variante farmacoresistente della linea Saos-2.

All'interno del gruppo delle varianti farmacoresistenti della linea Saos-2, non si rilevavano significative variazioni del livello di espressione di quasi tutti i geni ABC e di *C-MYC* (**Figura 12**). Solamente *ABCB1* risulta nettamente più espresso nelle varianti DX-resistenti, in accordo con il riconosciuto ruolo di questo trasportatore nello sviluppo di resistenza alla DX in queste cellule (Serra et al, 1993; Hattinger et al, 2009).

Confrontando i due gruppi di varianti farmacoresistenti, U-2OS e Saos-2, è possibile concludere che le variazioni di espressione dei trasportatori ABC e di *C-MYC* rispetto alla corrispondente linea parentale risultano più evidenti nelle varianti della linea U-2OS rispetto a quelle della linea Saos-2 (**Figura 13**). Globalmente, i dati ottenuti mettono in evidenza come *C-MYC* possa presentare una maggiore espressione in parte delle varianti farmacoresistenti rispetto alle linee farmacosensibili, e come questo evento si accompagni ad una simultanea variazione dell'espressione di vari trasportatori ABC. Dal momento che fra i geni modulati da *C-MYC* sono compresi diversi trasportatori ABC, questi dati suggeriscono che i due eventi potrebbero essere correlati e avere un ruolo, da meglio definire, nell'insorgenza di farmacoresistenza nelle cellule di osteosarcoma.

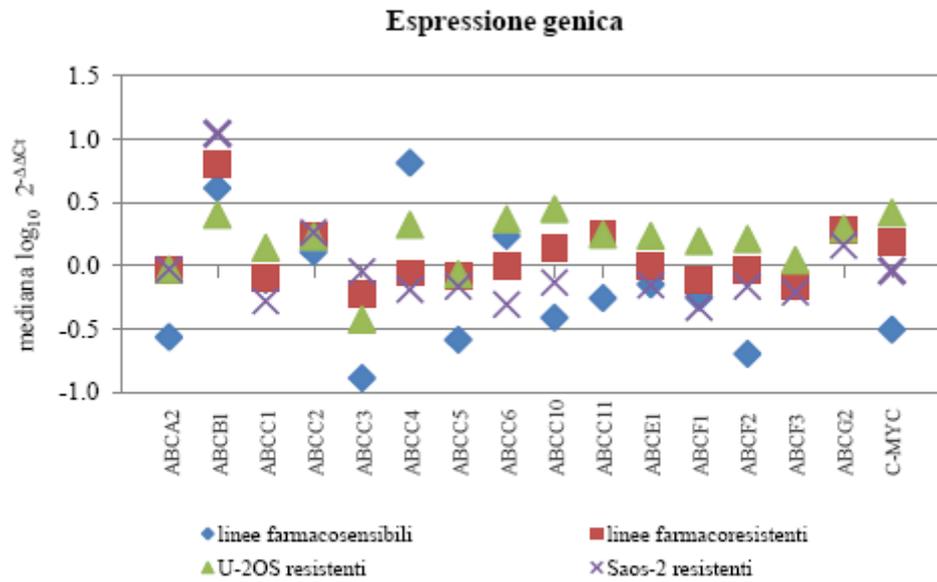


Figura 7. Andamento dell'espressione genica dei trasportatori ABC e di *C-MYC* nelle linee cellulari farmacosensibili e farmacoresistenti.

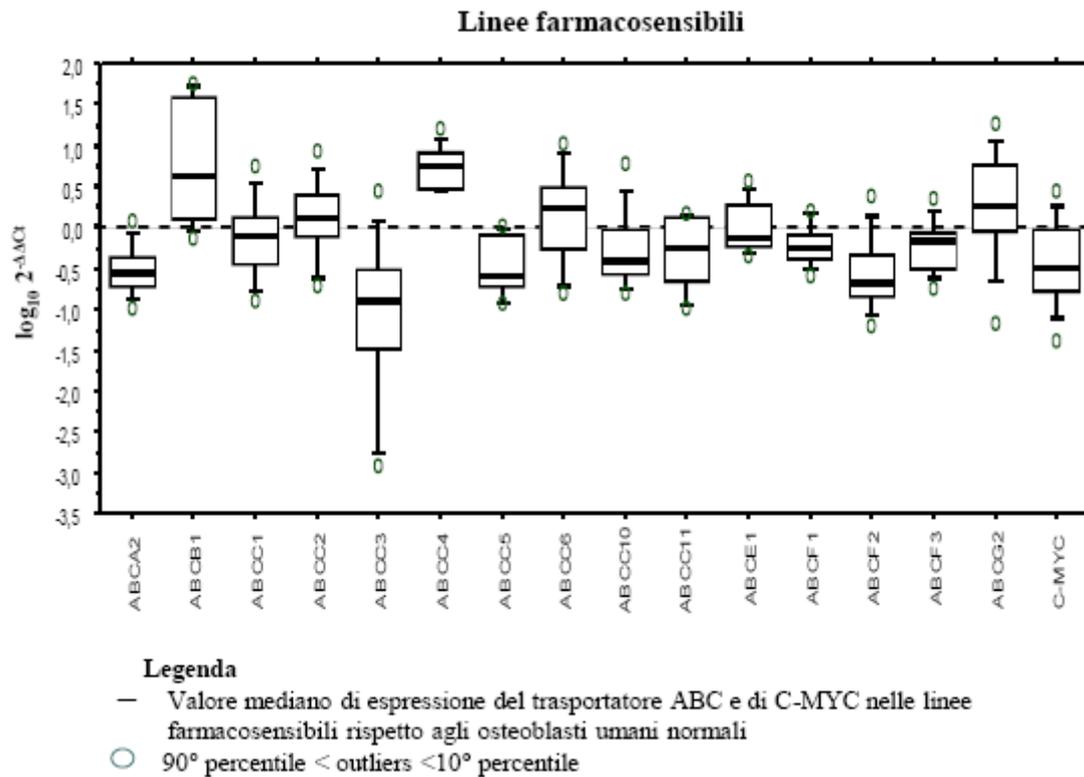


Figura 8. Nei Box plot è rappresentata l'espressione genica di 15 trasportatori ABC e dell'oncogene *C-MYC* ($\log_{10} 2^{-\Delta\Delta C_t}$), valutata tramite *quantitative real-time PCR*, su 11 linee cellulari farmacosensibili calibrate verso gli osteoblasti umani normali.

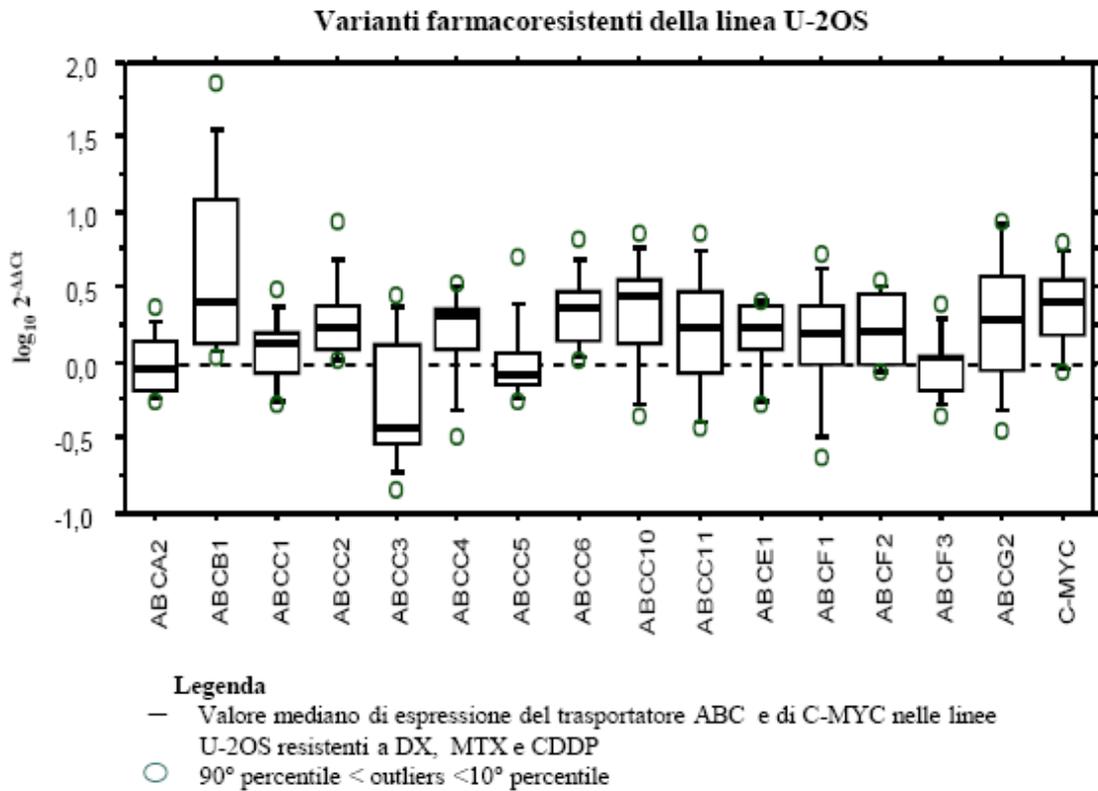


Figura 9. Nei Box plot è rappresentata l'espressione genica di 15 trasportatori ABC e dell'oncogene *C-MYC* ($\log_{10} 2^{-\Delta\Delta C_t}$), valutata tramite *quantitative real-time PCR*, sulle varianti della linea cellulare U-2OS resistenti a DX, MTX e CDDP calibrate verso la linea parentale U-2OS.

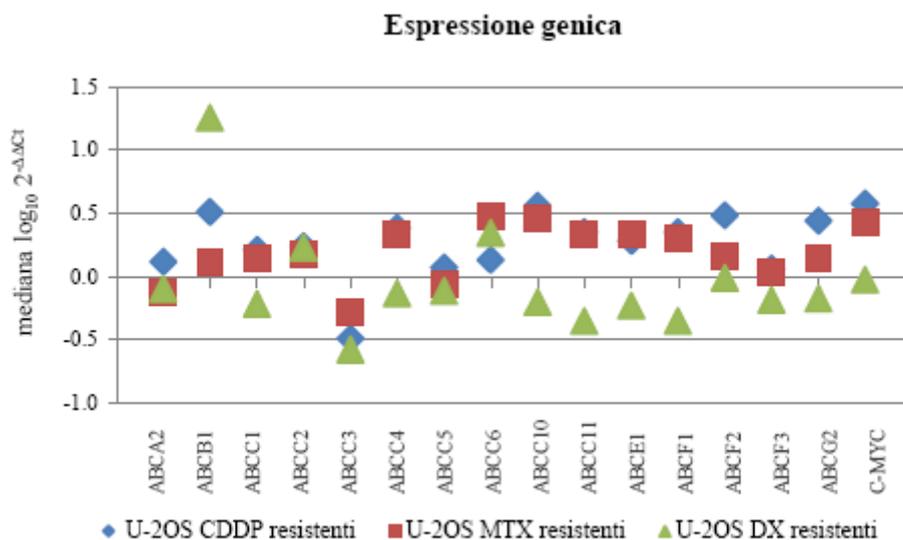


Figura 10. Andamento dell'espressione genica dei trasportatori ABC e di *C-MYC* nelle varianti della linea cellulare U-2OS resistenti a CDDP, MTX e DX calibrate verso la linea parentale U-2OS.

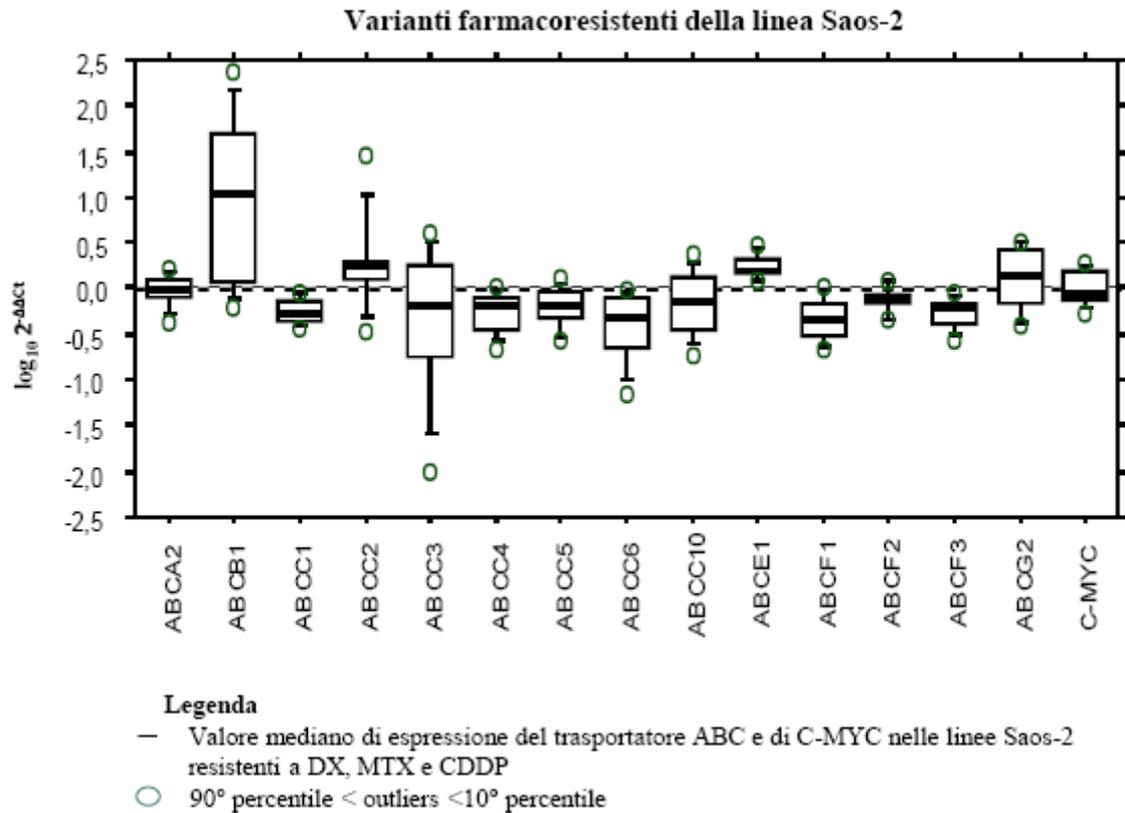


Figura 11. Nei Box plot è rappresentata l'espressione genica di 14 trasportatori ABC e dell'oncogene *C-MYC* ($\log_{10} 2^{-\Delta\Delta C_t}$), valutata tramite *quantitative real-time PCR*, sulle varianti della linea cellulare Saos-2 resistenti a DX, MTX e CDDP calibrate verso la linea parentale Saos-2.

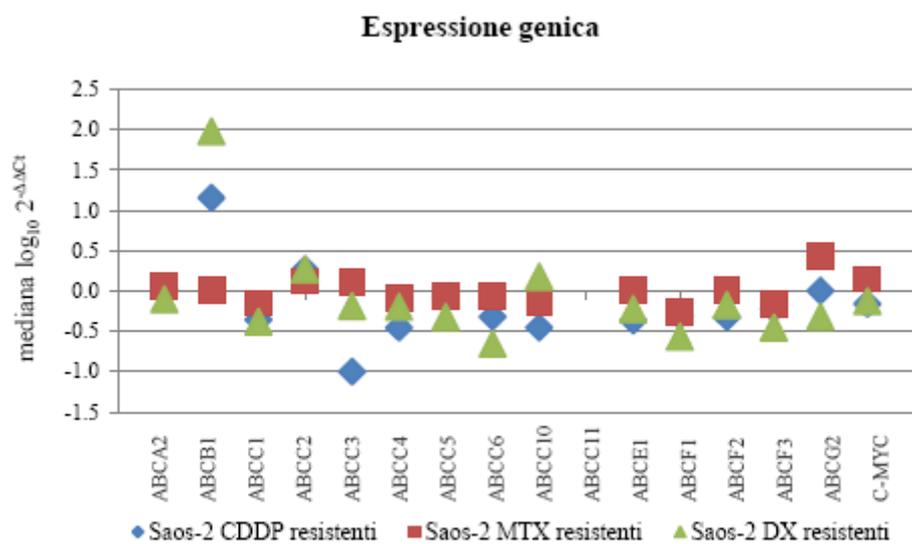


Figura 12. Andamento dell'espressione genica dei trasportatori ABC e di *C-MYC* nelle varianti della linea cellulare Saos-2 resistenti a CDDP, MTX e DX calibrate verso la linea parentale Saos-2.

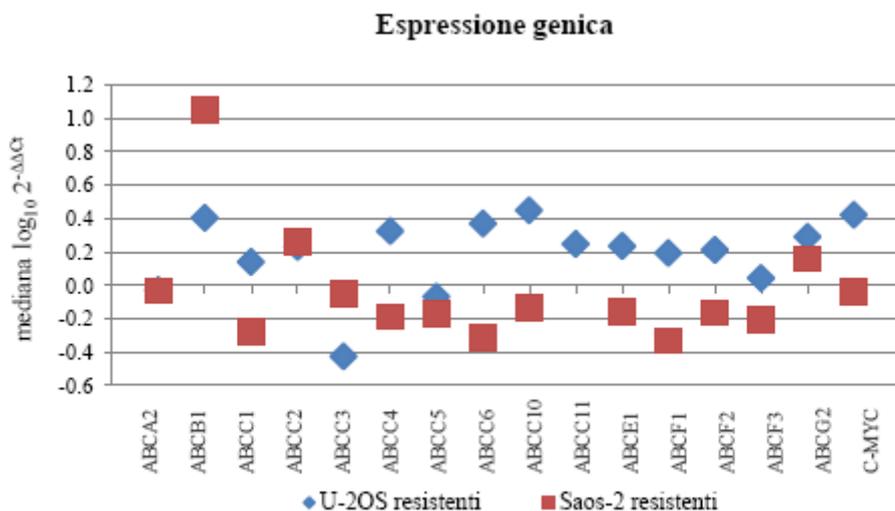


Figura 13. Andamento dell'espressione genica dei trasportatori ABC e di *C-MYC* nelle varianti farmacoresistenti derivate dalle linee cellulari U-2OS e Saos-2 calibrate verso le rispettive linee parentali.

5.1.2 Espressione genica e impatto clinico dei trasportatori ABC e dell'oncogene *C-MYC* su campioni clinici di pazienti affetti da osteosarcoma classico

Per meglio approfondire il significato dei dati ottenuti dalle linee cellulari, l'espressione dell'oncogene *C-MYC* e dei 16 trasportatori ABC è stata analizzata anche su una casistica di 34 pazienti affetti da osteosarcoma classico, trattati con protocolli omogenei di chemioterapia neoadjuvante basati sull'impiego di DX, MTX, CDDP e ifosfamide (**Tabella 3A**, capitolo Materiali e Metodi).

Come descritto nella sezione "Materiali e Metodi", in base alla mediana del livello di espressione genica di *C-MYC* e di ciascun trasportatore ABC, i pazienti sono stati suddivisi in due gruppi: pazienti esprimenti alti livelli del gene (categorizzati come "high") e pazienti esprimenti bassi livelli del gene (pazienti categorizzati come "low").

L'espressione di 8/16 (50%) trasportatori ABC è risultata essere correlata positivamente a quella di *C-MYC*, nel senso che ad elevati livelli di espressione di *C-MYC* corrispondono elevati livelli di espressione del trasportatore ABC (**Tabella 4**). Inoltre, l'elevata espressione di *C-MYC* al momento della diagnosi è risultata essere significativamente associata ad una prognosi peggiore in termini di sopravvivenza libera da malattia (*event-*

free survival, EFS), parametro strettamente associato all'aggressività basale ed alla risposta al trattamento da parte del tumore (**Figura 14**).

