

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
DOTTORATO DI RICERCA IN
**SCIENZE FARMACOLOGICHE E TOSSICOLOGICHE,
DELLO SVILUPPO E DEL MOVIMENTO UMANO**

CICLO XXVII

Settore Concorsuale di afferenza: 05/F1

Settore Scientifico disciplinare: BIO/13

**IDENTIFICAZIONE DEI MECCANISMI MOLECOLARI
RESPONSABILI DEL RUOLO ONCOSOPPRESSIVO
DELLA MOLECOLA CD99 NELL'OSTEOSARCOMA**

Presentata da:

ROSA SIMONA PINCA

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa **CINZIA ZUCCHINI**

Coordinatore Dottorato

Chiar.ma Prof.ssa

PATRIZIA HRELIA

Correlatore

Chiar.ma Prof.ssa **KATIA SCOTLANDI**

ESAME FINALE ANNO 2015

INDICE

ABSTRACT	<i>pag.</i>	1
SOMMARIO	<i>pag.</i>	2
INTRODUZIONE	<i>pag.</i>	4
1. OSTEOSARCOMA	<i>pag.</i>	5
1.1 ISTOLOGIA DELL'OSTEOSARCOMA.....	<i>pag.</i>	6
1.2 ASPETTI CLINICI E DIAGNOSI.....	<i>pag.</i>	8
1.3 1.3 TRATTAMENTO.....	<i>pag.</i>	10
1.4 PROGNOSI.....	<i>pag.</i>	11
1.5 EZIOLOGIA E PATOGENESI.....	<i>pag.</i>	13
1.6 ASPETTI GENETICI E MOLECOLARI.....	<i>pag.</i>	16
2. CD99	<i>pag.</i>	19
2.1 ESPRESSIONE NEI TESSUTI NORMALI E RUOLO FISILOGICO.....	<i>pag.</i>	20
2.2 CD99 E CANCRO.....	<i>pag.</i>	25
2.3 CD99 E OSTEOSARCOMA.....	<i>pag.</i>	29
SCOPO DELLA TESI	<i>pag.</i>	32
MATERIALI E METODI	<i>pag.</i>	35
1. COLTURE CELLULARI.....	<i>pag.</i>	36
2. ANALISI ULTRASTRUTTURALE.....	<i>pag.</i>	37
3. ANALISI MICROARRAY.....	<i>pag.</i>	37
4. SAGGIO DI LUCIFERASI.....	<i>pag.</i>	38
5. TRATTAMENTI.....	<i>pag.</i>	39
6. SAGGIO DI LUCIFERASI.....	<i>pag.</i>	39
7. SAGGIO DI AGGREGAZIONE OMOTIPICA.....	<i>pag.</i>	40

8. VALUTAZIONE DELLA MIGRAZIONE CELLULARE: WOUND ASSAY...	pag.	40
9. VALUTAZIONE DELLA MIGRAZIONE CELLULARE: MOTILITY ASSAY	pag.	40
10. VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ DI CRESCITA ANCORAGGIO- INDIPENDENTE.....	pag.	41
11. VALUTAZIONE DEL CICLO CELLULARE.....	pag.	41
12. VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI.....	pag.	42
13. IMMUNOFLUORESCENZA SU CELLULE IN SOSPENSIONE.....	pag.	42
14. IMMUNOFLUORESCENZA SU CELLULE IN ADERENZA.....	pag.	43
15. WESTERN BLOT.....	pag.	44
16. IMMUNOPRECIPITAZIONE.....	pag.	45
17. VALUTAZIONE IN REAL TIME PCR DELL'ESPRESSIONE DI EZRINA..	pag.	46
18. VALUTAZIONE IN REAL TIME PCR DELL'ESPRESSIONE DEL MicroRNA-138.....	pag.	46
19. SILENZIAMENTO STABILE DI ROCK2 NELLE U-2 OS.....	pag.	47
20. ESPERIMENTO IN VIVO.....	pag.	47
RISULTATI	pag.	49
1. CD99 MODULA L'ESPRESSIONE DI MOLECOLE COINVOLTE NEI PROCESSI DI ADESIONE E DI MIGRAZIONE CELLULARE.....	pag.	50
1.1 IL CD99 wt RAFFORZA L'ADESIONE CELLULA-CELLULA E FAVORISCE IL RECLUTAMENTO NELLA MEMBRANA PLASMATICA DI β - CATENINA E DI N-CADERINA.....	pag.	50
1.2 IL CD99 wt SOPPRIME ROCK2 E ARP2.....	pag.	52
1.3 IL CD99 wt SOPPRIME L'EZRINA.....	pag.	53
1.4 CD99 NON INTERAGISCE DIRETTAMENTE CON LE PROTEINE DI MEMBRANA CHE REGOLA.....	pag.	54
2. IDENTIFICAZIONE DI ROCK2 COME MEDIATORE CRUCIALE DEGLI EFFETTI DI CD99 SU ADESIONE E MIGRAZIONE.....	pag.	62

2.1 ROCK2 MODULA LA CAPACITÀ DI ADESIONE OMOTIPICA.....	pag.	62
2.2 ROCK2 MODULA LA CAPACITÀ MIGRATORIA.....	pag.	63
2.3 LA RIESPRESSIONE DI ROCK2 RIPRISTINA ADESIONE E MIGRAZIONE	pag.	64
3. IL CD99 wt SOPPRIME L'EZRINA E AUMENTA L'ESPRESSIONE DI β-CATENINA E DI N-CADERINA MEDIANTE LA MODULAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI ROCK2 E SRC.....	pag.	70
4. ROCK2 MEDIA LA DIFFUSIONE METASTATICA DELLE CELLULE DI OS UMANO.....	pag.	74
4.1 CREAZIONE DI UNA LINEA DI OS UMANO STABILMENTE SILENZIATA PER ROCK2.....	pag.	74
4.2 IL SILENZAMENTO DI ROCK2 COMPROMETTE LA DIFFUSIONE METASTATICA DELLE CELLULE DI OS IN VIVO.....	pag.	75
4.3 VALUTAZIONE IN VITRO DELL'EFFICACIA DEL PAN-INIBITORE DI ROCK Y27632.....	pag.	76
5. CD99 E ROCK2 NEL SARCOMA DI EWING.....	pag.	85
5.1 ROCK2 MODULA LA CAPACITÀ MIGRATORIA DELLE CELLULE DI SARCOMA DI EWING.....	pag.	85
5.2 VALUTAZIONE IN VITRO DELL'EFFICACIA DEL PAN-INIBITORE DI ROCK Y27632.....	pag.	86
DISCUSSIONE.....	pag.	94
CONCLUSIONI.....	pag.	103
BIBLIOGRAFIA.....	pag.	106
RINGRAZAMENTI.....	pag.	121