L'analisi delle curve di sopravvivenza libera da malattia ha anche messo in evidenza che l'elevata espressione di trasportatori ABC al momento della diagnosi correla con un decorso clinico sfavorevole (**Tabella 4**). In particolare, l'elevata espressione di *ABCC1* e *ABCC4* correla in modo significativo con una peggiore sopravvivenza libera da malattia (**Tabella 4**). Inoltre, anche l'elevata espressione di *ABCC2* e di *ABCF1* presenta una tendenza molto netta verso un'associazione con una peggiore sopravvivenza libera da malattia, con valori di *P* molto vicini alla significatività statistica (rispettivamente $P = 0.07$ per *ABCC2* e $P = 0,08$ per *ABCC4*). I risultati ottenuti quindi, oltre a confermare il valore prognostico avverso della sovraespressione, al momento della diagnosi, di *C-MYC* (Scionti et al, 2008), hanno anche evidenziato il possibile impatto clinico di trasportatori ABC mai riportati prima nell'osteosarcoma.

Al fine di verificare ulteriormente se tali trasportatori ABC e l'oncogene *C-MYC* possano essere costitutivamente e simultaneamente sovraespressi, l'analisi è stata estesa anche su una più ampia casistica composta da 66 campioni biotipici di osteosarcoma classico. In tale casistica non è stato possibile valutare l'impatto prognostico del livello di espressione genica dei trasportatori ABC e dell'oncogene *C-MYC* in quanto composta da pazienti trattati con protocolli chemioterapici differenti. I risultati ottenuti hanno indicato che l'espressione di 12/14 (86%) trasportatori ABC correla positivamente con quella di *C-MYC* (**Tabella 5**), confermando il dato ottenuto per 6 degli 8 trasportatori indicati come correlati a *C-MYC* nella casistica precedentemente analizzata (**Tabella 4**). In questa seconda casistica è stato anche valutato il livello di espressione globale dei 66 casi clinici di osteosarcoma in riferimento a quello di OBL umani normali. Come evidenziato nella **Figura 15**, l'oncogene *C-MYC* e la maggior parte dei trasportatori ABC (ad eccezione di *ABCA2*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC6* e *ABCF2*) sono espressi a livelli più alti nei campioni clinici rispetto agli OBL normali. I trasportatori *ABCC11* e *ABCC12* sono stati omessi dalla **Figura 15** in quanto non sono risultati espressi a livelli rilevabili in nessun campione clinico analizzato. Questi risultati confermano come, nell'osteosarcoma classico, elevati livelli di espressione basale di diversi trasportatori ABC e di *C-MYC* possano essere già presenti simultaneamente al momento della diagnosi, con possibili importanti conseguenze sulla successiva risposta al trattamento e sul decorso clinico. Inoltre, questi risultati avvalorano ulteriormente l'ipotesi postulata, in precedenti studi condotti nel laboratorio

dove è stato svolto il suddetto programma di ricerca (Scionti et al, 2008; evidenze non pubblicate sulla regolazione trascrizionale di diversi geni da parte di *C-MYC*), che suggerisce la capacità di C-MYC di influenzare la risposta al trattamento ed il decorso clinico dei pazienti con osteosarcoma attraverso la modulazione del livello di espressione di diversi geni ABC. Considerando globalmente tutti i risultati ottenuti fino a questo punto dello studio, si è quindi operata una selezione dei trasportatori ABC emersi come potenzialmente più rilevanti per l'osteosarcoma, sui quali procedere con indagini più approfondite volte a definirne meglio il ruolo biologico e clinico nell'osteosarcoma. Basandosi in particolare sulle evidenze emerse riguardo la possibile relazione con lo sviluppo di farmacoresistenza ed il decorso clinico sono stati selezionati i seguenti 9 trasportatori: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5*, *ABCC6*, *ABCC10* e *ABCG2*.

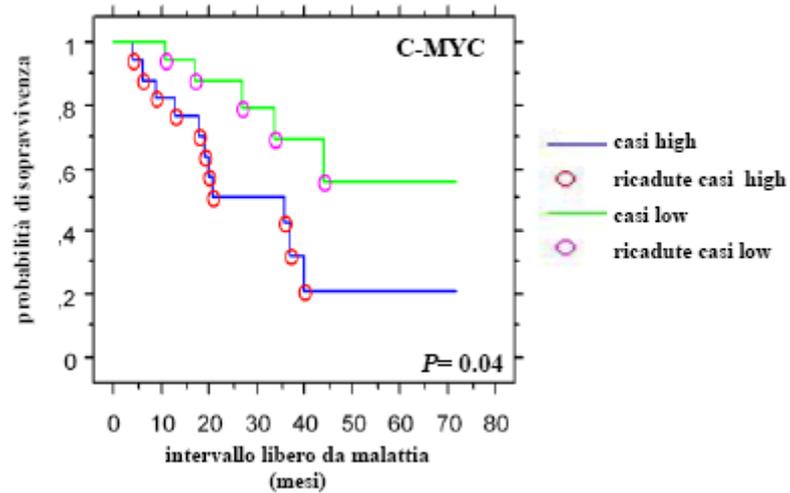


Figura 14. Sopravvivenza libera da malattia (*event-free survival, EFS*) in 34 pazienti affetti da osteosarcoma ad alto grado in base alla valutazione dell'espressione genica dell'oncogene *C-MYC* al momento della diagnosi.

| Gene ABC | Correlazione con <i>C-MYC</i> (Fisher's exact test) | Correlazione con <i>EFS</i> (Event-free survival) |
|---------------|--|--|
| <i>ABCA2</i> | n. s. | n. s. |
| <i>ABCB1</i> | n. s. | n. s. |
| <i>ABCC1</i> | 0,04 | 0,031 |
| <i>ABCC2</i> | 0,003 | n. s. |
| <i>ABCC3</i> | n. s. | n. s. |
| <i>ABCC4</i> | n. s. | 0,049 |
| <i>ABCC5</i> | 0,04 | n. s. |
| <i>ABCC6</i> | n. s. | n. s. |
| <i>ABCC10</i> | n. s. | n. s. |
| <i>ABCC11</i> | 0,005 | n. s. |
| <i>ABCE1</i> | 0,005 | n. s. |
| <i>ABCF1</i> | 0,0004 | n. s. |
| <i>ABCF2</i> | 0,04 | n. s. |
| <i>ABCF3</i> | 0,04 | n. s. |
| <i>ABCG2</i> | n. s. | n. s. |

n.s. = non significativo

Tabella 4. Correlazione del livello di espressione dei geni ABC con il livello di espressione di *C-MYC* e con il decorso clinico in termini di sopravvivenza libera da malattia (*event-free survival, EFS*) in 34 pazienti affetti da osteosarcoma ad alto grado.

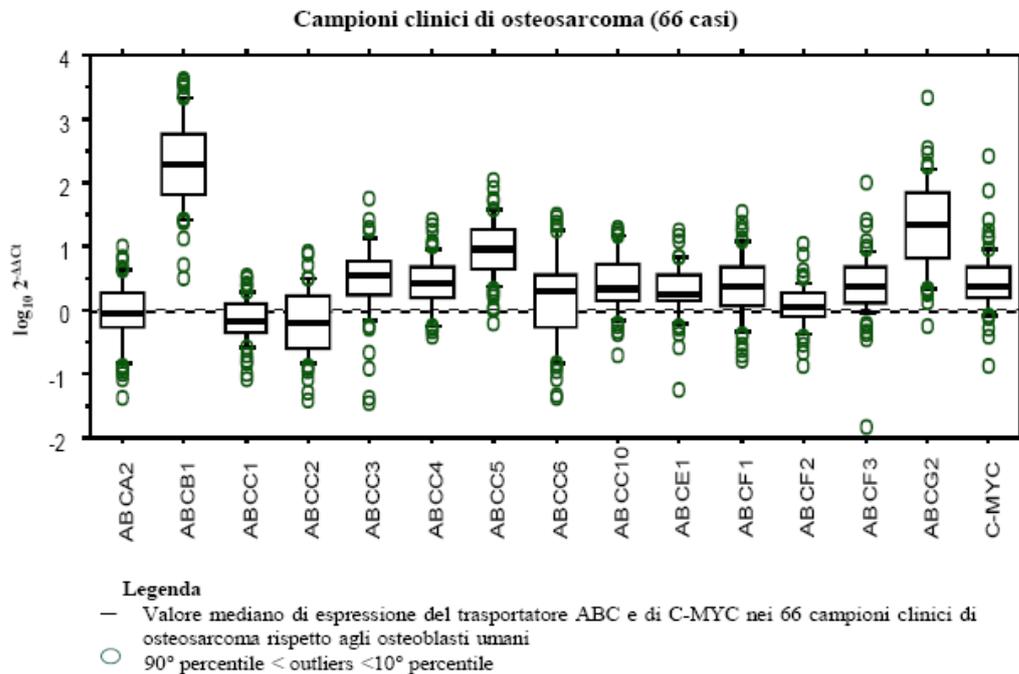


Figura 15. Nei Box plot è rappresentata l'espressione genica di 14 trasportatori ABC e dell'oncogene C-MYC ($\log_{10} 2^{-\Delta\Delta C_t}$), valutata tramite quantitative real-time PCR, su 66 campioni clinici di osteosarcoma calibrati verso gli osteoblasti umani normali.

| Gene ABC | Correlazione con C-MYC (Fisher's exact test) |
|---------------|---|
| <i>ABCA2</i> | 0,048 |
| <i>ABCB1</i> | n. s. |
| <i>ABCC1</i> | 0,047 |
| <i>ABCC2*</i> | 0,013 |
| <i>ABCC3</i> | n. s. |
| <i>ABCC4</i> | 0,003 |
| <i>ABCC5*</i> | 0,005 |
| <i>ABCC6</i> | 0,037 |
| <i>ABCC10</i> | 0,048 |
| <i>ABCE1*</i> | 0,003 |
| <i>ABCF1*</i> | 0,013 |
| <i>ABCF2*</i> | <0,0001 |
| <i>ABCF3*</i> | 0,003 |
| <i>ABCG2</i> | 0,001 |

*correlazione con C-MYC anche nei 34 casi di osteosarcoma classico
n.s. = non significativo

Tabella 5. Correlazione tra l'espressione di ciascun trasportatore ABC e l'espressione di C-MYC nella casistica di 66 pazienti affetti da osteosarcoma classico.

5.2.1 Espressione proteica dei trasportatori ABC in linee cellulari di osteosarcoma umano

L'espressione dei 9 trasportatori ABC, selezionati in base ai dati di espressione genica, è stata valutata anche a livello proteico con tecniche di immunofluorescenza su cellule fissate di 6 linee di osteosarcoma farmacosensibili (U-2OS, Saos-2, IOR/OS9, IOR/OS10, IOR/OS18, e MG-63) e 6 varianti resistenti a DX (U-2OS/DX580 e Saos-2/DX580), MTX (U-2OS/MTX300 e Saos-2/MTX300) o CDDP (U-2OS/CDDP4 μ g e Saos-2/ CDDP6 μ g).

L'espressione delle proteine ABC nel gruppo delle linee cellulari farmacosensibili è risultata essere abbastanza simile a quella degli OBL umani normali (**Figura 16**). In particolare, mentre le proteine ABCC4, ABCC5, ABCC6 e ABCC10 sono risultate essere espresse a livelli molto bassi sia negli osteoblasti che nelle linee farmacosensibili, le proteine con i più alti livelli di espressione sono risultate essere ABCB1 e ABCC1 (**Figura 16**).

Nelle varianti farmacoresistenti della linea U-2OS (**Figura 17**), le proteine ABCB1, e ABCC1 risultano essere più espresse rispetto alla linea parentale e presentano anche livelli di espressione più alti di quelli di tutti gli altri trasportatori ABC.

Il quadro si ripete nel pannello delle varianti farmacoresistenti della linea Saos-2 (**Figura 18**). Anche in questo caso infatti le proteine con il più alto livello di espressione e maggiormente espresse nelle varianti resistenti rispetto alle linee parentali sono risultate essere ABCB1 e ABCC1.

Considerando nel loro complesso tutti i dati di espressione, ottenuti sia sulle linee cellulari che sui campioni clinici, è stato quindi possibile indicare in ABCB1 e ABCC1 i trasportatori ABC maggiormente implicati nello sviluppo di farmacoresistenza nell'osteosarcoma. L'ultima fase di questo programma di ricerca si è quindi focalizzata sull'analisi di questi due trasportatori al fine di definirne più in dettaglio il ruolo nella risposta cellulare ai farmaci chemioterapici, l'impatto clinico e le possibili strategie da prendere in considerazione per un'eventuale reversione della farmacoresistenza da essi generata nelle cellule di osteosarcoma.

Il livello di espressione delle proteine ABCB1 e ABCC1 è stato quindi analizzato in modo ancor più dettagliato in tutte le varianti resistenti alla DX e nelle varianti con più alti livelli di resistenza a MTX e CDDP rispetto alle linee parentali di derivazione. Queste analisi hanno messo in evidenza un rilevante e progressivo aumento dei livelli della proteina ABCB1 nelle varianti resistenti alla DX, ed un aumento, se pur notevolmente minore, anche nelle varianti resistenti a MTX e CDDP (**Figura 19**). I livelli di proteina ABCC1

invece non presentano significativi incrementi nelle varianti farmacosensibili rispetto alle linee parentali, non evidenziando quindi una correlazione diretta con lo sviluppo di resistenza verso DX, MTX o CDDP (**Figura 19**).

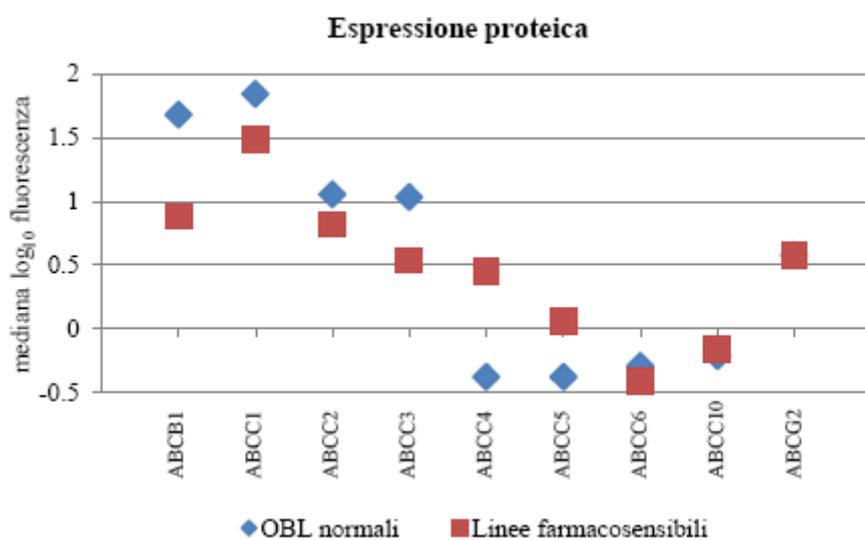


Figura 16. Andamento dell'espressione proteica di 9 trasportatori ABC (valore mediano della fluorescenza), valutata tramite immunofluorescenza, sugli osteoblasti umani normali (OBL normali) e sulle linee farmacosensibili.

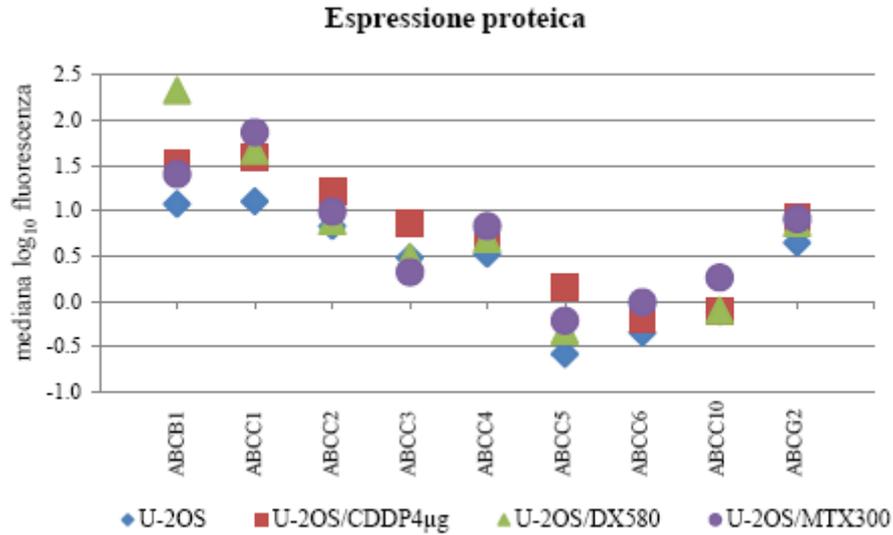


Figura 17. Andamento dell'espressione proteica di 9 trasportatori ABC (valore mediano della fluorescenza), valutata tramite immunofluorescenza, sulla linea cellulare U-2OS e sulle sue varianti con il più alto livello di resistenza a DX, MTX e CDDP.

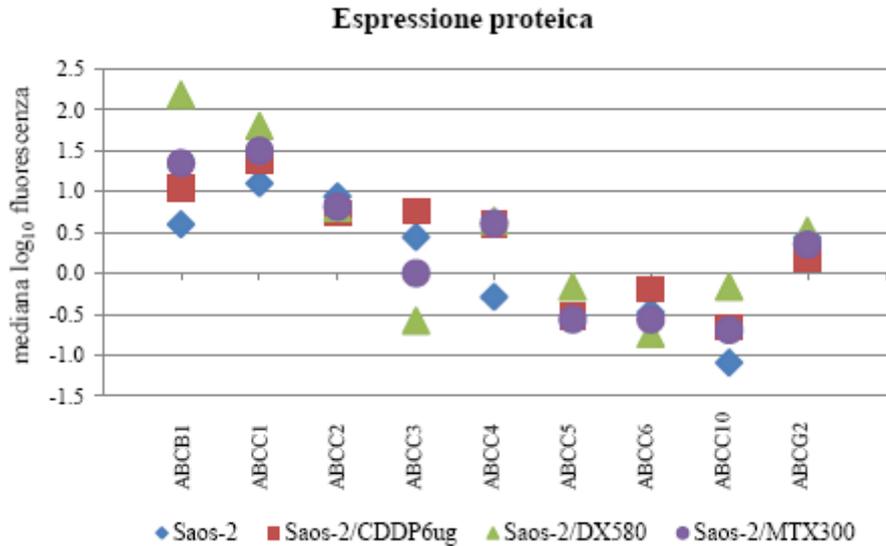


Figura 18. Andamento dell'espressione proteica di 9 trasportatori ABC (valore mediano della fluorescenza), valutata tramite immunofluorescenza, sulla linea cellulare Saos-2 e sulle sue varianti con il più alto livello di resistenza a DX, MTX e CDDP.

Espressione proteica dei trasportatori ABCB1 e ABCC1

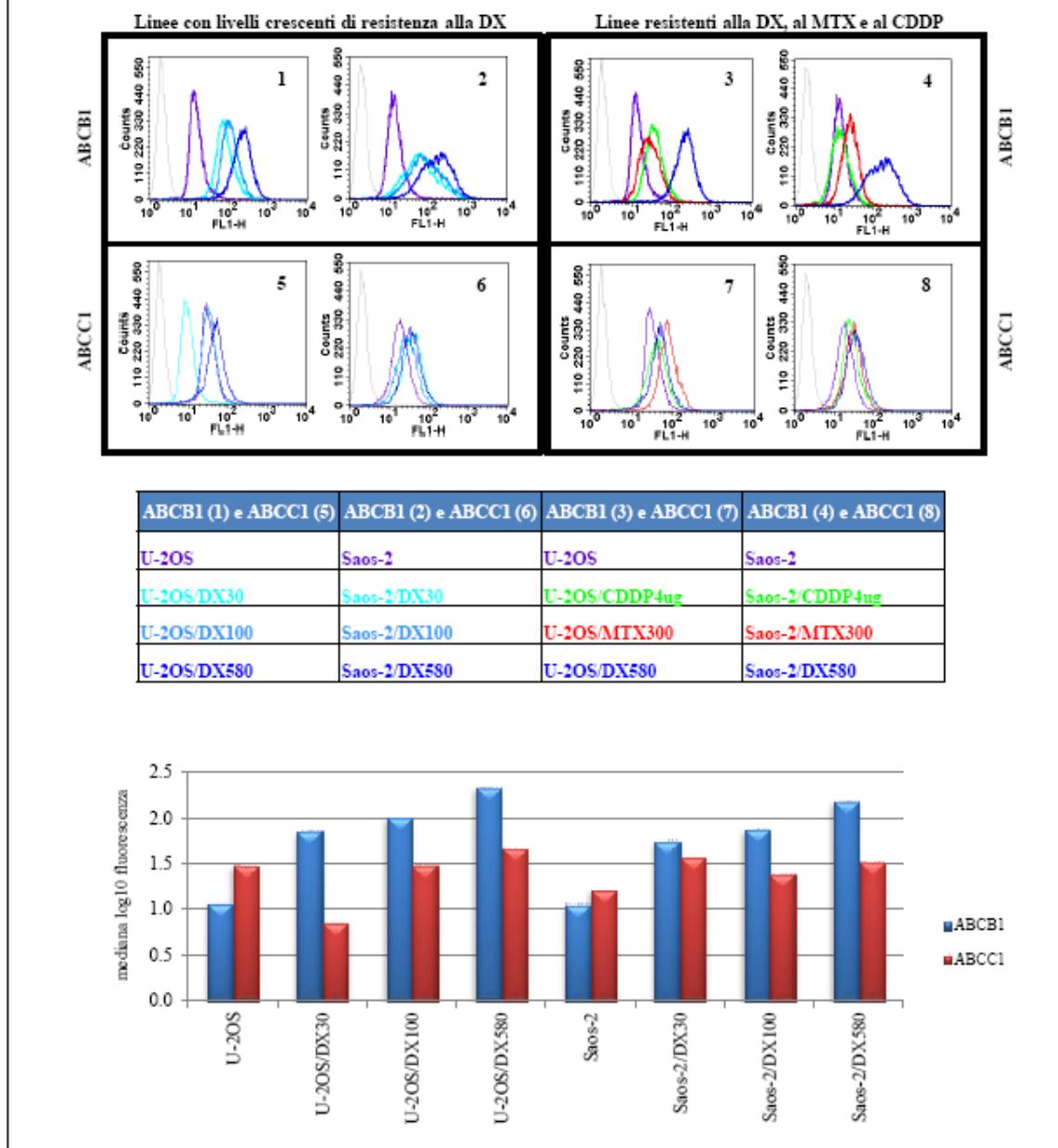


Figura 19. Espressione proteica di ABCB1 e ABCC1, valutata tramite immunofluorescenza, sulle linee cellulari U-2OS e Saos-2 e su un pannello di loro varianti resistenti a doxorubicina, methotrexate e cisplatino.

5.2.2 Valutazione dell'impatto prognostico del livello di espressione delle proteine ABCB1 e ABCC1

Studi pubblicati in precedenza hanno dimostrato che, in pazienti affetti da osteosarcoma classico, l'elevata espressione di ABCB1 al momento della diagnosi è correlata con una prognosi avversa (Baldini et al, 1995; Serra et al, 1999, 2003, 2006). L'analisi in immunohistochimica di ABCB1 è stata eseguita in uno studio precedente (Serra et al, 2006) e la correlazione con la prognosi, mostrata in **Figura 20**, è stata rivalutata in questo studio dopo avere aggiornato il *follow-up* dei pazienti inclusi nella casistica ISG-SSG1. Per tale motivo in questo nuovo programma di ricerca è stata presa in esame solo la valutazione dell'espressione proteica di ABCC1 sulla stessa casistica. Una positività immunohistochimica (assimilabile a sovraespressione) per ABCC1 è stata riscontrata in 70/94 pazienti (74%).

A differenza di ABCB1, il diverso livello di espressione di ABCC1 non è però risultato essere correlato alla prognosi, nè in termini di sopravvivenza libera da malattia (*event free survival*, EFS) (**Figura 20**) nè tantomeno in termini di sopravvivenza globale (*overall survival*, OVS). Questi risultati mostrano come ABCB1 sia il trasportatore clinicamente più rilevante per l'osteosarcoma.

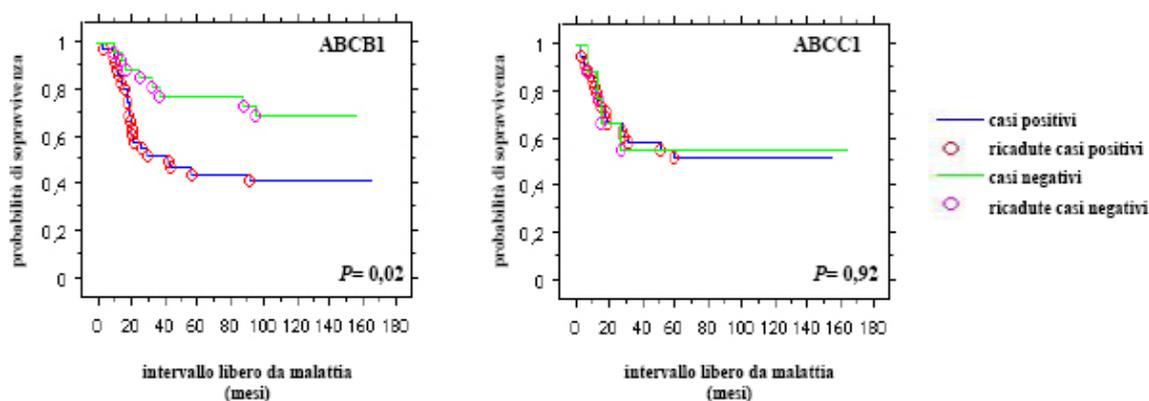


Figura 20. Sopravvivenza libera da malattia (*event-free survival*, EFS) in pazienti affetti da osteosarcoma ad alto grado in base alla valutazione dell'espressione proteica di ABCB1 e ABCC1 al momento della diagnosi.

5.3 Inibizione della funzionalità di ABCB1 e ABCC1

L'ultima fase dello studio ha riguardato l'analisi preclinica dell'efficacia di una strategia di trattamento volta ad inibire ABCB1 e ABCC1 attraverso l'utilizzazione di un revertante di IV generazione (CBT-1).

5.3.1 Effetto di CBT-1 sull'attività di ABCB1

Per verificare la capacità di CBT-1 di legare ed inibire ABCB1 sono stati effettuati esperimenti di incorporazione della rodamina 123, una molecola fluorescente che è un noto substrato di questo trasportatore. Gli esperimenti sono stati condotti sulle linee cellulari farmacosensibili U-2OS e Saos-2 e sulle loro varianti con il più alto livello di resistenza alla DX e di espressione di ABCB1 (U-2OS/DX580 e Saos-2/DX580).

Le analisi citofluorimetriche hanno messo in evidenza che le linee farmacosensibili mostrano una massiva incorporazione di rodamina 123, che non aumenta ulteriormente in presenza di CBT-1 (**Figura 21 e Tabella 6**). Le varianti farmacoresistenti presentano invece un'incorporazione basale di rodamina 123 molto più bassa, ma che aumenta progressivamente, fino a raggiungere i livelli di incorporazione delle linee parentali, in seguito a trattamento con dosi crescenti di CBT-1 (**Figura 21 e Tabella 6**).

I dati ottenuti in citofluorimetria sono stati ulteriormente validati da esperimenti di valutazione dell'incorporazione della rodamina 123 (che si localizza a livello mitocondriale) in microscopia a fluorescenza. L'analisi microscopica ha confermato a pieno i dati ottenuti in citofluorimetria, evidenziando come il trattamento con CBT-1 faccia aumentare l'entità dell'incorporazione intracellulare di rodamina 123 nelle linee farmacoresistenti U-2OS/DX580 e Saos-2/DX580, fino a raggiungere livelli simili a quelli riscontrabili nelle loro linee parentali farmacosensibili (**Figura 22**). I dati ottenuti hanno confermano quindi la capacità di CBT-1 di legare ed inibire ABCB1.

Per quantificare l'efficacia dell'inibizione di ABCB1 operata da CBT-1 sono stati condotti esperimenti in citofluorimetria per analizzare l'efflusso extracellulare di rodamina 123 in assenza ed in presenza di CBT-1 sulle linee cellulari farmacosensibili U-2OS e Saos-2 e sulle loro varianti con la più elevata espressione di ABCB1 e livello di resistenza alla DX (U-2OS/DX580 e Saos-2/DX580).

Mentre l'entità dell'incorporazione intracellulare di rodamina 123 e la sua permanenza all'interno della cellula non viene influenzata dal trattamento con CBT-1 nelle linee parentali, nelle varianti farmacoresistenti il revertante determina il mantenimento di elevati

livelli intracellulari di rodamina 123, in seguito ad un'inibizione del suo efflusso extracellulare ABCB1-dipendente, soprattutto se utilizzato alla dose 10 μ M (**Figura 23**). Questi risultati confermano la grande efficacia di CBT-1 nel ripristinare e nel mantenere elevati livelli cellulari dei substrati di ABCB1 in cellule sovraesprimenti questo trasportatore analoghi a quelli riscontrabili in cellule senza sovraespressione di ABCB1.

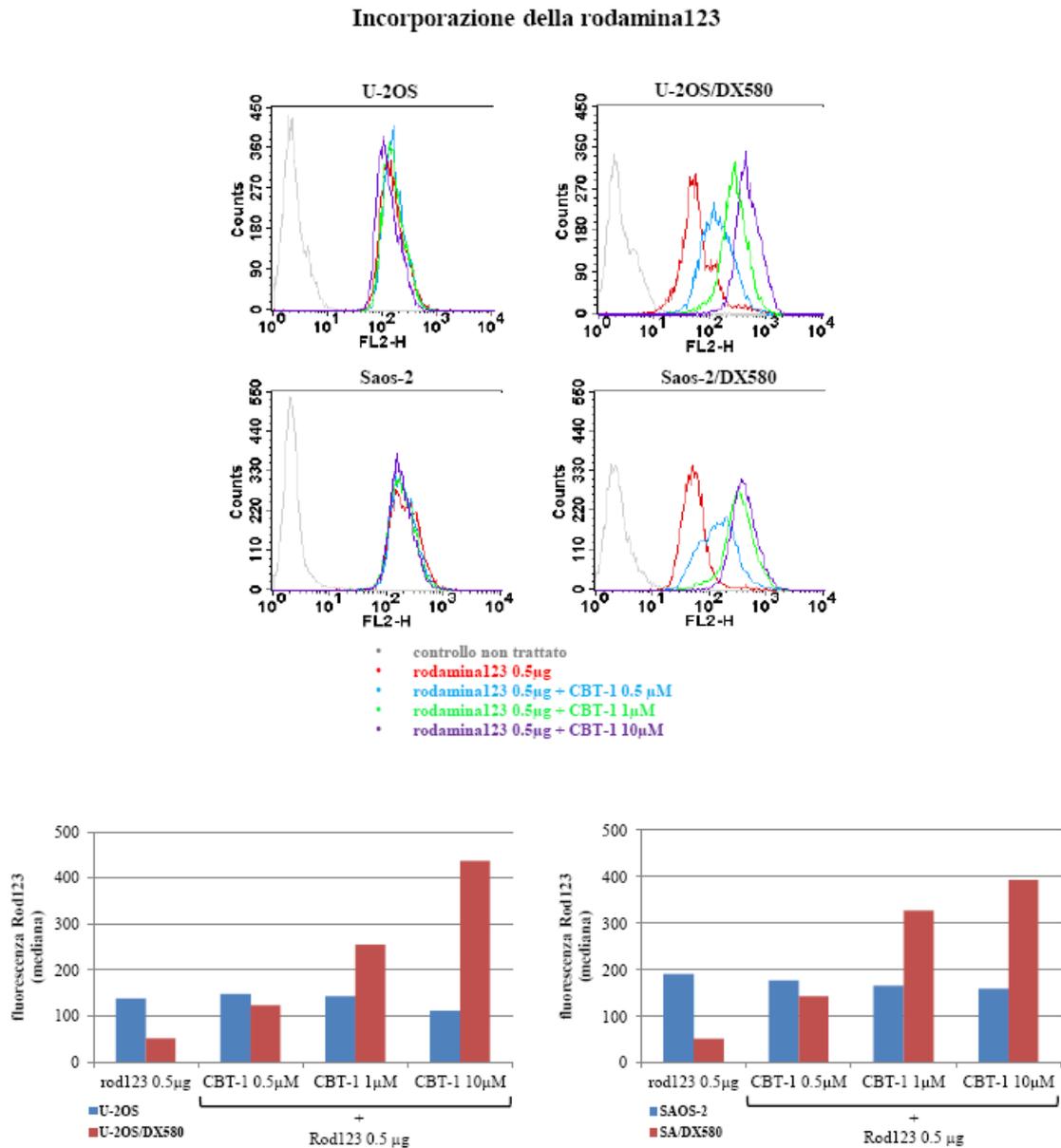


Figura 21. Incorporazione intracellulare di rodamina 123 (rod123), substrato fluorescente del trasportatore ABCB1, valutata in citofluorimetria, in assenza ed in presenza di tre diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 μ M), nelle linee parentali U-2OS e Saos-2 e sulle loro varianti selezionate con il pi \dot{u} alto livello di resistenza alla DX.

| Indice di aumento dell'incorporazione intracellulare della rodamina123 (rod123 0.5µg+CBT1/rod123 0.5µg) | | | | |
|--|-------|-------------|--------|--------------|
| campioni | U-2OS | U-2OS/DX580 | Saos-2 | Saos-2/DX580 |
| rod123 0.5µg + CBT-1 0.5µM | 1,1 | 2,4 | 0,9 | 2,7 |
| rod123 0.5µg + CBT-1 1µM | 1,0 | 4,9 | 0,9 | 6,3 |
| rod123 0.5µg + CBT-1 10µM | 0,8 | 8,4 | 0,8 | 7,5 |

Tabella 6. Indice di aumento dell'incorporazione intracellulare di rodamina 123 (rod123), substrato fluorescente del trasportatore ABCB1, valutata in citofluorimetria, che è dato dal rapporto del valore della fluorescenza emessa dalle cellule incubate con la rodamina 123 e tre diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 µM), con la fluorescenza emessa dalle cellule incubate con la sola rodamina 123. Nella tabella sono riportati i valori relativi alle linee parentali U-2OS e Saos-2 e alle loro varianti con il più alto livello di resistenza alla DX.

Incorporazione della rodamina123

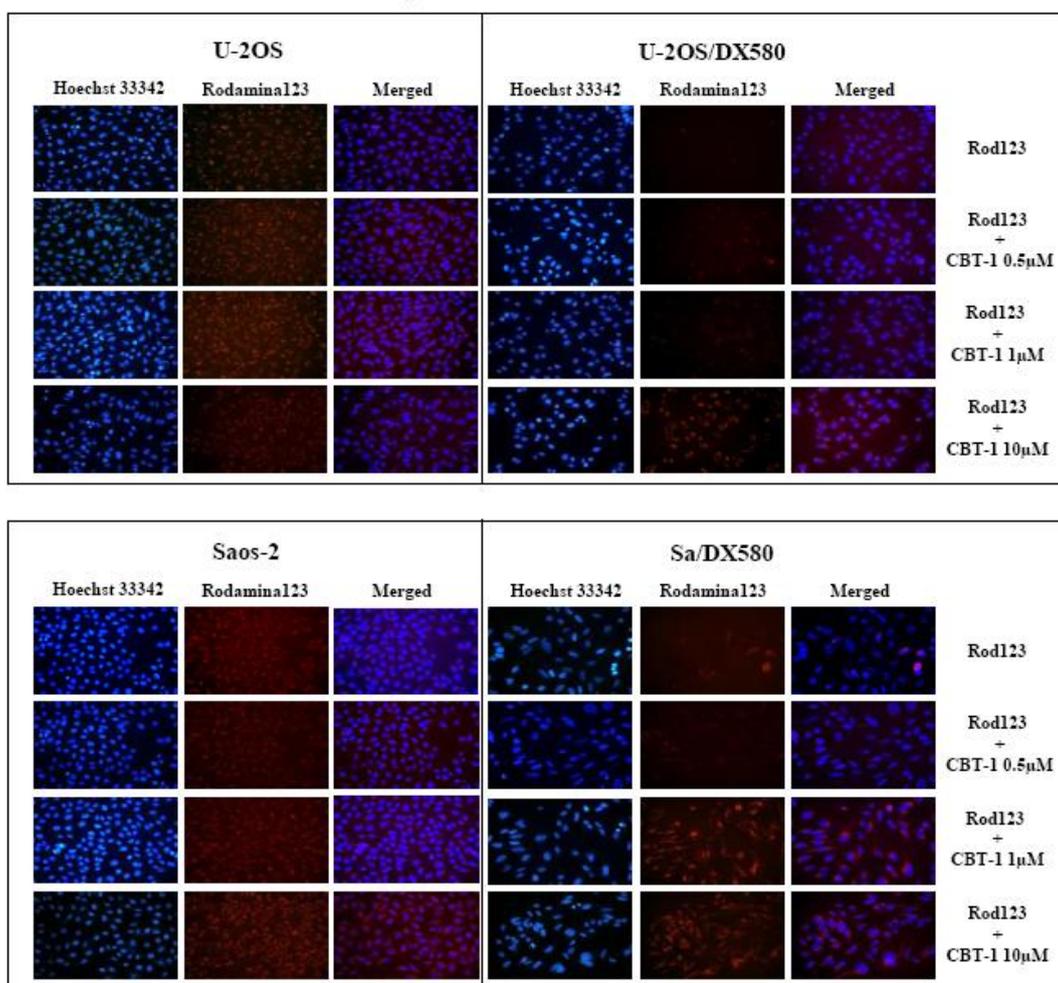


Figura 22. Incorporazione intracellulare di rodamina 123 (rod123), substrato fluorescente del trasportatore ABCB1, valutata in microscopia a fluorescenza, in assenza ed in presenza di tre diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 µM), nelle linee parentali U-2OS e Saos-2 e sulle loro varianti con il più alto livello di resistenza alla DX.