ABSTRACT

CD99, a transmembrane protein encoded by MIC2 gene is involved in multiple cellular events including cell adhesion, migration, apoptosis, cell differentiation and regulation of protein trafficking either in physiological or pathological conditions. In osteosarcoma, CD99 is expressed at low levels and functions as a tumour suppressor. The full-length protein (CD99wt) and the short-form harbouring a deletion in the intracytoplasmic domain (CD99sh) have been associated with distinct functional outcomes with respect to tumour malignancy. In this study, we evaluated modulation of cell-cell contacts, reorganisation of the actin cytoskeleton and modulation of signalling pathways by comparing osteosarcoma cells characterised by different metastasis capabilities and CD99 expression, to identify molecular mechanisms responsible for metastasis. Our data indicate that forced expression of CD99wt induces recruitment of N-cadherin and β -catenin to adherens junctions and inhibits the expression of several molecules crucial to the remodelling of the actin cytoskeleton, such as ACTR2, ARPC1A, Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2 (ROCK2) as well as ezrin, an ezrin/radixin/moesin family member that has been clearly associated with tumour progression and metastatic spread in osteosarcoma. Functional studies point to ROCK2 as a crucial intracellular mediator regulating osteosarcoma migration and metastatic spread. By maintaining cSrc in an inactive conformation, CD99wt inhibits ROCK2 signalling and this leads to ezrin decrease at cell membrane while N-cadherin and β -catenin translocate to the plasma membrane and function as main molecular bridges for actin cytoskeleton. We propose that the re-expression of CD99wt, which is generally present in osteoblasts but lost in osteosarcoma, through inhibition of cSrc and ROCK2 activity, manages to increase contact strength and reactivate stop-migration signals that counteract the otherwise dominant promigratory action of ezrin in osteosarcoma cells. We also assessed ROCK2 function in Ewing sarcoma cells: despite the oncogenic role exerted by CD99 in these tumour cells, ROCK2 still drives cell migration.

SOMMARIO

CD99, glicoproteina di membrana codificata dal gene MIC2, è coinvolta in numerosi processi cellulari, inclusi adesione, migrazione, apoptosi, differenziamento e regolazione del trafficking intracellulare di proteine, in condizioni fisiologiche e patologiche. Nell'osteosarcoma risulta scarsamente espressa ed ha ruolo oncosoppressivo. L'isoforma completa (CD99wt) e l'isoforma tronca (CD99sh), deleta di una porzione del dominio intracellulare, influenzano in modo opposto la malignità tumorale. In questo studio, comparando cellule di osteosarcoma caratterizzate da differenti capacità metastatiche e diversa espressione di CD99, abbiamo valutato la modulazione dei contatti cellula-cellula, la riorganizzazione del citoscheletro di actina e la modulazione delle vie di segnalazione a valle del CD99, al fine di identificare i meccanismi molecolari regolati da questa molecola e responsabili del comportamento migratorio e invasivo delle cellule di osteosarcoma. L'espressione forzata di CD99wt induce il reclutamento di N-caderina e β -catenina a livello delle giunzioni aderenti ed inibisce l'espressione di molecole cruciali nel processo di rimodellamento del citoscheletro di actina, come ACTR2, ARPC1A, Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 2 (ROCK2), nonché di ezrina, membro della famiglia ezrin/radixin/moesin e chiaramente associata con la progressione tumorale e la metastatizzazione dell'OS. Gli studi funzionali identificano ROCK2 come mediatore fondamentale nella regolazione della migrazione e della diffusione metastatica dell'osteosarcoma. Mantenendo cSrc in una conformazione inattiva, CD99wt inibisce la segnalazione mediata da ROCK2 inducendo una diminuzione dell'ezrina a livello della membrana accompagnata dalla traslocazione in membrana di N-caderina e β -catenina, principali ponti molecolari per il citoscheletro di actina. La ri-espressione di CD99wt, generalmente presente negli osteoblasti, ma persa nelle cellule di osteosarcoma, attraverso l'inibizione dell'attività di cSrc e ROCK2, aumenta la forza di contatto e riattiva i segnali anti-migratori ostacolando l'azione pro-migratoria, altrimenti dominante, dell'ezrina nell'osteosarcoma. Abbiamo infine valutato la funzione di ROCK2 nel sarcoma di Ewing: nonostante il ruolo oncogenico esercitato da CD99, ROCK2 guida la migrazione cellulare anche in questa neoplasia.

*A mio nonno, che credeva in me,
e a Luca e Matteo, che credevano nella Ricerca.*

INTRODUZIONE

1. OSTEOSARCOMA

L'osteosarcoma (OS) è un tumore primitivo maligno di alto grado dell'osso formato da cellule neoplastiche di origine mesenchimale che producono matrice osteoide (*Raymond et al., 2002*).

Pur essendo raro (rappresenta infatti meno dell'1% dei tumori diagnosticati negli Stati Uniti), è il tumore maligno primitivo dell'osso più frequentemente diagnosticato (*Mirabello et al., 2009*). Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), il tasso di incidenza stimato per l'insorgenza di questa neoplasia è di circa 4-5 casi per milione di abitanti all'anno (*Raymond et al., 2002*).

L'OS sembra colpire più frequentemente i maschi delle femmine (ratio 3:2) (*Raymond et al., 2002*) mentre, per quanto riguarda l'età d'insorgenza, presenta una distribuzione bimodale: un primo picco si osserva nella seconda decade di vita (16 anni per le femmine, 18 anni per i maschi) e un secondo picco in età più avanzata (oltre 50 anni) (*Marina et al., 2004*). Nei pazienti adulti è spesso considerato una neoplasia secondaria derivante dalla trasformazione sarcomatosa del morbo di Paget o di altre lesioni benigne dell'osso (34% dei casi) (*Mirabello et al., 2009*) oppure indotta da esposizione a terapia radiante (*Raymond et al., 2002*). È estremamente raro nei bambini di età inferiore ai 5 anni (*Marina et al., 2004*).

Sebbene possa insorgere potenzialmente in qualunque distretto, l'OS nei pazienti giovani insorge più comunemente nella cavità midollare delle metafisi delle ossa

lunghe dello scheletro appendicolare, caratterizzate da una spiccata rapidità dei processi di crescita e rimodellamento. Le sedi più frequenti sono femore distale, tibia prossimale e omero prossimale; circa la metà dei casi origina nell'area attorno al ginocchio (*Campanacci, 1999*). Solo in una ridotta percentuale di pazienti giovani (meno del 10%) si osserva l'interessamento dello scheletro assile, in particolare delle pelvi (*Marina et al., 2004*). Nei pazienti adulti invece la neoplasia origina più comunemente nello scheletro assile e in aree precedentemente irradiate o in cui l'osso presenta delle anomalie, ad esempio il morbo di Paget (*Hayden et al., 2006*). Le mani e i piedi rappresentano siti di insorgenza estremamente rari (*Picci, 2014*).