Saggio di efflusso della rodamina 123

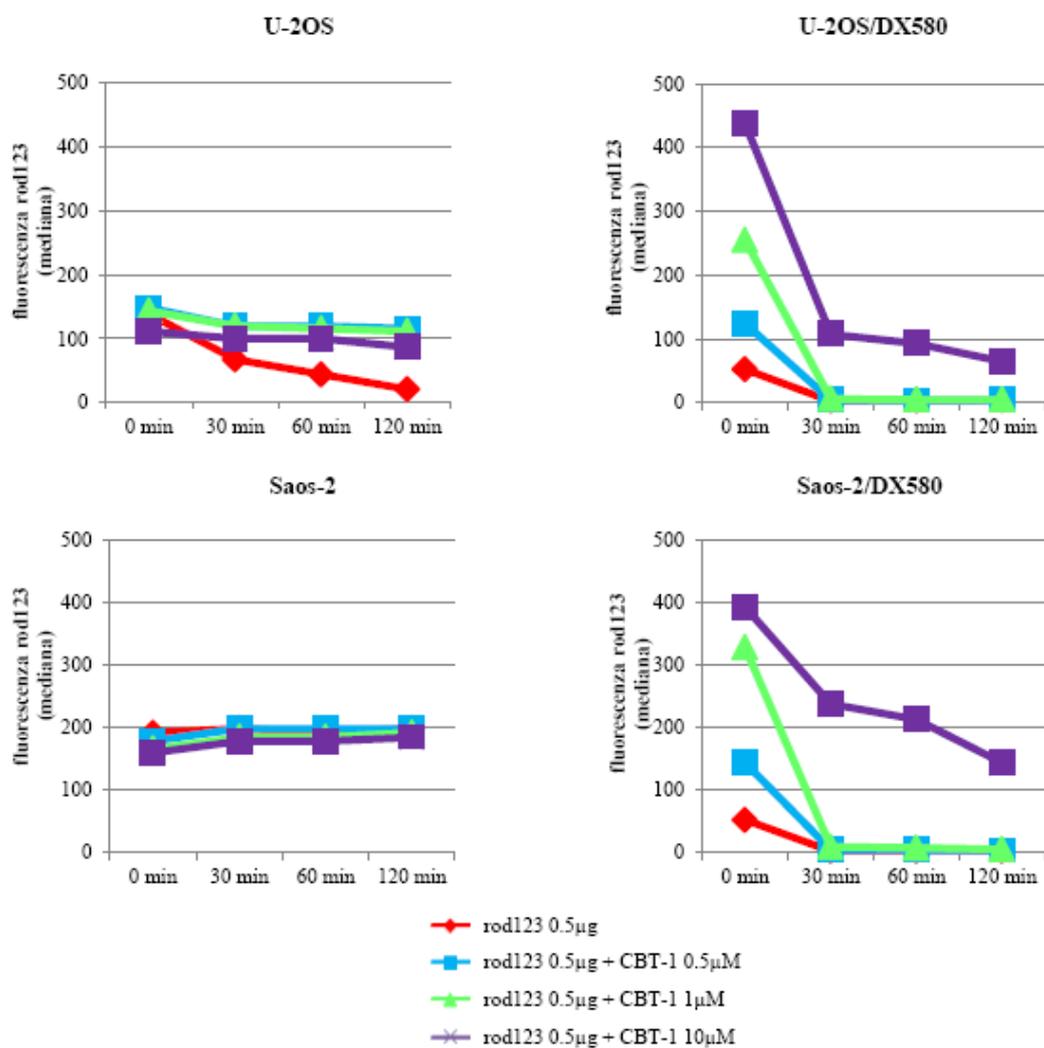


Figura 23. Efflusso extracellulare di rodamina 123 (rod123), substrato fluorescente del trasportatore ABCB1, valutata in citofluorimetria, in assenza ed in presenza di tre diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 μ M), nelle linee parentali U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti con il più alto livello di resistenza alla DX.

5.3.2 Effetti di CBT-1 sull'incorporazione intracellulare e efflusso extracellulare di doxorubicina

Analogamente a quanto fatto utilizzando la rodamina 123, è stata verificata anche la capacità di CBT-1 di interagire negativamente con l'efflusso extracellulare di DX mediato da ABCB1 e /o ABCC1, utilizzando la naturale fluorescenza rossa del chemioterapico.

Le analisi citofluorimetriche hanno messo in evidenza che le linee farmacosensibili mostrano un'elevata incorporazione di DX, che non aumenta ulteriormente in presenza di CBT-1 (**Figura 24** e **Tabella 7**). Le varianti farmacoresistenti presentano invece un'incorporazione basale di DX molto più bassa, ma che aumenta in seguito a trattamento con CBT-1 fino a raggiungere, con la dose 10 μ M, livelli di incorporazione simili a quelli delle linee parentali (**Figura 24** e **Tabella 7**).

I risultati ottenuti dagli esperimenti di efflusso di DX in assenza o presenza di CBT-1 hanno confermato a pieno le evidenze emerse con la rodamina 123. Infatti, mentre l'entità dell'efflusso di DX non viene influenzata in modo significativo dal trattamento con CBT-1 nelle linee parentali, nelle varianti farmacoresistenti il revertante determina il mantenimento di elevati livelli intracellulari di DX, come conseguenza dell'inibizione del suo efflusso extracellulare, soprattutto con la dose 10 μ M (**Figura 25**).

In accordo con questi dati, le analisi di incorporazione di DX in microscopia a fluorescenza hanno evidenziato come il trattamento con CBT-1 faccia aumentare l'entità dell'incorporazione intranucleare di DX nelle linee farmacoresistenti U-2OS/DX580 e Saos-2/DX580, raggiungendo livelli simili a quelli riscontrabili nelle loro linee parentali farmacosensibili (**Figura 26**).

Questi risultati confermano ulteriormente la grande efficacia di CBT-1 nel mantenere elevati livelli intracellulari e intranucleari di DX anche in cellule sovraesprimenti ABCB1 e ABCC1, inibendo la funzionalità di questo trasportatore e ripristinando di conseguenza una situazione di farmacosensibilità in cellule farmacoresistenti.

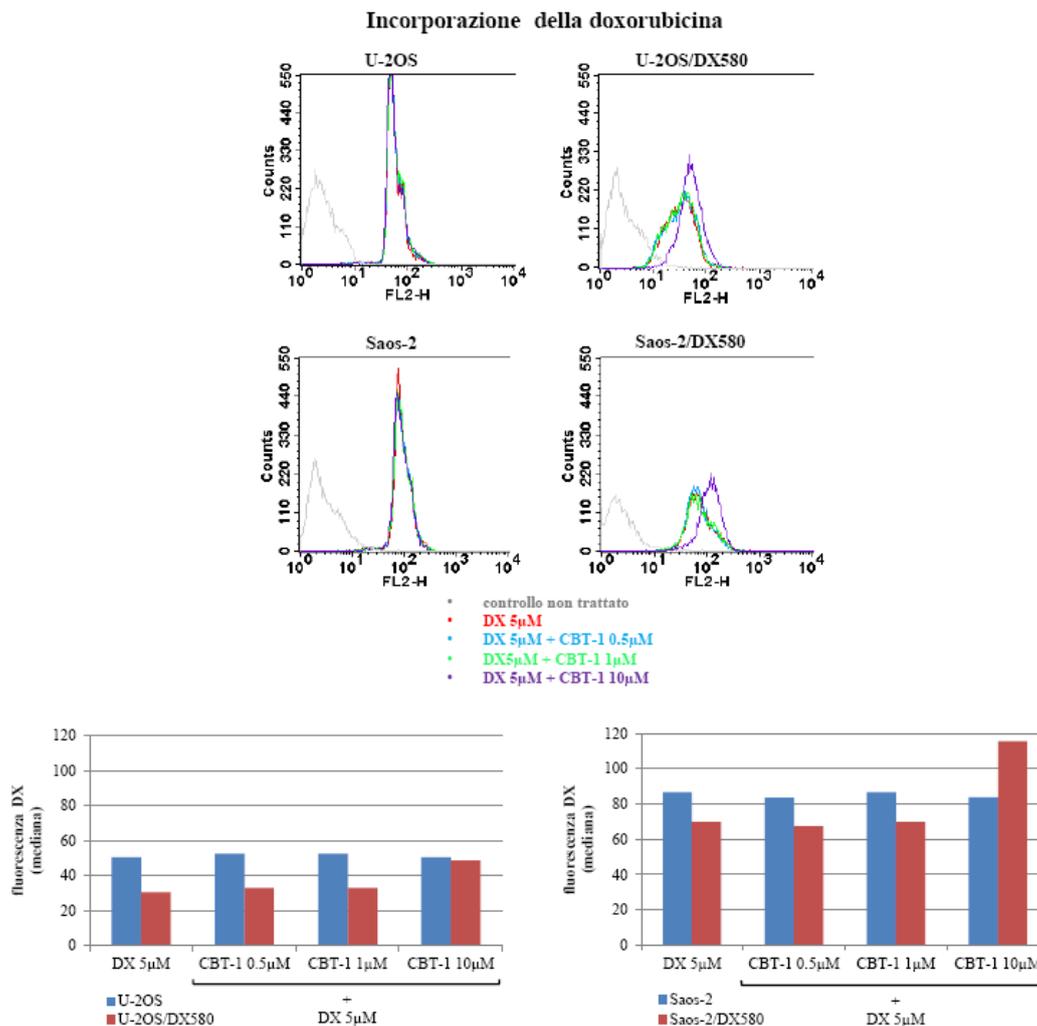


Figura 24. Incorporazione intracellulare di doxorubicina (DX), valutata in citofluorimetria, in assenza ed in presenza di tre diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 µM), nelle linee parentali U-2OS e Saos-2 e sulle loro varianti con il più alto livello di resistenza alla DX.

| Indice di aumento dell'incorporazione intracellulare di doxorubicina (DX 5µM+CBT1/DX 5µM) | | | | |
|--|-------|-------------|--------|--------------|
| campioni | U-2OS | U-2OS/DX580 | Saos-2 | Saos-2/DX580 |
| DX 5µM + CBT-1 0.5µM | 1,0 | 1,1 | 1,0 | 1,0 |
| DX 5µM + CBT-1 1µM | 1,0 | 1,1 | 1,0 | 1,0 |
| DX 5µM + CBT-1 10µM | 1,0 | 1,6 | 1,0 | 1,7 |

Tabella 7. Indice di aumento dell'incorporazione intracellulare di doxorubicina (DX), valutata in citofluorimetria, che è dato dal rapporto del valore della fluorescenza emessa dalle cellule incubate con la DX e tre diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 µM), con la fluorescenza emessa dalle cellule incubate con la sola DX. Nella tabella sono riportati i valori relativi alle linee parentali U-2OS e Saos-2 e alle loro varianti con il più alto livello di resistenza alla DX.

Saggio di efflusso della doxorubicina

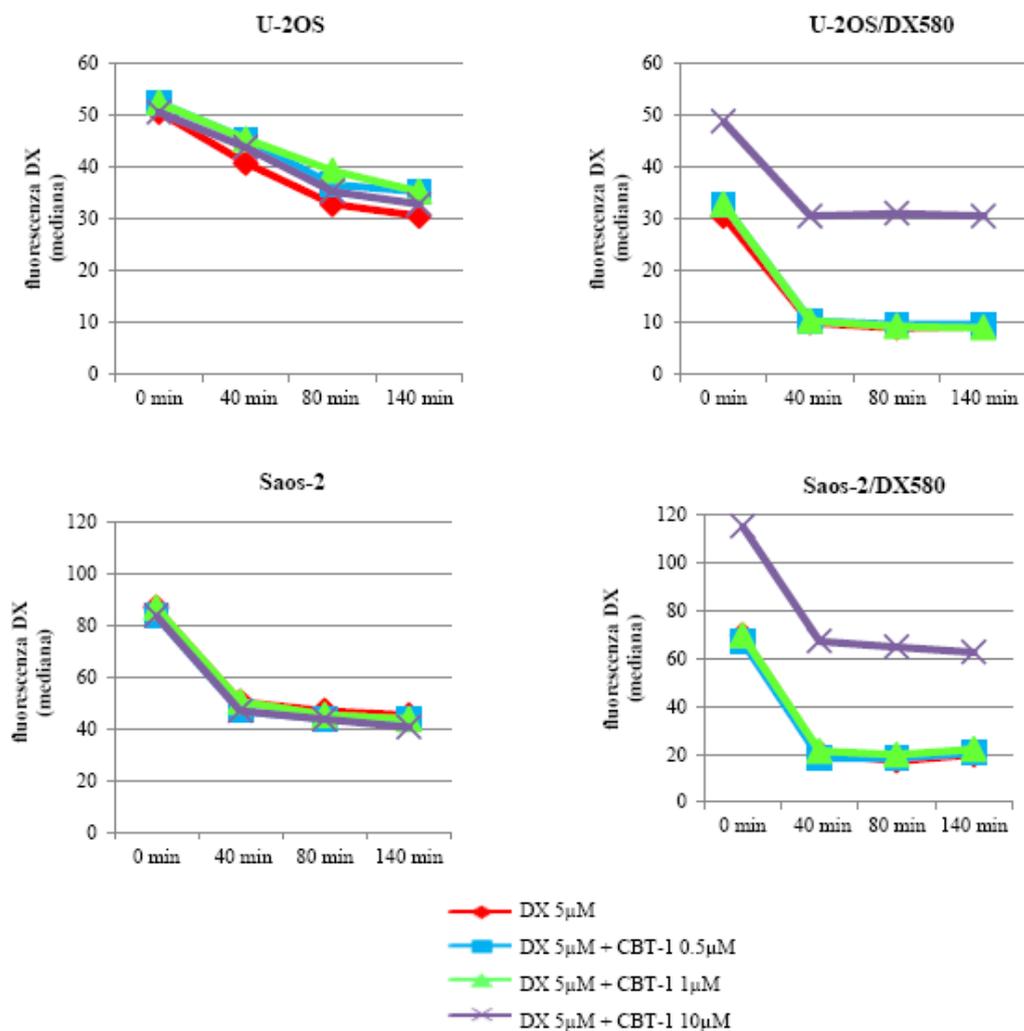


Figura 25. Efflusso extracellulare di doxorubicina (DX), valutata in citofluorimetria, in assenza ed in presenza di tre diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 µM), nelle linee parentali U-2OS e Saos-2 e sulle loro varianti con il più alto livello di resistenza alla DX.

Incorporazione della doxorubicina

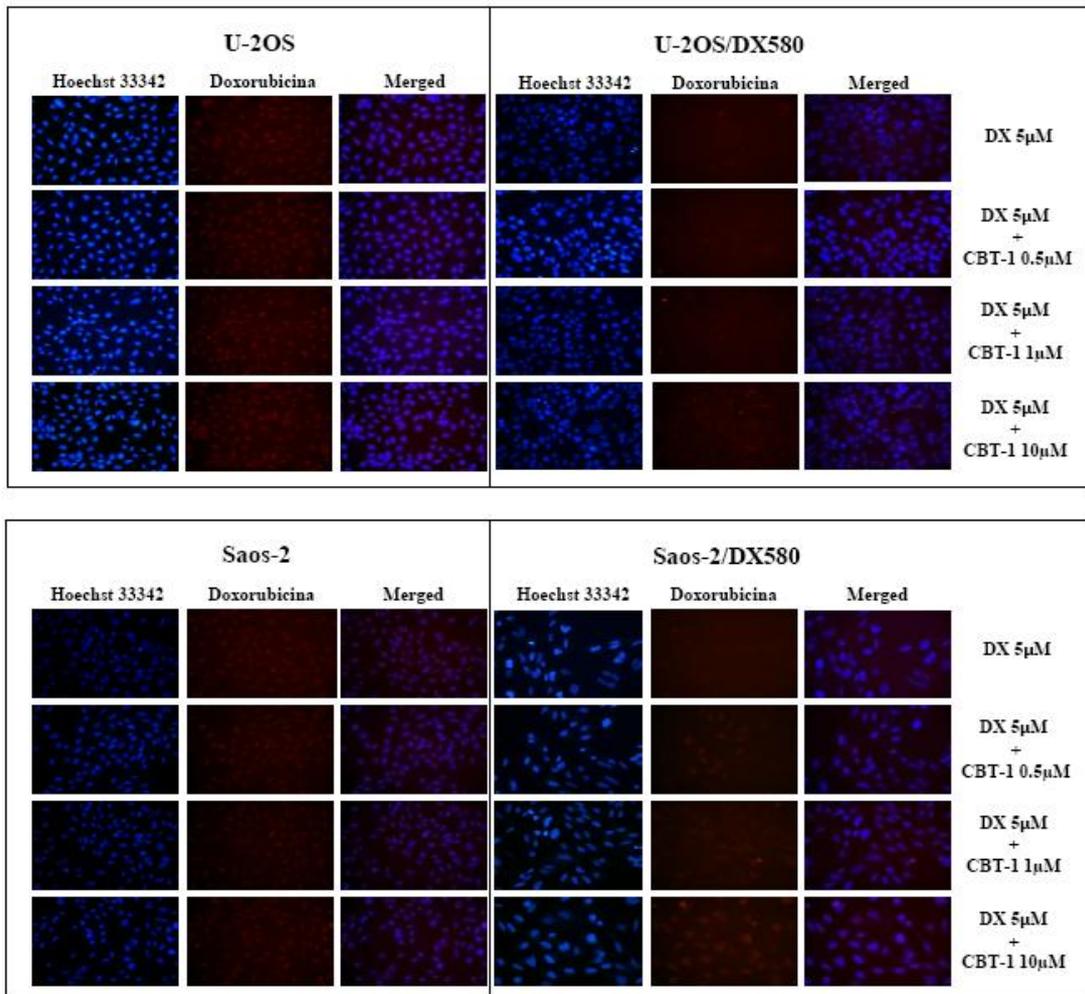


Figura 26. Incorporazione intracellulare di doxorubicina (DX), valutata in microscopia a fluorescenza, in assenza ed in presenza di tre diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 µM), nelle linee parentali U-2OS e Saos-2 e nelle rispettive varianti con il più alto livello di resistenza alla DX.

5.3.3 Effetto di CBT-1 sull'attività di ABCC1

Dal momento CBT-1 è in grado di legare ed inibire, oltre che ABCB1, anche il trasportatore ABCC1, sono stati compiuti ulteriori esperimenti per verificare se l'inibizione di questo secondo trasportatore potesse avere rilevanza per la reversione della farmacoresistenza nelle cellule di osteosarcoma. A tal fine, sono stati eseguiti esperimenti di valutazione in citofluorimetria dell'incorporazione e dell'efflusso della calceina AM (Ca AM), una molecola fluorescente che è substrato sia di ABCB1 che di ABCC1. Analogamente a quanto fatto per rodamina 123 e DX, gli esperimenti sono stati eseguiti sulle linee cellulari farmacosensibili U-2OS e Saos-2 e sulle loro varianti con il più alto livello di resistenza alla DX (U-2OS/DX580 e Saos-2/DX580) le quali, oltre a sovraesprimere ABCB1, presentano anche aumentati livelli di espressione di ABCC1.

Le analisi citofluorometriche hanno messo in evidenza che le linee farmacosensibili mostrano un'elevata incorporazione di Ca AM, che non aumenta ulteriormente in presenza di CBT-1 (**Figura 27** e **Tabella 8**). Le varianti farmacoresistenti presentano invece un'incorporazione basale di Ca AM molto bassa, ma che aumenta progressivamente, fino a raggiungere i livelli di incorporazione delle linee parentali, in seguito a trattamento con dosi crescenti di CBT-1 (**Figura 27** e **Tabella 8**). Esperimenti di valutazione dell'entità dell'incorporazione intracellulare di Ca AM in seguito ad inibizione del suo efflusso extracellulare hanno dimostrato che, mentre il trattamento con CBT-1 non causa significative variazioni nelle linee parentali, nelle varianti farmacoresistenti il revertante alla dose 10 μ M determina un mantenimento del livello intracellulare di Ca AM simile a quello delle linee parentali, in seguito ad una inibizione dell'efflusso extracellulare ABCB1/ABCC1-dipendente (**Figura 28**).

Dal momento che la Ca AM è una molecola fluorescente che emette nel verde e che si localizza sia nel nucleo che nel citoplasma, è stato possibile validare i dati citofluorimetrici anche con tecniche di microscopia in fluorescenza (analogamente a quanto fatto per rodamina 123 e DX). L'analisi microscopica ha confermato che le linee farmacosensibili incorporano elevate quantità di Ca AM e che il loro livello di incorporazione non varia in presenza di CBT-1 (**Figura 29**). Le varianti farmacoresistenti invece presentano un'evidente incorporazione cellulare di Ca AM solo in seguito a trattamento con CBT-1 (**Figura 29**).

Analizzando nel complesso questi risultati, si può concludere che CBT-1 risulta efficace nell'aumentare l'incorporazione anche di substrati di ABCC1, e non solo di ABCB1, in

cellule di osteosarcoma sovraesprimenti entrambi questi trasportatori. Tuttavia, i risultati fin qui ottenuti non permettono di discriminare quanto questo effetto sia dovuto all'inibizione di uno o dell'altro trasportatore, onde per cui sono stati pianificati esperimenti di silenziamento genico del trasportatore ABCB1.

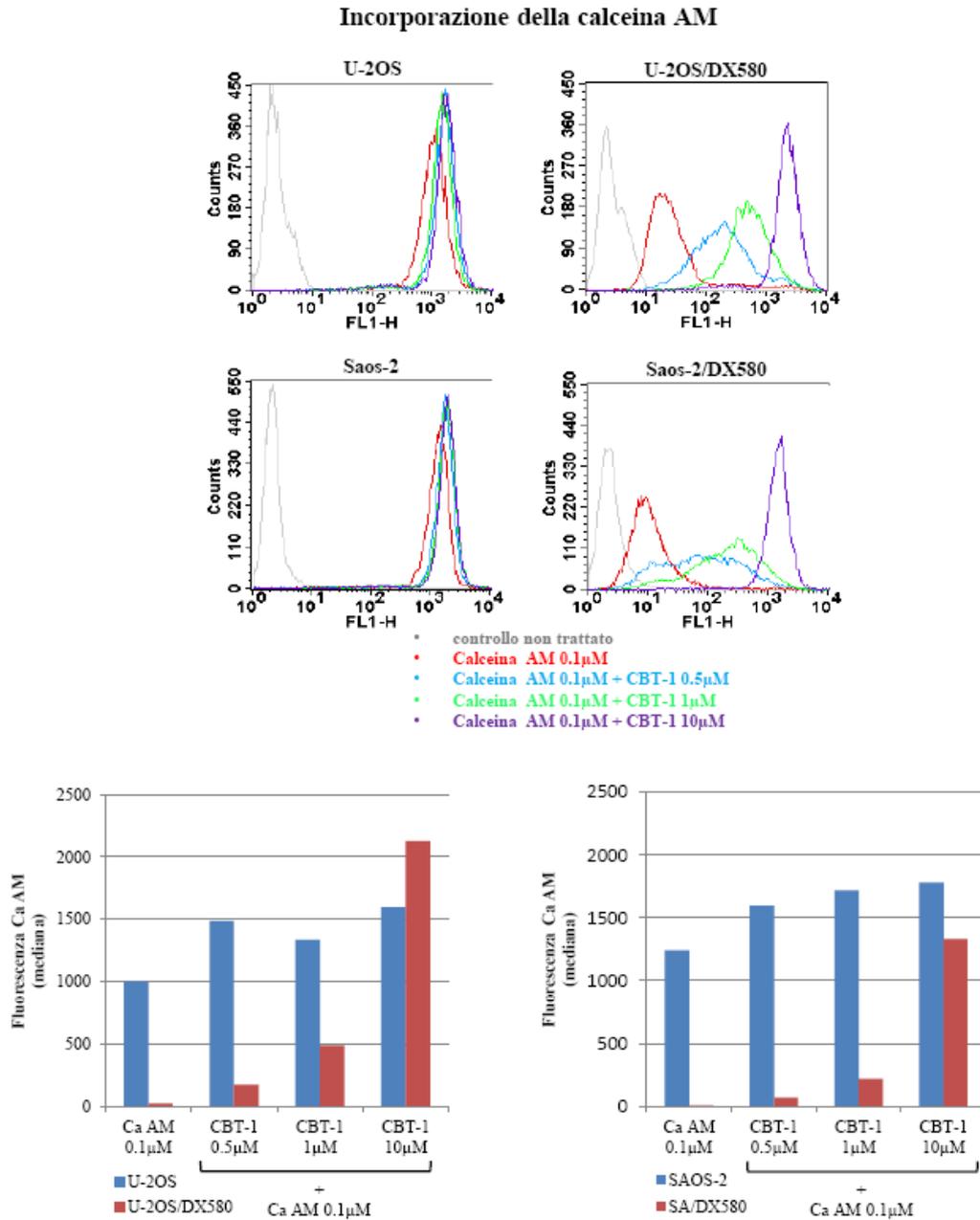


Figura 27. Incorporazione intracellulare di calceina AM (Ca AM), substrato fluorescente dei trasportatori ABCB1 e ABCC1, valutata in citofluorimetria, in assenza ed in presenza di tre diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 μM), nelle linee parentali U-2OS e Saos-2 e sulle loro varianti con il più alto livello di resistenza alla DX.

| Indice di aumento dell'incorporazione intracellulare di calceina AM (Ca AM+CBT1/Ca AM) | | | | |
|---|-------|-------------|--------|--------------|
| campioni | U-2OS | U-2OS/DX580 | Saos-2 | Saos-2/DX580 |
| Ca AM 0.1µM + CBT-1 0.5µM | 1,5 | 7,8 | 1,3 | 7,5 |
| Ca AM 0.1µM + CBT-1 1µM | 1,3 | 22,1 | 1,4 | 22,9 |
| Ca AM 0.1µM + CBT-1 10µM | 1,6 | 96,5 | 1,4 | 138,2 |

Tabella 8. Indice di aumento dell'incorporazione intracellulare di calceina AM (Ca AM), substrato fluorescente dei trasportatori ABCB1 e ABCC1, valutata in citofluorimetria, che è dato dal rapporto del valore della fluorescenza emessa dalle cellule incubate con la calceina AM e tre diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 µM), con la fluorescenza emessa dalle cellule incubate con la sola calceina AM. Nella tabella sono riportati i valori relativi alle linee parentali U-2OS e Saos-2 e alle loro rispettive varianti con il più alto livello di resistenza alla DX.

Saggio di efflusso della calceina AM

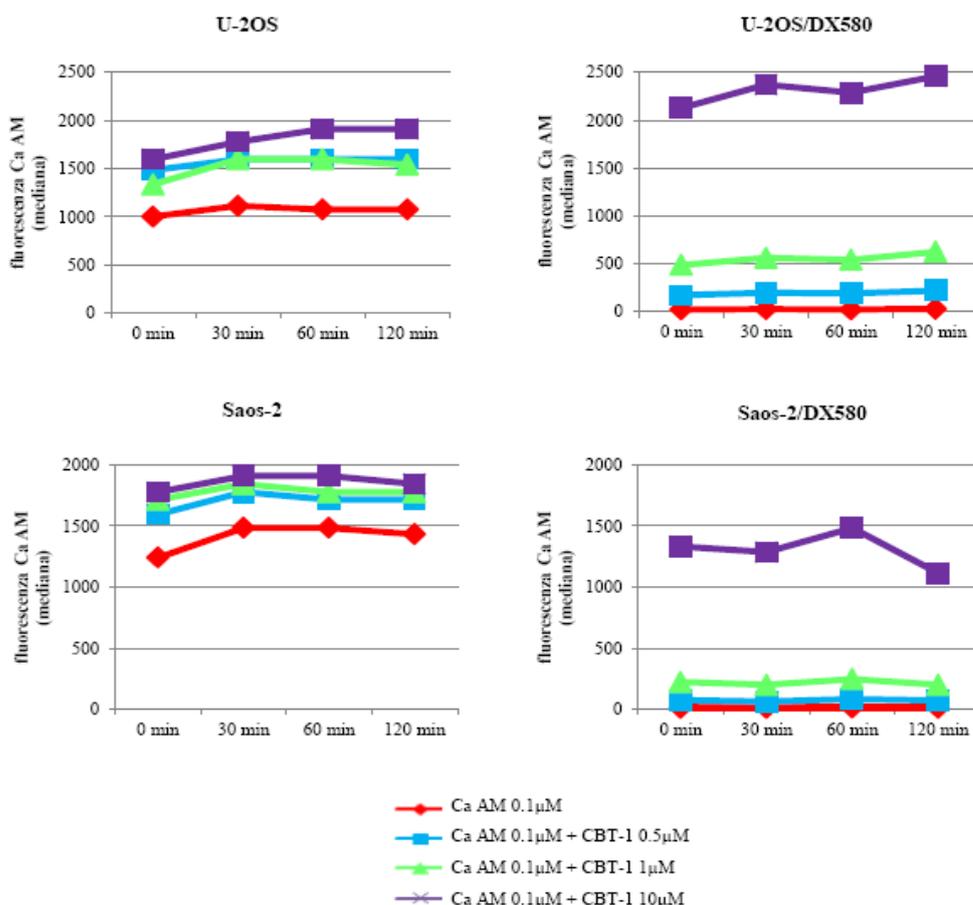


Figura 28. Efflusso extracellulare di calceina AM (Ca AM), substrato fluorescente dei trasportatori ABCB1 e ABCC1, valutato in citofluorimetria, in assenza ed in presenza di tre diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 µM), nelle linee parentali U-2OS e Saos-2 e sulle loro varianti con il più alto livello di resistenza alla DX.

Incorporazione della calceina AM

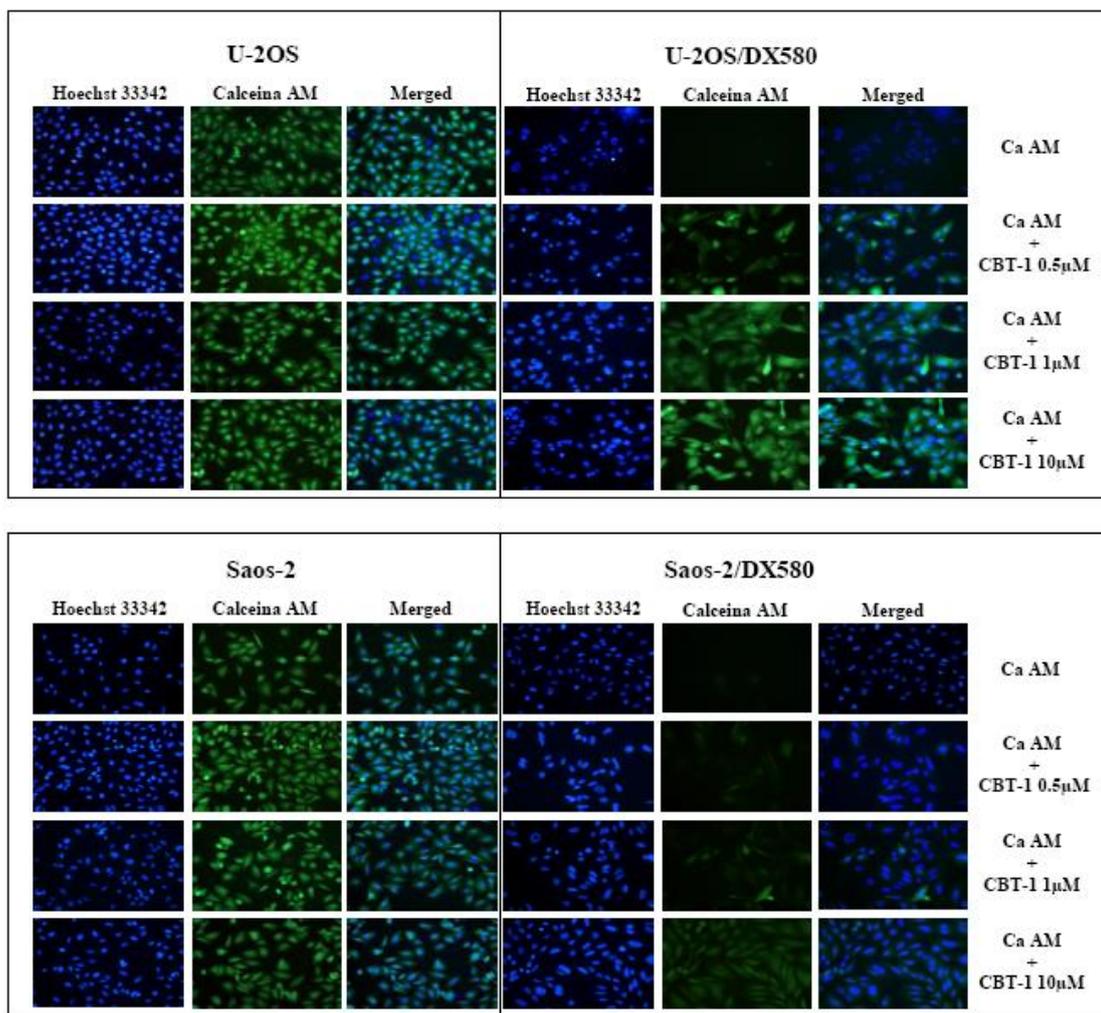


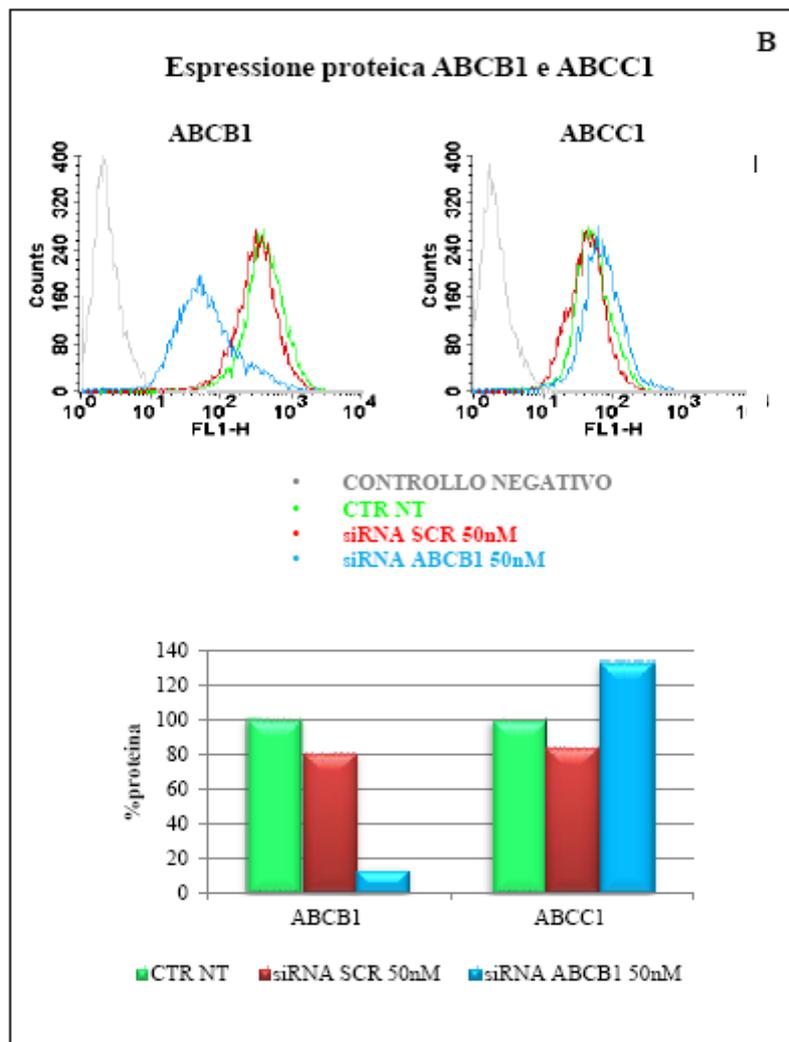
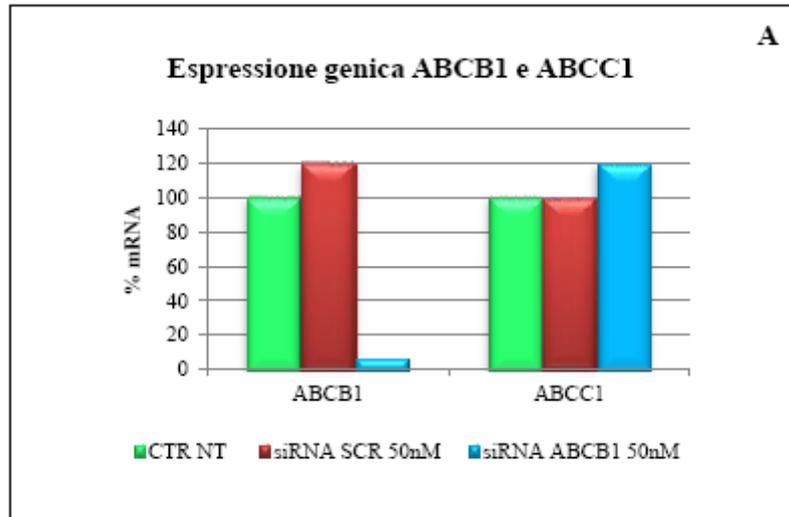
Figura 29. Incorporazione intracellulare di calceina AM (Ca AM), substrato fluorescente dei trasportatori ABCB1 e ABCC1, valutata in microscopia a fluorescenza, in assenza ed in presenza di tre diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 µM), nelle linee parentali U-2OS e Saos-2 e sulle loro varianti con il più alto livello di resistenza alla DX.

5.4.1 Silenziamento genico di ABCB1 e incorporazione intracellulare ed efflusso extracellulare di Calceina AM

Il silenziamento del gene *ABCB1* ha prodotto un rilevante abbattimento dei livelli di RNA messaggero (mRNA) e di proteina, che si mantiene fino a 96 ore dopo la trasfezione e non causa variazioni del livello di mRNA e di proteina ABCC1 (**Figura 30A-B**).

Le cellule con *ABCB1* non silenziato incorporano la Ca AM solo se trattate con CBT-1, a differenza delle cellule con *ABCB1* silenziato che mostrano un netto aumento di concentrazione intracellulare di Ca AM anche in assenza di trattamento con CBT-1 (**Figura 31 e Tabella 9**). Il trattamento con CBT-1 causa un rilevante aumento dell'incorporazione intracellulare di Ca AM nelle cellule farmaco-resistenti con *ABCB1* silenziato, che rimane comunque di entità inferiore a quanto osservabile nelle stesse cellule con *ABCB1* non silenziato (**Figura 31 e Tabella 9**). I dati ottenuti da successivi esperimenti di efflusso extracellulare della Ca AM mettono in evidenza che CBT-1 è in grado di mantenere un elevato livello di incorporazione cellulare di Ca AM sia nelle cellule farmaco-resistenti non-silenziate per *ABCB1* sia nelle cellule in cui questo gene è silenziato (**Figura 32**). Questi risultati, ed in particolar modo il fatto che il trattamento con CBT-1 sia risultato essenziale nel mantenere alti livelli di Ca AM anche in cellule con *ABCB1* silenziato, indicano che CBT-1 esercita la propria azione revertante attraverso l'inibizione dell'efflusso cellulare mediato sia da *ABCB1* che *ABCC1*.

Questa conclusione è stata avvalorata anche dai dati ottenuti da esperimenti di incorporazione valutati in microscopia a fluorescenza, dai quali è emerso che il silenziamento genico di *ABCB1* permette l'incorporazione di Ca AM (**Figura 33 B**), non presente nelle cellule con *ABCB1* non silenziato (**Figura 33A**). Nelle cellule con *ABCB1* silenziato però il trattamento con CBT-1 è in grado di aumentare l'entità dell'incorporazione intracellulare di Ca AM, confermando la capacità di questo revertante di inibire anche *ABCC1* (**Figura 33C-E**).



CTR NT = controllo non trattato

Figura 30. Valutazione dell'espressione genica (A) e dell'espressione proteica (B) dei trasportatori ABCB1 e ABCC1 in seguito a silenziamento genico di *ABCB1* rispettivamente tramite *real-time PCR* ed immunofluorescenza su cellule fissate.