1.1 ISTOLOGIA DELL'OSTEOSARCOMA

L'OS ha un ampio spettro di varianti istologiche, tutte caratterizzate dalla proliferazione di cellule mesenchimali maligne e dalla produzione di matrice osteoide da parte delle cellule neoplastiche (*Marina et al., 2004*). Le aree meno osteogeniche del tumore, solitamente periferiche, sono altamente cellulate; le cellule tumorali mostrano le caratteristiche tipiche di un'elevata malignità: spiccato pleiomorfismo, nuclei allargati e ipercromici, nucleoli evidenti e frequenti mitosi atipiche (*Picci, 2014*).

La diagnosi dell'OS si basa sull'accurata identificazione della matrice osteoide extracellulare che, dopo colorazione con ematossilina/eosina, si presenta come un materiale intercellulare denso e amorfo di colore rosa (*Raymond et al., 2002*). Lo spessore dell'osteoide è estremamente variabile, anche nell'ambito dello stesso tumore.

In base alla natura della matrice extracellulare prodotta, si possono distinguere tre sottotipi principali (*Marina et al., 2004; Raymond et al., 2002*):

- **OS Osteoblastico (50%)**: la matrice è costituita principalmente da osso e/o osteoide non mineralizzato. Le cellule tumorali hanno una morfologia estremamente variabile: si osservano cellule fusate, cellule più piccole tondeggianti o ovoidali e cellule anaplastiche giganti mono- o pluri-nucleate. La quantità e l'aspetto della matrice depositata sono altrettanto variabili.
- **OS Condrioblastico (25%)**: la matrice è in prevalenza condroide ed è formata principalmente da cartilagine ialina insieme a componenti non condroidi. Le cellule maligne si trovano all'interno delle lacune.
- **OS Fibroblastico (25%)**: la matrice è fibrosa. È composto da cellule fusate maligne che producono piccole quantità di matrice ossea, con o senza cartilagine.

È importante sottolineare che all'interno dello stesso tumore spesso coesistono le diverse varianti istologiche e che la classificazione basata su questi sottotipi di osteosarcoma non sembra avere valore prognostico (*Marina et al., 2004*).

Esistono altre due varianti istologiche dell'OS riconosciute dall'OMS (*Marina et al., 2004*):

- **OS Teleangiectasico (o Emorragico)**: è una lesione estremamente rara (meno del 4% dei casi), puramente litica, in cui non si osserva mineralizzazione della matrice osteoide; è caratterizzato dalla presenza di cavità riempite di sangue separate da setti e appare simile a una cisti ossea

aneurismatica. La quantità di matrice osteoide prodotta dalle cellule presenti nei setti è variabile, ma in genere molto modesta (*Matsuno et al., 2002*).

- **OS a piccole cellule:** anch'esso rappresenta una variante molto rara (circa l'1,5% dei casi). È composto da piccole cellule dalla morfologia rotonda o fusata che ricordano le cellule di sarcoma di Ewing ma che, diversamente da queste ultime, producono quantità variabili di osteoide (*Kalil et al., 2002*). Sembra che questa variante sia associata ad una prognosi peggiore rispetto all'OS convenzionale (*Rozeman et al., 2006*).

1.2 ASPETTI CLINICI E DIAGNOSI

Il sintomo che più comunemente si manifesta nei pazienti affetti da OS è un dolore relativamente aspecifico nell'area interessata, che può essere o meno accompagnato da gonfiore, e che spesso viene erroneamente attribuito a traumi o intensa attività, motivo per cui solitamente trascorrono settimane, o eventualmente anche mesi, dalla comparsa dei primi sintomi alla diagnosi (*Marina et al., 2004; Raymond et al., 2002; HaDuong et al., 2015*). I sintomi fisici possono essere limitati all'identificazione di una massa tenera e dolorosa; altri sintomi possono includere riduzione della mobilità e delle normali funzioni motorie, edema, calore localizzato nell'area interessata. In alcuni casi (5-10%) possono verificarsi fratture patologiche (*Raymond et al., 2002*).

L'esame radiografico convenzionale è di cruciale importanza nella diagnosi dell'OS. La lesione può apparire osteoblastica oppure litica, ma nella maggior parte dei casi è una

lesione mista litica/blastica accompagnata da distruzione della regione corticale e dall'estensione del tumore nel tessuto molle adiacente (*Raymond et al., 2002*). Nonostante l'aspetto radiografico estremamente variabile, la specifica localizzazione a livello delle metafisi permette la diagnosi differenziale dell'OS (*Rozeman et al., 2006*). L'estensione della lesione nella cavità midollare dell'osso, l'interessamento delle articolazioni adiacenti e l'eventuale interazione con componenti dei tessuti molli è valutabile mediante risonanza magnetica (MRI), mentre mediante tomografia computerizzata (TC) è possibile rilevare la presenza di metastasi polmonari e di focolai satelliti del tumore nel canale midollare dell'osso interessato o nell'osso adiacente (*Cleton-Jansen et al., 2005*).

La diagnosi differenziale dell'osteosarcoma è solitamente semplice, ma talvolta l'aspetto radiografico della lesione può rivelarsi fuorviante in quanto alcune varianti di OS possono essere facilmente confuse con altre lesioni benigne o maligne dell'osso, ad esempio con cisti ossee aneurismatiche, fibrosarcoma, sarcoma di Ewing oppure con tumore a cellule giganti (*Cleton-Jansen et al., 2005; Picci, 2007*). Risulta pertanto indispensabile includere nell'analisi l'esame bioptico (*Campanacci, 1999*).

L'analisi immunohistochimica risulta poco utile nella diagnosi dell'OS: non sono stati ancora identificati marcatori specifici e affidabili utilizzabili su campioni inclusi in paraffina. Solo l'immunocolorazione per la fosfatasi alcalina può essere impiegata per stabilire la natura osteoblastica dell'OS, ma richiede l'impiego di campioni congelati, che non sempre sono disponibili (*Rozeman et al., 2006*).

1.3 TRATTAMENTO

Il trattamento dell'OS prevede una combinazione di resezione chirurgica del tumore primario e delle eventuali metastasi presenti e di chemioterapia pre- e post-operatoria (neoadiuvante e adiuvante). L'OS è generalmente radioresistente alle dosi standard, la radioterapia viene quindi impiegata esclusivamente, e con effetti limitati, in quei casi in cui la resezione chirurgica non è possibile (*Picci, 2007*).