Incorporazione della calceina AM

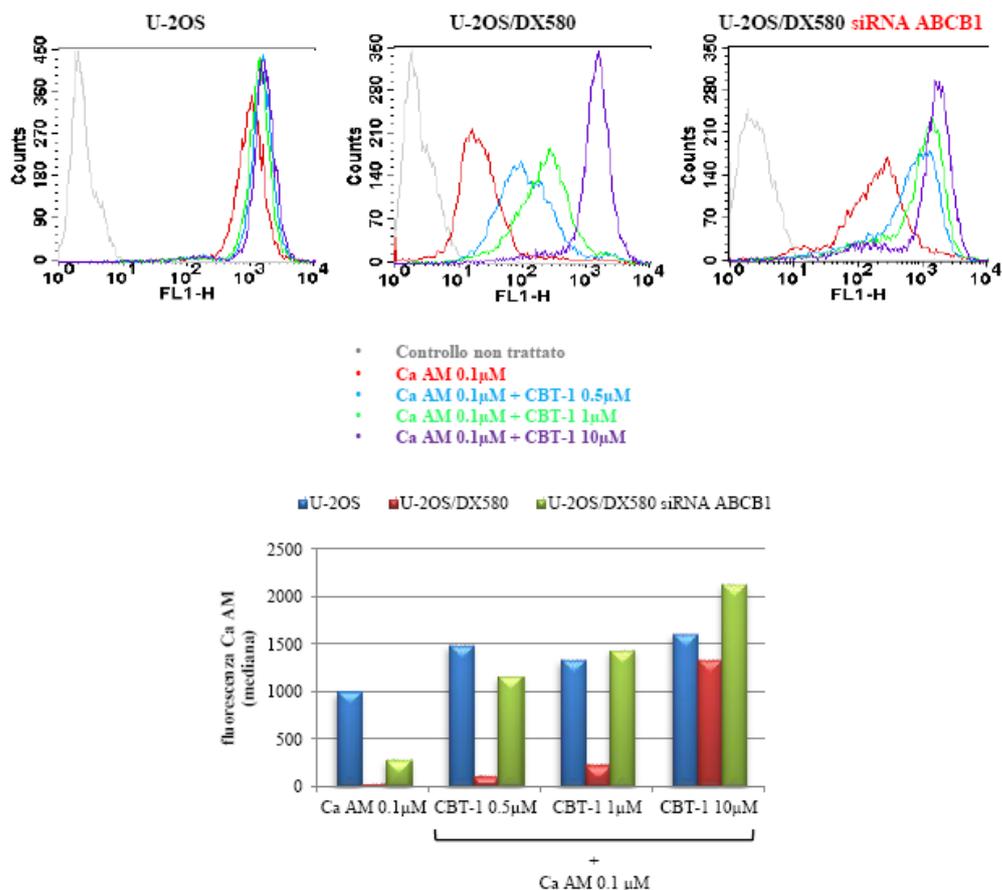


Figura 31. Incorporazione intracellulare di calceina AM (Ca AM), valutata in citofluorimetria, in assenza ed in presenza di tre diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 μM), nella linea parentale U-2OS e nella sua variante cellulare U-2OS/DX580 con ABCB1 non silenziato e con ABCB1 silenziato (siRNA ABCB1).

| Indice di aumento dell'incorporazione intracellulare della calceina AM (Ca AM+CBT1/Ca AM) | | | |
|--|-------|-------------|----------------------------|
| campioni | U-2OS | U-2OS/DX580 | U-2OS/DX580 siRNA ABCB1 |
| Ca AM 0.1 μM+CBT-1 0.5 μM | 1,5 | 7,8 | 4,2 |
| Ca AM 0.1 μM+CBT-1 1 μM | 21,3 | 22,1 | 5,2 |
| Ca AM 0.1 μM+CBT-1 10 μM | 1,6 | 96,5 | 7,8 |

Tabella 9. Indice di aumento dell'incorporazione intracellulare di calceina AM (Ca AM), valutata in citofluorimetria, che è dato dal rapporto del valore della fluorescenza emessa dalle cellule incubate con la calceina AM e 3 diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 μM), con la fluorescenza emessa dalle cellule incubate con la sola calceina AM.

Saggio di efflusso della calceina AM

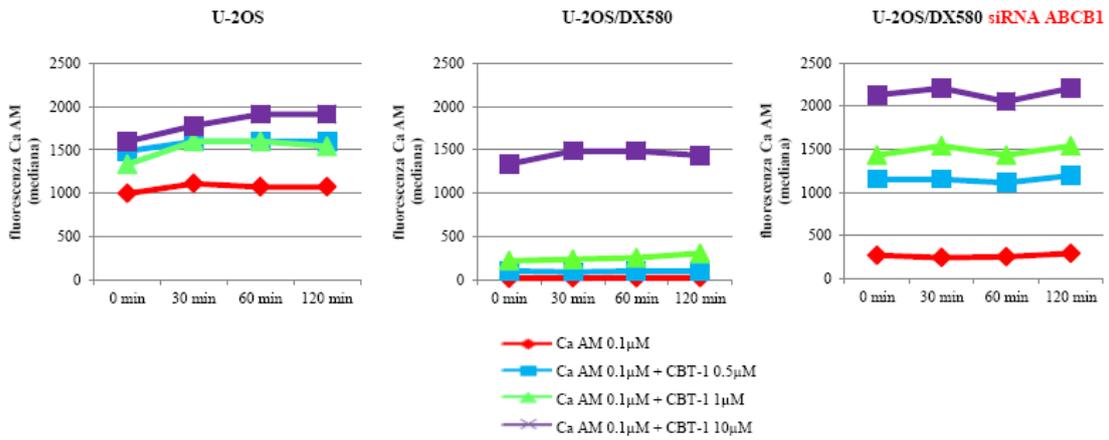


Figura 32. Efflusso extracellulare di calceina AM (Ca AM), valutato in citofluorimetria, in assenza ed in presenza di tre diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 μM), nella linea parentale U-2OS e nella sua variante cellulare U-2OS/DX580 con ABCB1 non silenziato e con ABCB1 silenziato (siRNA ABCB1).

Incorporazione della calceina AM

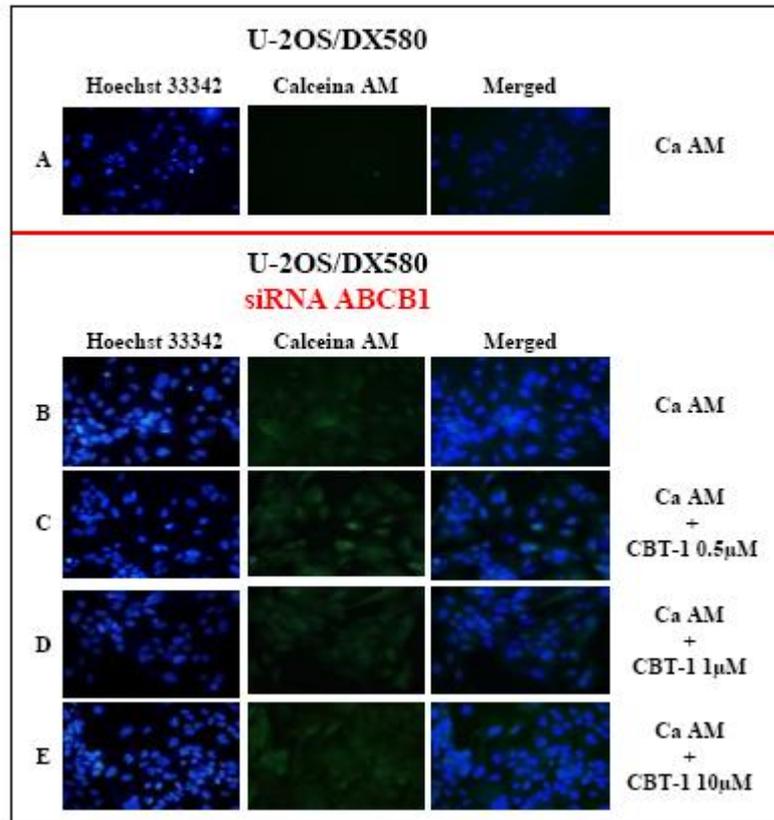


Figura 33. Incorporazione intracellulare di calceina AM (Ca AM), valutata in microscopia a fluorescenza, (A) in assenza di CBT-1 nella linea cellulare U-2OS/DX580 con ABCB1 non silenziato; (B-E) con o senza CBT-1 (0.5-1.0-10 μM) nella linea cellulare U-2OS/DX580 con ABCB1 silenziato (siRNA ABCB1).

5.4.2 Silenziamento genico di ABCB1 e incorporazione intracellulare ed efflusso extracellulare di doxorubicina

Analogamente a quanto fatto utilizzando la calceina AM, è stata verificato l'impatto relativo di ABCB1 e ABCC1 nel trasporto della DX.

Le analisi citofluorimetriche hanno messo in evidenza che le cellule con *ABCB1* non silenziato presentano un'incorporazione basale di DX molto più bassa rispetto alle cellule con *ABCB1* silenziato, ma che aumenta in seguito a trattamento con CBT-1 (**Figura 34 e Tabella 10**). Al contrario, le cellule con *ABCB1* silenziato mostrano un'elevata incorporazione basale di DX, che però non aumenta ulteriormente in presenza di CBT-1 (**Figura 34 e Tabella 10**). Questi dati confermano la capacità di CBT-1 di revertire la resistenza alla DX attraverso l'inibizione di ABCB1 ed escludono l'ipotesi di uno specifico coinvolgimento di ABCC1 nell'insorgenza della resistenza contro la DX nelle linee di osteosarcoma considerate.

Incorporazione della doxorubicina

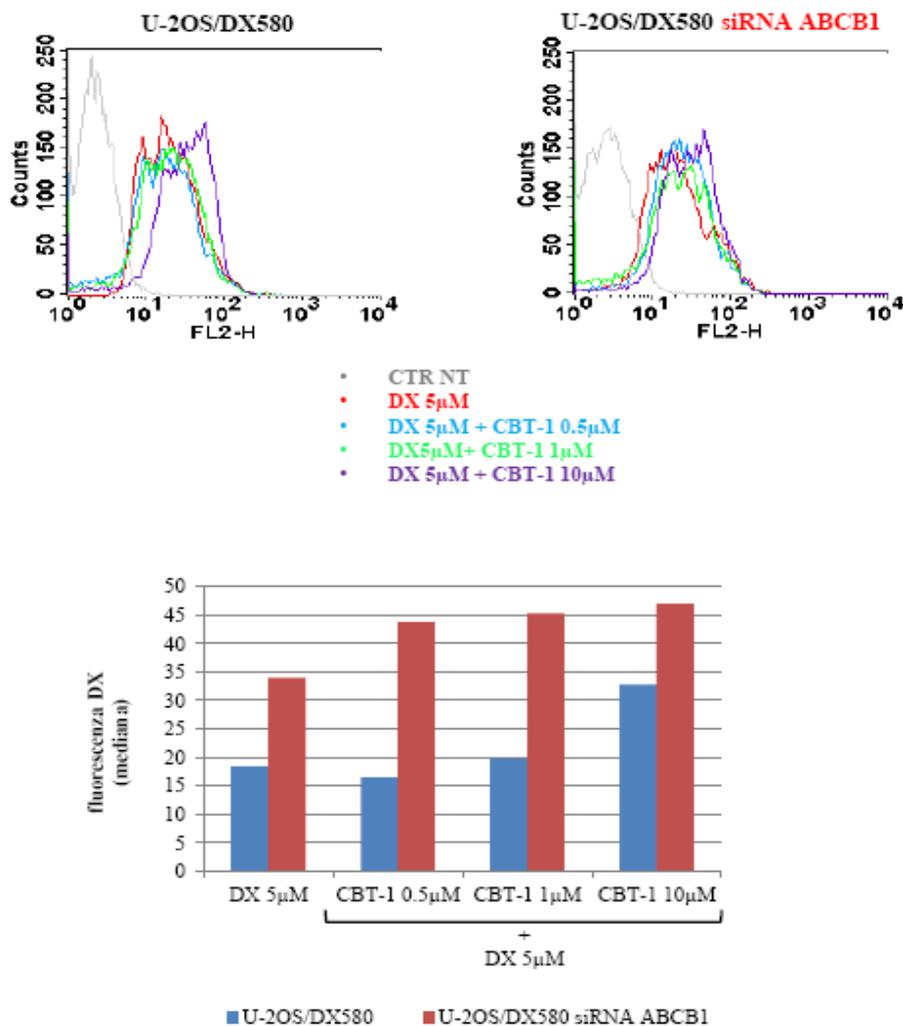


Figura 34. Incorporazione intracellulare di doxorubicina (DX), valutata in citofluorimetria, in assenza ed in presenza di tre diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 µM), nella linea cellulare U-2OS/DX580 con ABCB1 non silenziato e con ABCB1 silenziato (siRNA ABCB1).

| Indice di aumento dell'incorporazione intracellulare di doxorubicina (DX 5µM+CBT1/DX 5µM) | | |
|---|----------------|-------------|
| Campioni | no siRNA ABCB1 | siRNA ABCB1 |
| DX 5µM + CBT-1 0.5µM | 0,9 | 1,3 |
| DX 5µM + CBT-1 1µM | 1,1 | 1,3 |
| DX 5µM + CBT-1 10µM | 1,8 | 1,4 |

Tabella 10. Indice di aumento dell'incorporazione intracellulare di doxorubicina (DX), valutata in citofluorimetria, che è dato dal rapporto del valore della fluorescenza emessa dalle cellule incubate con la DX e tre diverse dosi di CBT-1 (0.5-1.0-10 µM), con la fluorescenza emessa dalle cellule incubate con la sola DX. Nella tabella sono riportati i valori relativi alla linea cellulare U-2OS/DX580 con ABCB1 non silenziato e con ABCB1 silenziato (siRNA ABCB1).

5.5 Reversione in vitro della resistenza alla doxorubicina

Per quantificare l'effettiva reversione della resistenza alla DX, le linee cellulari farmacosensibili U-2OS e Saos-2 e le loro varianti DX-resistenti sono state trattate con una dose equimolare di CBT-1 (0.5 μM) assieme a concentrazioni progressivamente crescenti del chemioterapico. Tali studi hanno evidenziato la capacità di CBT-1 di risensibilizzare le cellule farmaco-resistenti alla DX. L'entità del grado di chemiosensibilizzazione causata dal revertante, espressa in termini numerici dal *dose modifying factor* (DMF), risulta essere inversamente proporzionale al livello di espressione di ABCB1 confermando il suo specifico ruolo nella resistenza alla DX nelle cellule di osteosarcoma (**Tabella 11**).

| Azione revertante di CBT-1 (96 ore dopo il trattamento) | | | | |
|---|-------------------------|---|--------------------|---|
| Linea cellulare | IC ₅₀ DX (A) | IC ₅₀ DX + CBT-1 0.5 μM (B) | DMF (rapporto A/B) | RR (IC ₅₀ DX linea resistente/IC ₅₀ DX linea sensibile) |
| U-2OS | 0.009 μM | 0.003 μM | 3 | |
| U-2OS/DX30 | 3.4 μM | 0.04 μM | 85 | 378 |
| U-2OS /DX100 | 2.1 μM | 0.04 μM | 53 | 233 |
| U-2OS /DX580 | 14.7 μM | 0.70 μM | 21 | 1633 |
| Saos-2 | 0.01 μM | 0.01 μM | 1 | |
| Saos-2/DX30 | 1.5 μM | 0.1 μM | 15 | 150 |
| Saos-2/DX100 | 3.1 μM | 0.30 μM | 10 | 310 |
| Saos-2/DX580 | 8.2 μM | 0.50 μM | 16 | 820 |

Tabella 11. Valutazione della capacità di CBT-1 di revertire la resistenza nelle linee cellulari U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti selezionate con diversi livelli di resistenza alla doxorubicina (DX30-100-580), associati a diversi livelli di espressione di ABCB1. Nella tabella è riportato il *dose modifying factor* (DMF) e la resistenza relativa (RR). Il DMF indica il numero di volte in cui si riduce il valore di IC₅₀ della DX utilizzata in associazione a CBT-1 rispetto al trattamento con il solo chemioterapico. Mentre la resistenza relativa (RR) indica il numero di volte in cui aumenta il valore di IC₅₀ della linea farmaco-resistente rispetto alla linea parentale.

5.6 Valutazione del coinvolgimento di ABCC1 nell'insorgenza della resistenza al cisplatino e al methotrexate

Dal momento che ABCC1 è il trasportatore più espresso nelle varianti cellulari farmaco-resistenti al MTX e può trasportare questo farmaco al di fuori della cellula, sono stati condotti degli esperimenti di reversione, analogamente a quanto fatto nelle varianti resistenti alla DX, sulle linee farmacosensibili U-2OS e Saos-2 e sulle loro varianti resistenti al MTX. Il trattamento con CBT-1 ha portato ad un lieve aumento di sensibilità al MTX nelle linee resistenti, indicando un possibile, anche se limitato, coinvolgimento di ABCC1 nella resistenza al MTX (**Tabella 12**). Gli stessi esperimenti sono stati condotti nelle varianti cellulari farmaco-resistenti al CDDP, in tali linee

cellulari il trattamento con CBT-1 non sensibilizza le cellule farmacoresistenti al trattamento con il CDDP, in quanto né ABCB1 né ABCC1 sono in grado di trasportare tale chemioterapico (**Tabella 12**).

| Linea cellulare | IC ₅₀ MTX (A) | IC ₅₀ MTX + CBT-1 0.5 μM (B) | DMF (= rapporto A/B) | RR (= IC ₅₀ MTX linea resistente/ IC ₅₀ MTX linea sensibile) |
|------------------|---------------------------|--|----------------------|--|
| U-2OS | 0.01 μM | 0.01 μM | 1 | |
| U-2OS /MTX300 | 0.25 μM | 0.09 μM | 3 | 25 |
| Saos-2 | 0.02 μM | 0.02 μM | 1 | |
| Saos-2/MTX300 | 3.40 μM | 1.66 μM | 2 | 102 |
| Linea cellulare | IC ₅₀ CDDP (A) | IC ₅₀ CDDP + CBT-1 0.5 μM (B) | DMF (= rapporto A/B) | RR (= IC ₅₀ CDDP linea resistente/ IC ₅₀ CDDP linea sensibile) |
| U-2OS | 2.5 μM | 2.4 μM | 1 | |
| U-2OS/ CDDP4μg | 26.9 μM | 19.9 μM | 1 | 11 |
| Saos-2 | 1.09 μM | 0.9 μM | 1 | |
| Saos-2 / CDDP6μg | 30.8 μM | 22.3 μM | 1 | 28 |

Tabella 12. Valutazione della capacità di CBT-1 di revertire la resistenza nelle linee cellulari U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti resistenti al MTX e al CDDP. Nella tabella è riportato il *dose modifying factor* (DMF) e la resistenza relativa (RR). Il DMF indica il numero di volte in cui si riduce il valore di IC₅₀ del chemioterapico utilizzato in associazione a CBT-1 rispetto al trattamento con il solo chemioterapico. Mentre la resistenza relativa (RR) indica il numero di volte in cui aumenta il valore di IC₅₀ della linea farmacoresistente rispetto alla linea parentale.

Capitolo VI

Discussione

L'osteosarcoma è una neoplasia estremamente rara, nonostante sia il più frequente tumore maligno dell'osso e rappresenti il 20% di tutti i sarcomi primitivi dello scheletro. Negli ultimi 20 anni, lo schema di trattamento dell'osteosarcoma ad alto grado di malignità, che prevede l'impiego di regimi di polichemioterapia pre- e post-operatoria associata all'asportazione chirurgica del tumore, ha progressivamente e significativamente innalzato la percentuale di sopravvivenza a lungo termine di questo tumore, fino a raggiungere l'attuale 60-65% dei casi (Ferrari & Palmerini 2007; Hattinger et al, 2010). Tuttavia, nonostante questo significativo miglioramento della prognosi, permane un rilevante numero di pazienti (30-35%) che non risponde al trattamento farmacologico e va incontro ad un decorso clinico sfavorevole, con esito fatale entro 2-3 anni dall'esordio (Bramwell et al, 2000; Chou & Gorlick 2006; Ferrari & Palmerini 2007; Hattinger et al, 2010).