Gli attuali protocolli chemioterapici si basano sulla combinazione di quattro farmaci: metotrexato ad alte dosi (HDMTX), cisplatino (CDP), adriamicina (AMD) e Ifosfamide (IF). La chemioterapia preoperatoria (neoadiuvante) inizia subito dopo la diagnosi e ha una durata di 8-10 settimane. Il tumore viene sottoposto ad una nuova stadiazione (aspetti clinici e imaging) e si procede quindi con la resezione chirurgica della massa tumorale e di tutte le metastasi visibili (*Picci, 2007*). La resezione chirurgica è di fondamentale importanza nella cura dell'OS; può essere ottenuta mediante amputazione, interventi conservativi (circa il 80-90% dei casi) o giroplastica. È importante che i margini di resezione siano adeguati: in caso di margini chirurgici non adeguati il tasso di recidiva locale risulta molto alto (25%), e la recidiva locale ha un valore prognostico altamente sfavorevole (*Grimer et al., 2002; Bacci et al., 2002*).

Il pezzo operatorio viene sottoposto ad un'attenta analisi istologica volta a valutare la risposta alla chemioterapia neoadiuvante in termini di necrosi tumorale: sono considerati "responsivi" i pazienti che mostrano necrosi in più del 90% del tumore, gli altri si considerano "poco responsivi". Il grado di risposta alla chemioterapia primaria ha valore prognostico nell'OS. La terapia adiuvante inizia 1-2 settimane dopo

l'intervento e continua per un periodo di 12-29 settimane (Picci, 2014; Luetke et al., 2014; HaDuong et al., 2015).

1.4 PROGnosi

L'OS è una patologia molto aggressiva caratterizzata da un decorso estremamente rapido e una spiccata tendenza a formare metastasi: circa il 10-20% dei pazienti, infatti, presenta metastasi evidenti alla diagnosi. Il sito di metastatizzazione più frequente è rappresentato dai polmoni (90%), ma si possono osservare anche metastasi ossee (8-10%) e molto raramente a livello dei linfonodi (Luetke et al., 2014; HaDuong et al., 2015). Poiché l'80-90% dei pazienti muore a causa della diffusione metastatica dopo l'ablazione del tumore primitivo se non sottoposto a chemioterapia, si suppone che nell'80-90% dei casi di OS siano presenti micrometastasi occulte alla diagnosi (Campanacci, 1999). La principale causa di morte nei pazienti affetti da OS è rappresentata da insufficienza respiratoria dovuta alla diffusione metastatica del tumore a livello polmonare (Marina et al., 2004).

Il tasso di sopravvivenza per i pazienti con OS localizzato è di circa 70%, mentre il restante 30% dei pazienti sviluppa recidive. Le ricadute sono rappresentate da metastasi polmonari (80%) o ossee (15%) e insorgono solitamente entro 2 o 3 anni dal completamento della terapia, mentre le ricadute tardive (dopo più di 5 anni dal trattamento iniziale) sono abbastanza rare: si osservano infatti in meno del 5% dei pazienti. La sopravvivenza media dopo una ricaduta è inferiore a un anno; dei pochi pazienti in cui si verifica una seconda remissione della malattia, l'80-90% ricade di

nuovo entro il primo anno (*Kempf-Bielack et al., 2005; Hayden et al., 2006; Rozeman et al., 2006; Luetke et al., 2014*).

I fattori prognostici significativi per questa neoplasia sono pochi (*Longhi et al., 2006; Luetke et al., 2014*):

- Presenza di metastasi all'esordio: il tasso di sopravvivenza senza ricadute dopo 5 anni per i pazienti con tumore localizzato è del 60-70%, mentre per i pazienti con metastasi all'esordio è del 20-30%.
- Risposta istologica (necrosi) del tumore alla chemioterapia preoperatoria: il tasso di sopravvivenza senza ricadute dopo 5 anni per i pazienti responsivi (necrosi >90%) è del 70-80% mentre per i pazienti poco responsivi (necrosi ≤90%) è del 35-45%.
- Sede del tumore primitivo: le lesioni che interessano lo scheletro assile hanno solitamente un decorso clinico peggiore rispetto a quelle che interessano gli arti.
- Margini chirurgici e volume del tumore.

Per i pazienti con metastasi polmonari all'esordio sembrano avere rilevanza prognostica anche il numero, la lateralità e i margini chirurgici dei noduli (*Marina et al., 2004*).

L'introduzione della chemioterapia neoadiuvante nei protocolli per il trattamento dell'OS, avvenuta negli anni 80, ha notevolmente migliorato il tasso di sopravvivenza per i pazienti affetti da OS. L'approccio neoadiuvante, inoltre, offre diversi vantaggi tra cui l'opportunità di trattare precocemente le micrometastasi occulte e di valutare la

risposta istologica del tumore alla chemioterapia preoperatoria; consente inoltre di migliorare i margini chirurgici del tumore e delle metastasi riducendone il volume e facilitando così la procedura chirurgica, che può essere altresì accuratamente programmata nel lasso di tempo che intercorre tra la diagnosi e l'intervento, periodo in cui si rende anche possibile lo sviluppo di endoprotesi personalizzate che permettano di effettuare un intervento conservativo, evitando in tal modo l'amputazione dell'arto (*Marina et al., 2004; HaDuong et al., 2015*).

1.5 EZIOLOGIA E PATOGENESI

Le cellule di OS sono in grado di produrre matrice osteoide, fosfatasi alcalina, osteocalcina e varie sialoproteine ossee, e per tale motivo si pensa che esse derivino dalla trasformazione maligna di osteoblasti normali. Tuttavia, l'enorme variabilità sia in termini di morfologia che in termini di capacità differenziativa che caratterizza le cellule di OS supporta l'idea che le cellule progenitrici possano essere rappresentate dai precursori degli osteoblasti: cellule mesenchimali multipotenti e indifferenziate (*Cleton-Jansen et al., 2005; Rozeman et al., 2006*). L'eziologia dell'OS non è ancora stata chiarita. Il picco di incidenza durante la pubertà lascerebbe pensare all'esistenza di una correlazione tra un'elevata attività osteoblastica e osteogenica, tipica di questa età, e la patogenesi dell'OS. La differenza tra maschi e femmine nell'età in cui si osserva il picco di insorgenza della neoplasia (18 per i maschi e 16 per le femmine), insieme all'osservazione che l'OS canino insorge più frequentemente negli animali di grossa taglia rispetto alle razze più piccole (*Tjalma, 1966; Price, 1958*), supportano

questa ipotesi, tuttavia l'OS insorge anche in altre fasce di età, sia precedenti che posteriori alla pubertà (*Marina et al., 2004; Longhi et al., 2006*).

Alcuni autori hanno ipotizzato un'origine virale per l'OS, basandosi sull'evidenza sperimentale che sarcomi ossei nei topi possono essere indotti da virus (*Finkel et al., 1966*); inoltre il DNA del virus SV40, un contaminante accidentale dei vaccini anti-poliomielite ampiamente usati tra il 1955 e il 1962, è stato ritrovato in un certo numero di osteosarcomi (*Mendoza et al., 1998*). Tuttavia studi a lungo termine non hanno evidenziato nessun aumento nel rischio cancerogenico nei pazienti a cui è stato somministrato il vaccino contaminato da SV40 (*Engels, 2005*). Non ci sono dunque prove convincenti a supporto di questa ipotesi (*Marina et al., 2004; Longhi et al., 2006*).

Frequentemente emerge una storia di trauma nei pazienti colpiti da OS, ma anche questa ipotesi riguardo l'eziopatogenesi dell'OS è stata scartata: in genere il trauma richiama l'attenzione su una lesione pre-esistente (*Raymond et al., 2002; Longhi et al., 2006*).

Esistono alcune malattie associate un maggiore rischio di insorgenza dell'OS. Nei pazienti affetti da retinoblastoma ereditario, in cui è presente una mutazione del gene oncosoppressore RB1 (localizzato sul cromosoma 13q14), si osserva un aumento nell'incidenza di tumori secondari, che nella maggior parte dei casi sono osteosarcomi. Analogamente, i pazienti affetti dalla sindrome di Li-Fraumeni, caratterizzata dalla presenza di mutazioni germinali dell'oncosoppressore TP53 (localizzato sul cromosoma 17p13), presentano un maggiore rischio di sviluppare neoplasie secondarie, tra cui

l'OS. Tra le altre malattie che aumentano il rischio di insorgenza di OS troviamo la sindrome di Rothmund–Thomson (caratterizzata da mutazioni del gene RecQL4 sul cromosoma 18q24), la sindrome di Werner (caratterizzata da mutazioni dell'elicasi WRN sul cromosoma 8p12-p11) e la sindrome di Bloom (caratterizzata da mutazioni del gene BLM sul cromosoma 15q26) (*Sandberg et al., 2003; Cleton-Jansen et al., 2005; Hayden et al., 2006; Kansara et al., 2007*).

Il morbo di Paget è una malattia ossea ereditaria caratterizzata da un rapido rimodellamento del tessuto osseo con conseguente formazione ossea anormale. I pazienti affetti da questo disturbo presentano un rischio di sviluppare OS diverse migliaia di volte maggiore rispetto alla popolazione normale, soprattutto in età avanzata: circa l'1% di essi sviluppa infatti OS. Non è ancora chiaro se il maggiore rischio di sviluppare OS in questi pazienti sia dovuto a particolari fattori genetici comuni alle due patologie oppure all'elevata attività osteoblastica e al rapido rimodellamento osseo (analogamente a quanto osservato nei pazienti giovani) (*Sandberg et al., 2003; Cleton-Jansen et al., 2005; Kansara et al., 2007*).

Fattore di rischio ben documentato è l'esposizione a radiazioni (*Fuchs et al., 2002; Huvos et al., 1985*). La stessa radioterapia è stata associata con lo sviluppo di osteosarcomi secondari: il rischio di sviluppare osteosarcoma radio-indotto aumenta all'aumentare della dose di radiazioni e al decrescere dell'età in cui il paziente viene trattato (*Hayden et al., 2006*).

1.6 ASPETTI GENETICI E MOLECOLARI

L'OS, a differenza di altri sarcomi come ad esempio il sarcoma di Ewing o il sarcoma sinoviale, non è caratterizzato da traslocazioni cromosomiche bilanciate specifiche, ma presenta un cariotipo complesso e sbilanciato. La maggior parte degli osteosarcomi (circa il 70%) è infatti caratterizzata da complesse anomalie cromosomiche, spesso con spiccata eterogeneità all'interno dello stesso tumore (*Sandberg et al., 2003; Hayden et al., 2006*).

Recentemente è stato proposto un possibile meccanismo alla base di questa elevata instabilità genetica: la cromotripsia, un evento catastrofico durante cui uno o più cromosomi vengono dapprima frammentati e poi riassemblati in modo aberrante (*Stephens et al., 2011; Szuhai et al., 2012*).

Un altro meccanismo che potrebbe essere legato alla severa instabilità cromosomica che caratterizza l'OS è la disfunzione telomerica. I telomeri sono delle strutture nucleoproteiche presenti nelle regioni terminali dei cromosomi che impediscono la fusione e la ricombinazione tra le estremità di diversi cromosomi e prevengono la perdita di materiale genetico durante la replicazione del DNA. Il progressivo accorciamento dei telomeri ad ogni ciclo replicativo della cellula è responsabile della senescenza, quando la lunghezza dei telomeri raggiunge una lunghezza critica le cellule smettono di dividersi. Le cellule tumorali sfuggono a questo processo mediante l'attivazione di due principali meccanismi che mantengono la lunghezza dei telomeri. Il primo coinvolge l'attivazione della telomerasi TERT, il secondo si basa sulla ricombinazione (ALT, Alternative Lengthening of Telomere) ed è associato ad una maggiore instabilità cromosomica. Circa la metà degli OS evadono la senescenza

mediante il meccanismo alternativo (ALT), associato appunto a una maggiore instabilità (*Sandberg et al., 2003; Marina et al., 2004; Cleton-Jansen et al., 2005; Hayden et al., 2006*).

Le anomalie citogenetiche riscontrabili nell'OS sono sia numeriche che strutturali e alcune di esse sono compatibili con le sindromi associate all'OS (*Marina et al., 2004; Hayden et al., 2006*). Tra le alterazioni più comunemente riscontrate troviamo: la duplicazione del cromosoma 1, la delezione dei cromosomi 9, 10, 13 e/o 17 (sul quale localizzano rispettivamente i geni RB1 e TP53), la delezione parziale o completa del braccio lungo del cromosoma 6 e l'amplificazione delle regioni cromosomiche 1q21-23, 17q e 12q13-15, mentre le anomalie strutturali più frequenti includono riarrangiamenti dei cromosomi 11, 19 e 20 (*Raymond et al., 2002; Sandberg et al., 2003; Marina et al., 2004*).

A livello molecolare, le vie di segnalazione più frequentemente compromesse nelle cellule di OS sono legate alla progressione del ciclo cellulare: le vie mediate da RB1 e da TP53 risultano funzionalmente inattivate nella maggior parte dei casi OS; in particolare, le mutazioni di TP53 sembrano essere più frequenti nei pazienti adulti, mentre le mutazioni di RB1 si osservano maggiormente nei pazienti più giovani (*Pellin et al., 1997; Sandberg et al., 2003; Marina et al., 2004; Kansara et al., 2007*).