L'insorgenza di farmacoresistenza costituisce al momento la principale causa di mancata risposta al trattamento chemioterapico nell'osteosarcoma (Bramwell et al, 2000; Serra et al, 2003; Chou & Gorlick 2006). Al fine di migliorare ulteriormente la prognosi di questa neoplasia, risulta quindi fondamentale giungere ad una migliore caratterizzazione delle basi biologiche e biomolecolari responsabili o associate allo sviluppo di farmacoresistenza in questo tumore, in modo da poter identificare fattori prognostici e potenziali bersagli terapeutici utilizzabili per la pianificazione di nuove possibili strategie di trattamento. Sebbene negli ultimi 20 anni siano stati effettuati molti studi con questa finalità, non sono ancora stati identificati con chiarezza i determinanti molecolari che causano un'assente o ridotta risposta ai trattamenti farmacologici nell'osteosarcoma.

Le cellule tumorali spesso sviluppano resistenza simultanea a molti farmaci, anche strutturalmente e funzionalmente molto differenti (*multidrug resistance*, MDR). Una delle cause principali che portano all'insorgenza della farmacoresistenza cellulare è la sovraespressione di diversi trasportatori ABC che, causando un aumento dell'efflusso extracellulare di numerosi chemioterapici, sono responsabili della ridotta risposta al trattamento farmacologico in diversi tumori umani (Dean et al, 2001; Gillet et al, 2007; Gatti et al, 2009). Attualmente, ad eccezione del trasportatore ABCB1, la cui elevata espressione in pazienti affetti da osteosarcoma al momento della diagnosi è stata più volte

dimostrata essere correlata con una prognosi avversa (Baldini et al, 1995; Serra et al, 2003,2006; Pako & Ioannidis 2003; Chou & Gorlick, 2006), i dati riguardanti l'impatto di altri trasportatori ABC in questo tumore sono molto scarsi o del tutto inesistenti.

Negli ultimi anni sono emerse diverse informazioni che potrebbero suggerire il coinvolgimento anche di altri trasportatori ABC, in aggiunta ad ABCB1, o di fattori ad essi indirettamente correlati nella ridotta risposta al trattamento di sottogruppi di pazienti affetti da osteosarcoma. In particolare, sono state recentemente prodotte indicazioni sulla possibile modulazione dell'espressione di diversi geni ABC da parte dell'oncogene *C-MYC* (Porro et al, 2010, 2011; Huynh et al, 2012), il cui valore prognostico riscontrato in casistiche cliniche di osteosarcoma potrebbe essere correlato a questo fenomeno (Scionti et al, 2008).

Per questo motivo, la prima fase dello studio oggetto di questa Tesi si è focalizzata sulla valutazione dell'espressione genica dell'oncogene *C-MYC* e di 16 trasportatori ABC, selezionati in quanto coinvolti nella farmacoresistenza in diverse patologie umane (Dean et al, 2001; Gillet et al, 2007; Gatti et al, 2009; Fletcher et al, 2010) e/o perchè notoriamente regolati da *C-MYC* (Porro et al, 2010, 2011; Huynh et al, 2012).

L'espressione di tutti questi geni è stata valutata su un'ampia serie di linee cellulari farmacosensibili e farmacoresistenti di osteosarcoma umano e su diverse serie di campioni clinici.

I risultati ottenuti sulle linee cellulari hanno dimostrato che le linee cellulari farmacoresistenti presentano una sovraespressione della maggior parte dei trasportatori ABC analizzati e di *C-MYC*, sia rispetto alla corrispondente linea parentale farmacosensibile che rispetto ad osteoblasti umani normali. Questi risultati suggeriscono che sia la sovraespressione di geni ABC che di *C-MYC* possano essere coinvolti nell'insorgenza di farmacoresistenza nelle cellule di osteosarcoma ed anche che l'aumentata espressione di *C-MYC* e dei geni ABC possano essere eventi tra loro correlati.

Per validare queste ipotesi e verificare se quanto osservato sulle linee cellulari si verificasse anche in campioni clinici di osteosarcoma, il livello di espressione di tali geni è stato valutato su una casistica di 34 campioni biotipici di pazienti affetti da osteosarcoma classico.

I risultati ottenuti in questa fase dello studio hanno confermato l'esistenza di una correlazione diretta tra l'elevata espressione di *C-MYC* e quella di numerosi geni ABC. Le analisi eseguite su questa casistica clinica hanno anche permesso di valutare, seppure con

alcune riserve dovute al numero non elevato di campioni, l'impatto prognostico dei vari trasportatori ABC inclusi nello studio e di *C-MYC*. I risultati ottenuti, oltre a permettere di confermare il valore prognostico avverso della sovraespressione al momento della diagnosi di *C-MYC* già osservato in studi precedenti (Scionti et al, 2008), hanno anche permesso di evidenziare il possibile impatto prognostico di trasportatori ABC mai prima riportati nell'osteosarcoma.

Al fine di verificare ulteriormente se questi trasportatori ABC e l'oncogene *C-MYC* potessero essere costitutivamente e simultaneamente sovraespressi in campioni clinici di osteosarcoma classico, è stata eseguita l'analisi del livello di espressione anche su una seconda e più ampia serie di 66 campioni biotici di osteosarcoma classico. Questa analisi ha confermato la presenza di elevati livelli di espressione di diversi trasportatori ABC e di *C-MYC* nelle cellule di osteosarcoma rispetto ad osteoblasti normali, seppure con una certa variabilità tra un campione e l'altro. Inoltre, i risultati in questo secondo gruppo di pazienti hanno confermato che la sovraespressione di diversi geni ABC e di *C-MYC* può essere simultaneamente già presente al momento della diagnosi. D'altra parte questi risultati confermano indirettamente anche le evidenze derivate da uno studio collaterale, condotto sempre nel laboratorio dove è stato svolto tale programma di ricerca, che indicano l'esistenza di una diretta modulazione dell'espressione di diversi trasportatori ABC da parte dell'oncogene *C-MYC*. Purtroppo in questa seconda serie di campioni clinici non è stato possibile analizzare le correlazioni con l'andamento clinico del livello di espressione dei geni considerati a causa dell'eterogeneità del trattamento al quale sono stati sottoposti i pazienti inclusi in questa casistica.

Amesso che l'impatto prognostico di *C-MYC* descritto in precedenza (Scionti et al, 2008) possa esplicarsi attraverso la modulazione dell'espressione di geni ABC, restava però da chiarire quali trasportatori ABC fossero più rilevanti per lo sviluppo di farmacoresistenza, la risposta al trattamento e, conseguentemente, per la prognosi dei pazienti con osteosarcoma. E' stata quindi programmata una fase successiva dello studio volta a studiare più in dettaglio i trasportatori ABC emersi più rilevanti per i fattori sopra elencati in base ai risultati ottenuti fino a questo punto. In base all'analisi cumulativa dei dati ottenuti sulle linee cellulari ed i campioni clinici sono stati selezionati 9 trasportatori ABC (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5*, *ABCC6*, *ABCC10*, e *ABCG2*) che sono stati oggetto di analisi più approfondite, prendendo in considerazione anche il loro livello di espressione proteica in relazione allo sviluppo di farmacoresistenza.

I risultati ottenuti, considerati assieme a quelli di espressione genica delle fasi precedenti di questo studio, hanno permesso di indicare in ABCB1 e ABCC1 i due trasportatori ABC maggiormente implicati nello sviluppo di farmacoresistenza nell'osteosarcoma. Mentre questa evidenza è già stata descritta in precedenza per ABCB1 (Baldini et al, 1995; Serra et al, 2003,2006; Pako & Ioannidis, 2003; Chou & Gorlick, 2006), il possibile coinvolgimento di ABCC1 risulta essere una nuova indicazione emersa da questo studio.

L'ultima fase di questo programma di ricerca si è quindi focalizzata sulla sola analisi dei due trasportatori al fine di studiare possibili strategie da prendere in considerazione per un'eventuale reversione della farmacoresistenza da essi generata nelle cellule di osteosarcoma. In particolare, è stato studiato CBT-1, un revertante di IV generazione in grado di inibire sia ABCB1 che ABCC1, già in corso di sperimentazione clinica in altri tumori (Robey et al, 2008; Kelly et al, 2012). CBT-1 è una sostanza organica (bis-benzilisoquinolina) derivata da alcaloidi vegetali in grado di aumentare la concentrazione intracellulare dei chemioterapici in linee cellulari sovraesprimenti ABCB1 e/o ABCC1, ripristinando uno stato di farmacosensibilità in cellule farmacoresistenti (Robey et al, 2008). Come menzionato sopra, CBT-1 è stato finora utilizzato in 8 diversi studi clinici di fase I e II, nei quali sono stati arruolati pazienti affetti da diversi tumori (ma non osteosarcomi), non responsivi ai regimi di chemioterapia normalmente utilizzati. Tali studi hanno evidenziato la capacità di CBT-1 di ridurre i fenomeni di MDR e di rendere i pazienti più responsivi al trattamento chemioterapico (Kelly et al, 2012). Questi risultati hanno quindi indicato in questo inibitore un nuovo revertante di potenziale interesse clinico, da considerare come possibile adiuvante da affiancare ai regimi chemioterapici convenzionali nei pazienti in cui la ridotta risposta clinica al trattamento sia da imputare alla sovraespressione di ABCB1 e/o ABCC1.

A fronte di queste evidenze, è stata valutata l'efficacia *in vitro* di CBT-1 come revertante della farmacoresistenza mediata da ABCB1 e/o ABCC1 nelle linee cellulari di osteosarcoma utilizzate in questo studio. I risultati ottenuti attraverso esperimenti di incorporazione intracellulare e di efflusso della rodamina 123, substrato fluorescente di ABCB1, hanno confermato la capacità di CBT-1 di legare e di inibire questo trasportatore con conseguente reversione dei livelli di farmacoresistenza.

La capacità di CBT-1 di inibire anche la funzionalità di ABCC1 è stata verificata attraverso esperimenti di incorporazione intracellulare e di efflusso della calceina AM, molecola fluorescente che è substrato sia di ABCB1 che di ABCC1. I dati ottenuti hanno confermato

la capacità di CBT-1 di legare ed inibire anche il trasportatore ABCC1, rendendolo oltremodo interessante in vista di un possibile, futuro impiego clinico nell'osteosarcoma.

Ulteriori analisi dell'efficacia di CBT-1 su cellule nelle quali era stato silenziato il gene *ABCB1* hanno poi permesso di evidenziare e confermare come *ABCB1* sia il principale trasportatore coinvolto nell'insorgenza di farmacoresistenza (ed in particolare di resistenza alla DX), nelle cellule di osteosarcoma, mentre *ABCC1* sembra svolgere un ruolo molto meno rilevante a questo riguardo. Questa evidenza è stata confermata anche dai risultati ottenuti dall'analisi immunohistochimica di *ABCC1* che, a differenza di *ABCB1*, non è risultato avere un significativo impatto prognostico. E' tuttavia da tenere in considerazione che i risultati prodotti in questo studio hanno dimostrato che *ABCC1*, oltre ad essere il secondo trasportatore, dopo *ABCB1*, con il più alto livello di espressione nelle varianti farmacoresistenti, è anche risultato essere il trasportatore ABC più espresso negli osteoblasti umani normali e nelle linee farmacosensibili di osteosarcoma. Sulla base di queste evidenze, è possibile ipotizzare che, nelle cellule di osteosarcoma, *ABCC1* possa svolgere un importante ruolo fisiologico di protezione da tossine di varia origine. *ABCC1* è infatti un trasportatore di composti tossici allo stato nativo o dopo coniugazione con il glutatione (GSH), molecola con funzione antiossidante che può coniugarsi mediante l'azione dell'enzima glutatione S-transferasi (GST) con varie sostanze tossiche inattivandole e permettendone l'eliminazione dal compartimento intracellulare. Questo potrebbe giustificare l'elevato livello di espressione di questo trasportatore nelle cellule osteosarcomatose e nei pazienti con osteosarcoma (elevati livelli di proteina *ABCC1* sono infatti stati riscontrati nel 74% dei pazienti nella casistica esaminata nello studio in immunohistochimica). Essendo la sovraespressione di *ABCC1* probabilmente più un fattore costitutivo che un fattore legato strettamente allo sviluppo di farmacoresistenza, non risulta quindi sorprendente il fatto che non sia risultato essere significativamente correlato con la prognosi. Essendo però *ABCC1* coinvolto nel trasporto di diversi farmaci utilizzati nella terapia dell'osteosarcoma (DX e MTX, primi fra tutti), la sua frequente sovraespressione potrebbe comunque predisporre le cellule osteosarcomatose ad una minore risposta ai chemioterapici. Quindi, la possibilità di inibire la funzionalità anche di questo trasportatore, oltre che quella di *ABCB1*, potrebbe tradursi in un effetto sicuramente benefico in termini di maggiore risposta al trattamento da parte dei pazienti con osteosarcoma.

In conclusione, questo studio ha confermato ABCB1 come il trasportatore ABC più rilevante per l'osteosarcoma, in accordo con le evidenze già riportate in precedenza (Baldini et al, 1995; Serra et al, 2003,2006; Pako & Ioannidis, 2003; Chou & Gorlick, 2006), mentre il ruolo di altri trasportatori ABC, con la sola probabile eccezione di ABCC1, sembra essere del tutto marginale.

Nonostante questo al momento ABCB1 viene utilizzato solo come marcatore biologico per la stratificazione dei pazienti in categorie con diverso rischio di ricaduta e prognosi avversa, e non come bersaglio terapeutico. Infatti, nel protocollo ISG/OS-2, attivato a Luglio 2011 (<http://ClinicalTrials.gov/show/NCT01459484>), i pazienti con osteosarcoma vengono stratificati in base al livello di espressione di ABCB1 al momento della diagnosi ed indirizzati verso schemi terapeutici diversificati, che prevedono un'intensificazione del trattamento con i chemioterapici convenzionali e l'aggiunta di un immunomodulatore (*Mepact, Takeda*) solamente nei pazienti sovraespressanti ABCB1. La possibilità di utilizzare un inibitore di ABCB1 e ABCC1, come è risultato essere CBT-1, assieme ai chemioterapici convenzionali potrebbe permettere la pianificazione di nuove promettenti strategie terapeutiche atte al superamento della farmacoresistenza nei pazienti con osteosarcoma, che potrebbero portare ad una svolta decisiva nella possibilità di cura di questo tumore altamente maligno.

Bibliografia

1. Adhikary S, Eilers M. *Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Aug;6(8):635-45.
2. Allen LM, Creaven PJ. *Gas chromatographic method for the determination of plasma isophosphamide (NSC-109724)*. Cancer Chemother Rep. 1972 Dec;56(6):721-3.
3. Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. *A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance*. Cancer Res. 1998 Dec 1;58(23):5337-9.
4. Altenberg GA. *Structure of multidrug-resistance proteins of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily*. Curr Med Chem Anticancer Agents. 2004 Jan;4(1):53-62.
5. Amati B, Frank SR, Donjerkovic D, Taubert S. *Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription*. Biochim Biophys Acta. 2001 Mar 21;1471(3):M135-45.
6. Amati B. *Myc degradation: dancing with ubiquitin ligases*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 15;101(24):8843-4.
7. Ayer DE, Eisenman RN. *A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation*. Genes Dev. 1993 Nov;7(11):2110-9.
8. Bacci G, Ferrari S, Longhi A, Perin S, Forni C, Fabbri N, Salduca N, Versari M, Smith KV. *Pattern of relapse in patients with osteosarcoma of the extremities treated with neoadjuvant chemotherapy*. European Journal of Cancer, 2001: 32-38.
9. Bacci G, Longhi A, Versari M, Mercuri M, Briccoli A, Picci P. *Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at a single institution*. Cancer. 2006 Mar 1;106(5):1154-61.
10. Baker SJ, Reddy EP. *CDK4: A Key Player in the Cell Cycle, Development, and Cancer*. Genes Cancer. 2012 Nov;3(11-12):658-69. doi: 10.1177/1947601913478972.
11. Baldini N, Scotlandi K, Barbanti-Bròdano G, Manara MC, Maurici D, Bacci G,

- Bertoni F, Picci P, Sottili S, Campanacci M, et al. *Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome*. N Engl J Med. 1995 Nov 23;333(21):1380-5.
12. Benini S, Baldini N, Manara MC, Chano T, Serra M, Rizzi S, Lollini PL, Picci P, Scotlandi K. *Redundancy of autocrine loops in human osteosarcoma cells*. Int J Cancer 1999; 80: 581-588.
 13. Bhatia K, Huppi K, Spangler G, Siwarski D, Iyer R, Magrath I. *Point mutations in the c-Myc transactivation domain are common in Burkitt's lymphoma and mouse plasmacytomas*. Nat Genet. 1993 Sep;5(1):56-61.
 14. Blackwood EM, Lüscher B, Kretzner L, Eisenman RN. *The Myc:Max protein complex and cell growth regulation*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1991;56:109-17.
 15. Borst P, Elferink RO. *Mammalian ABC transporters in health and disease*. Annu Rev Biochem. 2002;71:537-92.
 16. Bramwell, V.H.C. *Osteosarcomas and other cancers of bone*. Curr Opin Oncol, 12: 330-336, 2000.
 17. Bruland OS, Pihl A. *On the current management of osteosarcoma. A critical evaluation and a proposal for a modified treatment strategy*. Eur J Cancer. 1997 Oct;33(11):1725-31.
 18. Campanacci M. *High grade osteosarcomas*. In: *Bone and soft tissue tumors, 2nd edition Mario Campanacci*. New York: Springer-Verlag, 1999; pp463-515
 19. Chou AJ, Gorlick R. *Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions*. Expert Rev Anticancer Ther. 2006 Jul;6(7):1075-85.
 20. Daksis JI, Lu RY, Facchini LM, Marhin WW, Penn LJ. *Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle*. Oncogene. 1994 Dec;9(12):3635-45.
 21. Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. *Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Dec;79(24):7824-7.
 22. Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F. *The c-Myc target gene network*. Semin Cancer Biol. 2006 Aug;16(4):253-64. Epub 2006 Jul 25.