Il gene oncosoppressore RB è un regolatore chiave del ciclo cellulare che risulta mutato in circa il 70% degli OS sporadici. La perdita di eterozigosi è molto più frequente rispetto ai riarrangiamenti strutturali o alle mutazioni puntiformi. In condizioni normali RB viene fosforilata dalla chinasi ciclina-dipendente 4 (CDK4) e rilascia il fattore di

trascrizione E2F che, a sua volta, si attiva promuovendo la transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare.

Un altro gene oncosoppressore apparentemente importante nella patogenesi dell'OS è TP53, un fattore di trascrizione con effetti pleiotropici coinvolto in diversi processi cellulari: progressione del ciclo cellulare, meccanismi di riparazione del DNA ed apoptosi, è coinvolto nella patogenesi di molti tipi di cancro. Alterazioni di TP53 si riscontrano in circa il 40-60% dei casi di OS sporadico, tutte risultanti nell'inattivazione della proteina: mutazioni puntiformi (20-30%), riarrangiamenti cromosomici (10-20%) e perdita di eterozigosi (70-80%) (*Sandberg et al., 2003; Marina et al., 2004*).

L'alterazione di queste vie di segnalazione può essere anche causata da mutazioni di geni codificanti per altre proteine coinvolte, diverse da RB e p53: in una piccola percentuale di casi di OS (circa il 5-10%), ad esempio, si è osservata l'amplificazione della regione cromosomica 12q13, in cui mappano sia il gene che codifica per CDK4 che il gene codificante per MDM2 (Mouse Double Minute 2), un regolatore negativo di p53; inoltre, il gene INK4A, deletato in circa il 10% degli OS, codifica per due proteine: p16^{INK4a}, un inibitore della chinasi CDK4, e p14^{ARF} (ARF, Alternative Reading Frame), un regolatore negativo di MDM2. Ciò conduce all'alterazione sia della via di segnalazione mediata da RB che di quella mediata da p53 (*Sandberg et al., 2003; Marina et al., 2004*).

Tra i geni frequentemente deregolati nelle cellule di OS figurano anche gli oncogeni MET e FOS, sovraespressi in più della metà dei casi, e meno frequentemente MYC, sovraespresso in meno del 15% dei casi (*Raymond et al., 2002*).

2. CD99

La molecola CD99 fu descritta per la prima volta nel 1979 da Levy e colleghi come un antigene, riconosciuto dall'anticorpo monoclonale 12E7, altamente espresso nei timociti corticali e nelle cellule di leucemia linfoblastica acuta, ma pressoché assente nei timociti midollari, nei linfociti del sangue periferico, nel midollo osseo e nelle cellule di leucemia mieloide acuta e cronica e di leucemia linfatica cronica (*Levy et al., 1979*).

Questa proteina è codificata dal gene MIC2, il primo gene pseudo-autosomico ad essere stato identificato (*Goodfellow et al., 1980; Goodfellow et al., 1983; Goodfellow et al., 1986; Smith et al., 1993*). Lungo circa 50 Kb, esso è composto da 10 esoni (tutti più piccoli rispetto alla media osservata nei geni di mammifero), è orientato verso il centromero e mappa nella regione pseudo-autosomica dei cromosomi sessuali (Xp22.3-Xpter e Yp11-Ypter). I geni MIC2X e MIC2Y sono strettamente correlati e i loro prodotti sono identici dal punto di vista biochimico (*Banting et al., 1985; Darling et al., 1986*). Inoltre il gene MIC2X non va incontro all'inattivazione del cromosoma X, mantenendo quindi un dosaggio genico funzionale identico per i loci MIC2 nei maschi e nelle femmine (*Goodfellow et al., 1984*).

Il prodotto del gene MIC2 non presenta nessuna omologia con proteine note, eccetto l'antigene eritrocitario Xg^a, con cui condivide il 48% di omologia di sequenza amminoacidica: i geni codificanti per queste due proteine sembrano derivare dalla duplicazione di un unico gene ancestrale (*Fouchet et al., 2000*). CD99 è una

glicoproteina di membrana con un peso molecolare di 32 KDa, composta da un dominio extracellulare di 100 residui amminoacidici altamente O-glicosilato (il peso molecolare dei soli zuccheri è di circa 14 KDa, quindi oltre il 40% del peso molecolare complessivo), un dominio idrofobico transmembrana di 25 residui e un dominio C-terminale idrofilico intracellulare di 38 amminoacidi (*Gelin et al., 1989; Aubrit et al., 1989*). L'analisi del segmento intracitoplasmatico rivela che la porzione citosolica del CD99 possiede una struttura a forcina ancorata alla membrana mediante due anse flessibili, priva quindi di regolari elementi di struttura secondaria; essa contiene inoltre una serina (Ser 168) appartenente a un sito di consenso per la proteina chinasi C (PKC) (*Alberti et al., 2002; Kim et al., 2004*).

Hahn e colleghi hanno individuato la presenza di due isoforme derivate da splicing alternativo. Una forma completa (Type I o wild type) di 185 aa, e una isoforma tronca della proteina (Type II o short) composta da 161 aa. Questa isoforma deriva da un trascritto che presenta un'inserzione di 18 bp subito prima di una sequenza CAG (sito accettore di splicing) tra il 3' dell'esone 8 e il 5' dell'esone 9, che risulta nell'unione di due ORF (Open Reading Frame) e nella comparsa di un codone di stop precoce. La sua porzione intracellulare è composta di soli 13 amminoacidi e manca dei siti putativi di fosforilazione in Ser 168 e Thr 181 (*Hahn et al., 1997*).

2.1 ESPRESSIONE NEI TESSUTI NORMALI E RUOLO FISIOLÓGICO

L'antigene CD99 è ubiquitariamente espresso nelle cellule normali. Da analisi immunostochimiche su diversi tessuti umani emerge che CD99 è espresso ad alti

livelli, oltre che nei timociti corticali, in un sottogruppo di linfociti presenti sia nei linfonodi che nel midollo osseo, nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni, nelle cellule pancreatiche delle isole del Langerhans, nelle cellule del Sertoli e di Leydig dei tubuli seminiferi dei testicoli, nelle cellule granulose dell'ovaio e nelle cellule ependimali del cervello e del midollo spinale (*Ambros et al., 1991*).

In particolare, da analisi citofluorimetriche, emerge che CD99 è espresso in tutte le linee leucocitarie presenti nel timo, midollo osseo e sangue periferico, e il suo grado di espressione varia secondo lo stadio differenziativo: una maggiore espressione è riscontrabile nelle cellule immature dei *lineage* linfocitari e granulocitari (*Dworzac et al., 1994*). Inoltre, Park e colleghi hanno dimostrato che nei linfonodi reattivi CD99 risulta altamente espresso nella zona corticale e paracorticale mentre è espresso a bassi livelli nei centri germinativi e nei seni linfatici, e che le cellule caratterizzate da elevata espressione di CD99 sono principalmente cellule T di memoria ($CD4^+ CD69^+ CD45RO^+$) e cellule B di memoria (IgG^+) (*Park et al., 1999*). È stato recentemente dimostrato che CD99 colocalizza con le molecole MHC di tipo I e di tipo II a livello delle sinapsi immunologiche, suggerendo quindi un coinvolgimento importante di questa proteina non solo durante il differenziamento emopoietico, ma anche nella risposta immunitaria (*Pata et al., 2011*).

Il ligando naturale di CD99 è ancora sconosciuto, pertanto per poter studiare gli effetti derivanti dalla sua stimolazione si ricorre all'uso di anticorpi monoclonali (mAbs): essi, infatti, agendo da potenti agonisti sono in grado di attivare la cascata di segnalazione a valle del CD99.

Nelle cellule T la molecola CD99 è chiaramente coinvolta nei processi di adesione ed apoptosi: la sua stimolazione con mAbs interferisce, infatti, con la formazione spontanea di rosette (*Bernard et al., 1988; Aubrit et al., 1989*) e induce l'esternalizzazione di fosfatidil-serina nei timociti e nelle cellule Jurkat, ma non nei linfociti T maturi (*Ausset et al., 1993*). Il trattamento con mAbs anti-CD99 induce aggregazione omotipica e apoptosi nelle cellule Jurkat e nei timociti CD4⁺ CD8⁺ (DP, Double Positive), una popolazione di timociti corticali che rappresenta uno stadio critico del differenziamento dei timociti, ma non nei timociti midollari CD4⁺ o CD8⁺ (SP, Single Positive) o in altre cellule T (*Bernard et al., 1995; Bernard et al., 1997*). In particolare, il processo apoptotico indotto dalla stimolazione di CD99 risulta essere Fas/CD95 indipendente e non è caratterizzato dalla frammentazione del DNA (*Bernard et al., 1997*). L'aggregazione omotipica indotta da CD99 nelle cellule T, da un punto di vista molecolare, è indipendente dalla via di segnalazione mediata da LFA-1 e ICAM-1, è strettamente associata alla riorganizzazione del citoscheletro di actina e dipende dal rilascio intracellulare di Ca⁺⁺ e dall'attivazione di MAPK chinasi, in particolare di ERK (*Kasinrerk et al., 2000; Hahn et al., 2000*).

Anche nelle cellule B la stimolazione di CD99 con mAbs induce aggregazione omotipica ma, diversamente da quanto osservato nelle cellule T, in queste cellule il processo di aggregazione è dipendente dalla via di segnalazione mediata da LFA-1/ICAM-1 (*Hahn et al., 1997*).

Da un punto di vista funzionale, nei linfociti T maturi presenti nel sangue periferico CD99 sembra agire da co-stimolatore nel processo di attivazione favorendo, una volta attivato insieme al recettore TCR, la proliferazione cellulare e l'espressione di

marcatori tipici dell'attivazione delle cellule T (*Waclavicek et al., 1998; Wingett et al., 1999*).

È stato anche dimostrato che la molecola CD99 influenza il processo di maturazione dei timociti favorendo l'interazione in membrana tra TCR e le molecole MHC, mediante modulazione del trafficking intracellulare: nei timociti corticali immaturi doppio positivi la stimolazione di CD99 induce un incremento nel trasporto delle molecole TCR ed MHC di classe I e II verso la membrana cellulare. Questo fenomeno risulta in una maggiore espressione a livello delle giunzioni cellulari di queste proteine che svolgono un ruolo cruciale nel processo di selezione positiva dei timociti immaturi, durante il quale i cloni che riconoscono il complesso MHC/Antigene vengono posti in condizione di proliferare, maturare e migrare in periferia (*Choi et al., 1998*). È stato altresì osservato che l'attivazione mediante mAbs della molecola MHC di classe II nei timociti è in grado di bloccare gli effetti indotti dalla stimolazione di CD99 (apoptosi, aggregazione omotipica e up-regolazione di TCR e MHC di classe I e II) e questo dato suggerisce che la maturazione dei timociti potrebbe essere il risultato di una fine regolazione da parte di CD99 ed MHC di classe II: quest'ultima antagonizzando l'effetto indotto dall'attivazione di CD99 sulle molecole di superficie prolungherebbe la sopravvivenza dei timociti immaturi (*Kim et al., 2003*).

Il coinvolgimento di CD99 nel trafficking cellulare è stato confermato da Yoon e colleghi, i quali hanno dimostrato che la stimolazione di CD99 in cellule Jurkat induce l'esportazione a livello della membrana plasmatica di diverse proteine (TCR, LFA-1, ICAM-1, CD5 e GM1) mediante un meccanismo che dipende strettamente dalla riorganizzazione del citoscheletro di actina (*Yoon et al., 2003*).

Da un punto di vista fisiologico quindi, CD99 potrebbe avere ruolo nei processi di maturazione e di attivazione dei linfociti T; in particolare, durante l'attivazione delle cellule T, CD99 agirebbe non solo come co-stimolatore ma anche come effettore, andando a modulare i processi di esocitosi ed endocitosi che caratterizzano l'attivazione delle cellule T; il fatto che CD99 risulti maggiormente espresso nelle cellule B e T di memoria supporta questa ipotesi: queste cellule infatti sono pronte ad esprimere le molecole effettrici stoccate nelle riserve intracellulari (endosomi o lisosomi secretori) (*Park et al., 1999; Yoon et al., 2003*).

La molecola CD99 sembra essere coinvolta anche nel processo di migrazione transendoteliale cui vanno incontro i monociti ed i neutrofili per raggiungere il sito di infiammazione. L'interazione omofilica tra le molecole di CD99 espresse sulla superficie delle cellule endoteliali dei vasi sanguigni e quelle espresse sulla superficie dei monociti e, in misura minore, dei neutrofili è fondamentale durante la diapedesi, ma non ha ruolo durante la fase precedente di adesione all'endotelio vascolare: il trattamento con mAbs anti-CD99 non altera infatti l'adesione all'endotelio, ma blocca la diapedesi (*Schenkel et al., 2002; Lou et al., 2007*). In modo analogo, CD99 sembra essere coinvolto nel processo di transmigrazione inversa, un processo simile alla diapedesi, attraverso cui le cellule dendritiche attivate migrano dal sito di infiammazione attraverso l'endotelio linfatico per raggiungere i linfonodi (*Torzicky et al., 2012*). Le informazioni riguardanti invece il ruolo fisiologico dell'isoforma tronca di CD99 (CD99 short) sono, al contrario, piuttosto limitate, soprattutto a causa della mancanza di anticorpi specifici che permettano di distinguere le due isoforme. Mediante analisi in RT-PCR su un ristretto pannello di tessuti normali, Hahn e colleghi

hanno dimostrato che l'isoforma completa (CD99 wild type) è espressa in maniera predominante, mentre l'isoforma tronca (CD99 short) è espressa in maniera cellula-specifica e sembra funzionare da dominante negativo (*Hahn et al., 1997*). A supporto di questa ipotesi, Alberti e colleghi hanno dimostrato che nei timociti l'espressione delle due isoforme è legata allo stadio differenziativo: i timociti doppio positivi esprimono entrambe le isoforme mentre i timociti maturi esprimono solo l'isoforma completa (*Alberti et al., 2002*).