23. Dang CV, Resar LM, Emison E, Kim S, Li Q, Prescott JE, Wonsey D, Zeller K. *Function of the c-Myc oncogenic transcription factor*. *Exp Cell Res*. 1999 Nov 25;253(1):63-77.
24. Dean M, Fojo T, Bates S. *Tumour stem cells and drug resistance*. *Nat Rev Cancer*, 2005 Apr;5(4):275-84.
25. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. *Genome Res*, 2001 Jul;11(7):1156-66.
26. Dean M. *The genetics of ATP-binding cassette transporters*. *Methods Enzymol*. 2005;400:409-29.
27. Dirven HA, Megens L, Oudshoorn MJ, Dingemans MA, van Ommen B, van Bladeren PJ. *Glutathione conjugation of the cytostatic drug ifosfamide and the role of human glutathione S-transferases*. *Chem Res Toxicol*. 1995 Oct-Nov;8(7):979-86.
28. Dong J, Lai R, Nielsen K, Fekete CA, Qiu H, Hinnebusch AG. *The essential ATP-binding cassette protein RLII functions in translation by promoting preinitiation complex assembly*. *J Biol Chem*. 2004 Oct 1;279(40):42157-68.
29. Ferrari S, Palmerini E. *Adjuvant and neoadjuvant combination chemotherapy for osteogenic sarcoma*. *Curr Opin Oncol*. 2007 Jul;19(4):341-6.
30. Ferrari S, Smeland S, Mercuri M, Bertoni F, Longhi A, Ruggieri P, Alvegard TA, Picci P, Capanna R, Bernini G, Müller C, Tienghi A, Wiebe T, Comandone A, Böhling T, Del Prever AB, Brosjö O, Bacci G, Saeter G; Italian and Scandinavian Sarcoma Groups. *Neoadjuvant chemotherapy with high-dose Ifosfamide, high-dose methotrexate, cisplatin, and doxorubicin for patients with localized osteosarcoma of the extremity: a joint study by the Italian and Scandinavian Sarcoma Groups*. *J Clin Oncol*. 2005 Dec 1;23(34):8845-52.
31. Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD. *ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps*. *Nat Rev Cancer*. 2010 Feb;10(2):147-56.
32. Galanski M, Jakupec MA, Keppler BK. *Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches*. *Curr Med Chem*. 2005;12(18):2075-94.
33. Gamberi G, Ragazzini P, Benassi MS, Ferrari C, Sollazzo MR, Molendini L, Merli M, Magagnoli G, Ruggieri P, Ballardelli A, Orlando C, Bacchini P, Pazzagli M,

- Picci P. *Analysis of 12q13-15 genes in parosteal osteosarcoma*. Clin Orthop Relat Res. 2000 Aug;(377):195-204.
34. Gartel AL, Ye X, Goufman E, Shianov P, Hay N, Najmabadi F, Tyner AL. *Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Apr 10;98(8):4510-5.
35. Gatti L, Beretta GL, Cossa G, Zunino F, Perego P. *ABC transporters as potential targets for modulation of drug resistance*. Mini Rev Med Chem. 2009 Aug;9(9):1102-12.
36. Gillet JP, Efferth T, Remacle J. *Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes*. Biochim Biophys Acta. 2007 Jun;1775(2):237-62.
37. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*. Nat Rev Cancer. 2002 Jan;2(1):48-58.
38. Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN. *The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol. 2000;16:653-99.
39. Grandori C, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA, Ngouenet C, Galloway DA, Eisenman RN, White RJ. *c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I*. Nat Cell Biol. 2005 Mar;7(3):311-8.
40. Gregory MA, Qi Y, Hann SR. *Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization*. J Biol Chem. 2003 Dec 19;278(51):51606-12.
41. Guo W, Healey JH, Meyers PA, Ladanyi M, Huvos AG, Bertino JR, Gorlick R. *Mechanisms of methotrexate resistance in osteosarcoma*. Clin Cancer Res. 1999 Mar;5(3):621-7.
42. Hann SR, Abrams HD, Rohrschneider LR, Eisenman RN. *Proteins encoded by v-myc and c-myc oncogenes: identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell lines*. Cell. 1983 Oct;34(3):789-98.
43. Hanson KD, Shichiri M, Follansbee MR, Sedivy JM. *Effects of c-myc expression on cell cycle progression*. Mol Cell Biol. 1994 Sep;14(9):5748-55.
44. Hattinger CM, Pasello M, Ferrari S, Picci P, Serra M. *Emerging drugs for high-grade osteosarcoma*. Expert Opin Emerg Drugs. 2010 Dec;15(4):615-34.

45. Hattinger CM, Reverter-Branchat G, Remondini D, Castellani GC, Benini S, Pasello M, Manara MC, Scotlandi K, Picci P, Serra M. *Genomic imbalances associated with methotrexate resistance in human osteosarcoma cell lines detected by comparative genomic hybridization-based techniques*. Eur J Cell Biol. 2003 Sep;82(9):483-93.
46. Hattinger CM, Stoico G, Michelacci F, Pasello M, Scionti I, Remondini D, Castellani GC, Fanelli M, Scotlandi K, Picci P, Serra M. *Mechanisms of gene amplification and evidence of coamplification in drug-resistant human osteosarcoma cell lines*. Genes Chromosomes Cancer. 2009 Apr;48(4):289-309.
47. Hendig D, Langmann T, Kocken S, Zarbock R, Szliska C, Schmitz G, Kleesiek K, Götting C. *Gene expression profiling of ABC transporters in dermal fibroblasts of pseudoxanthoma elasticum patients identifies new candidates involved in PXE pathogenesis*. Lab Invest. 2008 Dec;88(12):1303-15.
48. Hermeking H, Rago C, Schuhmacher M, Li Q, Barrett JF, Obaya AJ, O'Connell BC, Mateyak MK, Tam W, Kohlhuber F, Dang CV, Sedivy JM, Eick D, Vogelstein B, Kinzler KW. *Identification of CDK4 as a target of c-MYC*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Feb 29;97(5):2229-34.
49. Hermeking H. *The MYC oncogene as a cancer drug target*. Curr Cancer Drug Targets. 2003 Jun;3(3):163-75.
50. Hirohashi T, Suzuki H, Takikawa H, Sugiyama Y. *ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3)*. J Biol Chem. 2000 Jan 28;275(4):2905-10.
51. Hoang AT, Cohen KJ, Barrett JF, Bergstrom DA, Dang CV. *Participation of cyclin A in Myc-induced apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jul 19;91(15):6875-9.
52. Hollenstein K, Dawson RJ, Locher KP. *Structure and mechanism of ABC transporter proteins*. Curr Opin Struct Biol. 2007 Aug;17(4):412-8.
53. Holzer AK, Manorek GH, Howell SB. *Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin*. Mol Pharmacol. 2006 Oct;70(4):1390-4.
54. Hopper E, Belinsky MG, Zeng H, Tosolini A, Testa JR, Kruh GD. *Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily*. Cancer Lett. 2001 Jan 26;162(2):181-91.

55. Huls M, Brown CD, Windass AS, Sayer R, van den Heuvel JJ, Heemskerk S, Russel FG, Masereeuw R. *The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane.* *Kidney Int.* 2008 Jan;73(2):220-5.
56. Huynh T, Norris MD, Haber M, Henderson MJ. *ABCC4/MRP4: a MYCN-regulated transporter and potential therapeutic target in neuroblastoma.* *Front Oncol.* 2012 Dec 19;2:178.
57. James L, Eisenman RN. *Myc and Mad bHLHZ domains possess identical DNA-binding specificities but only partially overlapping functions in vivo.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 6;99(16):10429-34.
58. Jansen-Dürr P, Meichle A, Steiner P, Pagano M, Finke K, Botz J, Wessbecher J, Draetta G, Eilers M. *Differential modulation of cyclin gene expression by MYC.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 15;90(8):3685-9.
59. Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D. *The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides.* *J Biol Chem.* 2000 Sep 29;275(39):30069-74.
60. Kaminski WE, Piehler A, Wenzel JJ. *ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease.* *Biochim Biophys Acta.* 2006 May;1762(5):510-24.
61. Kelly RJ, Robey RW, Chen CC, Draper D, Luchenko V, Barnett D, Oldham RK, Caluag Z, Frye AR, Steinberg SM, Fojo T, Bates SE. *A pharmacodynamic study of the P-glycoprotein antagonist CBT-1® in combination with paclitaxel in solid tumors.* *Oncologist.* 2012;17(4):512.
62. Kielar D, Kaminski WE, Liebisch G, Piehler A, Wenzel JJ, Möhle C, Heimerl S, Langmann T, Friedrich SO, Böttcher A, Barlage S, Drobnik W, Schmitz G. *Adenosine triphosphate binding cassette (ABC) transporters are expressed and regulated during terminal keratinocyte differentiation: a potential role for ABCA7 in epidermal lipid reorganization.* *J Invest Dermatol.* 2003 Sep;121(3):465-74.
63. Kipreos ET, Pagano M. *The F-box protein family.* *Genome Biol.* 2000;1(5)
64. Klein MJ, Siegal GP. *Osteosarcoma: anatomic and histologic variants.* *Am J Clin Pathol.* 2006 Apr;125(4):555-81.
65. Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, Jansen G, Peters GJ, Ponne N, Scheper RJ, Elferink RP, Baas F, Borst P. *MRP3, an*

- organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jun 8;96(12):6914-9.
66. Leonard GD, Polgar O, Bates SE. *ABC transporters and inhibitors: new targets, new agents*. Curr Opin Investig Drugs. 2002 Nov;3(11):1652-9.
67. Longhi A, Errani C, De Paolis M, Mercuri M, Bacci G. *Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art*. Cancer Treat Rev. 2006 Oct;32(6):423-36.
68. Lutterbach B, Hann SR. *c-Myc transactivation domain-associated kinases: questionable role for map kinases in c-Myc phosphorylation*. J Cell Biochem. 1999 Mar 15;72(4):483-91.
69. Lutterbach B, Hann SR. *Hierarchical phosphorylation at N-terminal transformation-sensitive sites in c-Myc protein is regulated by mitogens and in mitosis*. Mol Cell Biol. 1994 Aug;14(8):5510-22.
70. Mateyak MK, Obaya AJ, Adachi S, Sedivy JM. *Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination*. Cell Growth Differ. 1997 Oct;8(10):1039-48.
71. Mickley L, Jain P, Miyake K, Schriml LM, Rao K, Fojo T, Bates S, Dean M. *An ATP-binding cassette gene (ABCG3) closely related to the multidrug transporter ABCG2 (MXR/ABCP) has an unusual ATP-binding domain*. Mamm Genome. 2001 Jan;12(1):86-8.
72. Muratani M, Tansey WP. *How the ubiquitin-proteasome system controls transcription*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Mar;4(3):192-201.
73. Nag S, Qin J, Srivenugopal KS, Wang M, Zhang R. *The MDM2-p53 pathway revisited*. J Biomed Res. 2013 Jul;27(4):254-71.
74. Nakanishi T, Doyle LA, Hassel B, Wei Y, Bauer KS, Wu S, Pumplin DW, Fang HB, Ross DD. *Functional characterization of human breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) expressed in the oocytes of Xenopus laevis*. Mol Pharmacol. 2003 Dec;64(6):1452-62.
75. Nikiforov MA, Chandriani S, Park J, Kotenko I, Matheos D, Johnsson A, McMahon SB, Cole MD. *TRRAP-dependent and TRRAP-independent transcriptional activation by Myc family oncoproteins*. Mol Cell Biol. 2002 Jul;22(14):5054-63.

76. Norris MD, Smith J, Tanabe K, Tobin P, Flemming C, Scheffer GL, Wielinga P, Cohn SL, London WB, Marshall GM, Allen JD, Haber M. *Expression of multidrug transporter MRP4/ABCC4 is a marker of poor prognosis in neuroblastoma and confers resistance to irinotecan in vitro.* Mol Cancer Ther. 2005 Apr;4(4):547-53.
77. Obaya AJ, Kotenko I, Cole MD, Sedivy JM. *The proto-oncogene c-myc acts through the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27(Kip1) to facilitate the activation of Cdk4/6 and early G(1) phase progression.* J Biol Chem. 2002 Aug 23;277(34):31263-9.
78. Obaya AJ, Sedivy JM. *Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells.* Cell Mol Life Sci. 2002 Jan;59(1):126-42.
79. Oster SK, Mao DY, Kennedy J, Penn LZ. *Functional analysis of the N-terminal domain of the Myc oncoprotein.* Oncogene. 2003 Apr 3;22(13):1998-2010.
80. Ottaviani G, Jaffe N. *The epidemiology of osteosarcoma.* Cancer Treat Res. 2009;152:3-13.
81. Ottaviani G, Jaffe N. *The etiology of osteosarcoma.* Cancer Treat Res. 2009;152:15-32.
82. Pakos EE, Ioannidis JP. *The association of P-glycoprotein with response to chemotherapy and clinical outcome in patients with osteosarcoma. A meta-analysis.* Cancer. 2003 Aug 1;98(3):581-9.
83. Pasello M, Michelacci F, Scionti I, Hattinger CM, Zuntini M, Caccuri AM, Scotlandi K, Picci P, Serra M. *Overcoming glutathione S-transferase P1-related cisplatin resistance in osteosarcoma.* Cancer Res 2008; 68: 6661-6668.
84. Picci P, Bacci G, Campanacci M, Gasparini M, Pilotti S, Cerasoli S, Bertoni F, Guerra A, Capanna R, Albisinni U, et al. *Histologic evaluation of necrosis in osteosarcoma induced by chemotherapy. Regional mapping of viable and nonviable tumor.* Cancer. 1985 Oct 1;56(7):1515-21.
85. Picci P. *Osteosarcoma (osteogenic sarcoma).* Orphanet J Rare Dis. 2007 Jan 23;2:6.
86. Piehler AP, Ozcürümez M, Kaminski WE. *A-Subclass ATP-Binding Cassette Proteins in Brain Lipid Homeostasis and Neurodegeneration.* Front Psychiatry. 2012 Mar 5;3:17. doi: 10.3389/fpsy.2012.00017. eCollection 2012.

87. Popov N, Wanzel M, Madiredjo M, Zhang D, Beijersbergen R, Bernards R, Moll R, Elledge SJ, Eilers M. *The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability*. Nat Cell Biol. 2007 Jul;9(7):765-74.
88. Porro A, Haber M, Diolaiti D, Iraci N, Henderson M, Gherardi S, Valli E, Munoz MA, Xue C, Flemming C, Schwab M, Wong JH, Marshall GM, Della Valle G, Norris MD, Perini G. *Direct and coordinate regulation of ATP-binding cassette transporter genes by Myc factors generates specific transcription signatures that significantly affect the chemoresistance phenotype of cancer cells*. J Biol Chem. 2010 Jun 18;285(25):19532-43.
89. Porro A, Iraci N, Soverini S, Diolaiti D, Gherardi S, Terragna C, Durante S, Valli E, Kalebic T, Bernardoni R, Perrod C, Haber M, Norris MD, Baccarani M, Martinelli G, Perini G. *c-MYC oncoprotein dictates transcriptional profiles of ATP-binding cassette transporter genes in chronic myelogenous leukemia CD34+ hematopoietic progenitor cells*. Mol Cancer Res. 2011 Aug;9(8):1054-66.
90. Quinton PM. *Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective*. Physiol Rev. 1999 Jan;79(1 Suppl):S3-S22.
91. Robey RW, Shukla S, Finley EM, Oldham RK, Barnett D, Ambudkar SV, Fojo T, Bates SE. *Inhibition of P-glycoprotein (ABCB1)- and multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1)-mediated transport by the orally administered inhibitor, CBT-1((R))*. Biochem Pharmacol. 2008 Mar 15;75(6):1302-12.
92. Salghetti SE, Kim SY, Tansey WP. *Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc*. EMBO J. 1999 Feb 1;18(3):717-26.
93. Sauna ZE, Smith MM, Müller M, Kerr KM, Ambudkar SV. *The mechanism of action of multidrug-resistance-linked P-glycoprotein*. J Bioenerg Biomembr. 2001 Dec;33(6):481-91.
94. Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. *The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors*. Blood. 2002 Jan 15;99(2):507-12.
95. Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas RV, Kumar A, Fridland A. *MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs*. Nat Med. 1999 Sep;5(9):1048-51.

96. Scionti I, Michelacci F, Pasello M, Hattinger CM, Alberghini M, Manara MC, Bacci G, Ferrari S, Scotlandi K, Picci P, Serra M. *Clinical impact of the methotrexate resistance-associated genes C-MYC and dihydrofolate reductase (DHFR) in high-grade osteosarcoma*. Ann Oncol. 2008 Aug;19(8):1500-8.
97. Serra M, Pasello M, Manara MC, Scotlandi K, Ferrari S, Bertoni F, Mercuri M, Alvegard TA, Picci P, Bacci G, Smeland S. *May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group I treatment protocol*. Int J Oncol. 2006 Dec;29(6):1459-68.
98. Serra M, Reverter-Branchat G, Maurici D, Benini S, Shen JN, Chano T, Hattinger CM, Manara MC, Pasello M, Scotlandi K, Picci P. *Analysis of dihydrofolate reductase and reduced folate carrier gene status in relation to methotrexate resistance in osteosarcoma cells*. Ann Oncol. 2004 Jan;15(1):151-60.
99. Serra M, Scotlandi K, Manara MC, Maurici D, Lollini PL, De Giovanni C, Toffoli G, Baldini N. *Establishment and characterization of multidrug-resistant human osteosarcoma cell lines*. Anticancer Res. 1993 Mar-Apr;13(2):323-9.
100. Serra M, Scotlandi K, Reverter-Branchat G, Ferrari S, Manara MC, Benini S, Incaprera M, Bertoni F, Mercuri M, Briccoli A, Bacci G, Picci P. *Value of P-glycoprotein and clinicopathologic factors as the basis for new treatment strategies in high-grade osteosarcoma of the extremities*. J Clin Oncol. 2003 Feb 1;21(3):536-42.
101. Seth A, Alvarez E, Gupta S, Davis RJ. *A phosphorylation site located in the NH₂-terminal domain of c-Myc increases transactivation of gene expression*. J Biol Chem. 1991 Dec 15;266(35):23521-4.
102. Shindo H, Tani E, Matsumoto T, Hashimoto T, Furuyama J. *Stabilization of c-myc protein in human glioma cells*. Acta Neuropathol. 1993;86(4):345-52.
103. Steiner P, Philipp A, Lukas J, Godden-Kent D, Pagano M, Mittnacht S, Bartek J, Eilers M. *Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes*. EMBO J. 1995 Oct 2;14(19):4814-26.
104. Stone J, de Lange T, Ramsay G, Jakobovits E, Bishop JM, Varmus H, Lee W. *Definition of regions in human c-myc that are involved in transformation and nuclear localization*. Mol Cell Biol. 1987 May;7(5):1697-709.
105. Takimoto CH. *New Antifolates: Pharmacology and Clinical Applications*. Oncologist. 1996;1(1 & 2):68-81.

106. Tanaka N, Abe-Dohmae S, Iwamoto N, Yokoyama S. *Roles of ATP-binding cassette transporter A7 in cholesterol homeostasis and host defense system.* J Atheroscler Thromb. 2011;18(4):274-81.
107. Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S, Aaronson S, Leder P. *Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Dec;79(24):7837-41.
108. Vita M, Henriksson M. *The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer.* Semin Cancer Biol. 2006 Aug;16(4):318-30.
109. Vlaming ML, Lagas JS, Schinkel AH. *Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice.* Adv Drug Deliv Rev. 2009 Jan 31;61(1):14-25.
110. von der Lehr N, Johansson S, Wu S, Bahram F, Castell A, Cetinkaya C, Hydbring P, Weidung I, Nakayama K, Nakayama KI, Söderberg O, Kerppola TK, Larsson LG. *The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteasomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription.* Mol Cell. 2003 May;11(5):1189-200.
111. Welcker M, Clurman BE. *FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation.* Nat Rev Cancer. 2008 Feb;8(2):83-93.
112. Welcker M, Orian A, Grim JE, Eisenman RN, Clurman BE. *A nucleolar isoform of the Fbw7 ubiquitin ligase regulates c-Myc and cell size.* Curr Biol. 2004 Oct 26;14(20):1852-7.
113. Welcker M, Orian A, Jin J, Grim JE, Harper JW, Eisenman RN, Clurman BE. *The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 15;101(24):9085-90.
114. Wu S, Cetinkaya C, Munoz-Alonso MJ, von der Lehr N, Bahram F, Beuger V, Eilers M, Leon J, Larsson LG. *Myc represses differentiation-induced p21^{CIP1} expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter.* Oncogene. 2003 Jan 23;22(3):351-60.
115. Yabuuchi H, Takayanagi Si, Yoshinaga K, Taniguchi N, Aburatani H, Ishikawa T. *ABCC13, an unusual truncated ABC transporter, is highly expressed in fetal human liver.* Biochem Biophys Res Commun. 2002 Dec 6;299(3):410-7.

116. Zunino F, Capranico G. *DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines*. *Anticancer Drug Des.* 1990 Nov;5(4):307-17.