2.2 CD99 E CANCRO

L'espressione del CD99 è riscontrabile in una ampia varietà di neoplasie, e il ruolo svolto da questa molecola risulta fortemente dipendente dal contesto cellulare.

Nei tumori emopoietici il CD99 è espresso ad alti livelli nelle cellule T nella leucemia linfoblastica acuta (T-ALL) e la valutazione della sua espressione può risultare utile nella valutazione della malattia minima residua nei pazienti affetti da T-ALL (*Levy et al., 1979; Dworzac et al., 2004*). Nei linfomi di Hodgkin l'antigene CD99 sembra essere scarsamente rappresentato (*Kim et al., 1998; Kim et al., 2000*), mentre è espresso nelle cellule di linfoma linfoblastico (*Kang et al., 2006*), nei linfomi anaplastici a cellule grandi (ALCL) (*Sung et al., 2005; Buxton et al., 2009*) e in meno del 40% dei casi di linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL); in questi ultimi l'espressione di CD99 sembra essere associata ad uno stadio più avanzato della malattia e ad altri marcatori prognostici sfavorevoli (*Lee et al., 2011*). Dworzac e colleghi hanno evidenziato come nelle leucemie linfoblastiche acute da precursori delle cellule B, il pattern di

espressione di CD99 osservato durante il normale differenziamento delle cellule B rimanga altamente conservato nonostante la trasformazione maligna (*Dworzac et al., 1999*). È stato inoltre recentemente dimostrato che nei pazienti affetti da mieloma multiplo un'elevata espressione di CD99 nelle cellule neoplastiche presenti nei campioni extramidollari correla con una prognosi migliore (*Shin et al., 2014*).

L'espressione di CD99 è stata riscontrata anche in tumori diversi da quelli di origine emopoietica: nel rhabdomyosarcoma embrionale (*Kovar et al., 1990; Ambros et al., 1991; Ramani et al., 1993*); nel sarcoma sinoviale (*Fisher, 1998*); nel tumore fibroso solitario (*Mentzel et al., 1997*) nel condrosarcoma mesenchimale (*Granter et al., 1996; Brown et al., 2003*) e nel carcinoma ovarico (*Cho et al., 2006*). Nei melanomi CD99 è espresso e sembra essere associato ad una maggiore malignità (*Wilkerson et al., 2006; King et al., 2007*). Nel carcinoma della mammella CD99 è espresso, ma secondo alcuni autori la sua espressione non ha valore prognostico (*Milanezi et al., 2001*). Diversi studi, tuttavia, hanno evidenziato che l'espressione dell'isoforma tronca di CD99 nelle cellule di carcinoma mammario promuove la migrazione cellulare e la capacità di adesione alla matrice extracellulare; inoltre CD99 short, mediante attivazione delle chinasi Src, Akt, ERK e JNK, è in grado di indurre un aumento dell'espressione e dell'attività di MMP-9 (Matrix Metallo Peptidase 9), molecola specificatamente correlata con il fenotipo metastatico e con l'aggressività del carcinoma mammario (*Kim et al., 2000; Lee et al., 2000; Byun et al., 2006*).

Nell'adenocarcinoma gastrico sembra che la perdita dell'espressione di CD99 sia associata al de-differenziamento delle cellule neoplastiche (*Jung et al., 2002*).

Nei tumori neuroendocrini gastrointestinali e polmonari l'espressione di CD99 è eterogenea e la percentuale di cellule positive sembra correlare in modo significativo con l'invasività del tumore e con la formazione di metastasi (*Pelosi et al., 2000*); mentre nei tumori neuroendocrini del pancreas (che sono gli unici tumori pancreatici che esprimono CD99) CD99 sembra poco espresso e una maggiore espressione di questa molecola correla con una prognosi migliore (*Maitra et al., 2003; Goto et al., 2004*).

Nell'ambito delle neoplasie che coinvolgono il sistema nervoso centrale e il cervello, CD99 è espresso negli ependimomi, negli astrocitomi e nei gliomi a livelli maggiori rispetto al tessuto sano, tuttavia non sembra avere valore prognostico (*Mahfouz et al., 2008; Ishizawa et al., 2008; Seol et al., 2012*). In particolare, Urias e colleghi hanno recentemente riportato che l'espressione di CD99 nelle cellule di astrocitoma è maggiore rispetto al tessuto normale e che essa aumenta all'aumentare del grado di malignità tumorale; in questo modello sembra che la molecola CD99 sia coinvolta nel processo di migrazione cellulare; tuttavia non si osserva nessuna correlazione con la prognosi (*Urias et al., 2014*).

Tra le varie neoplasie che esprimono CD99, il sarcoma di Ewing e i tumori neuroectodermici primitivi mostrano i livelli maggiori di espressione, tanto che la molecola CD99, insieme con la traslocazione cromosomica specifica che caratterizza questa famiglia di tumori t(11:22), è considerata un importante marcatore per la diagnosi differenziale di tali neoplasie (*Kovar et al., 1990; Ambros et al., 1991*).

Nei tumori della famiglia di Ewing (EFT) la stimolazione di CD99 con mAbs, analogamente a quanto osservato nei timociti immaturi, induce aggregazione omotipica e una massiva apoptosi, riducendo in tal modo sia la capacità di crescita in assenza di ancoraggio, sia la tumorigenicità negli esperimenti *in vivo* su modelli murini; il trattamento con mAb ha inoltre un effetto additivo quando usato *in vitro* in combinazione con doxorubicina e vincristina, chemioterapici d'elezione nel trattamento di questi tumori. Gli effetti a valle indotti dalla stimolazione di CD99 sono mediati da riarrangiamenti del citoscheletro e sembrano non coinvolgere l'attivazione di proteine chinasi (Shon *et al.*, 1998; Scotlandi *et al.*, 2000; Cerisano *et al.*, 2004). Ancora più recentemente è stato dimostrato che CD99 in questa neoplasia ha un ruolo chiaramente oncogenico ed è coinvolto nella progressione tumorale: Kreppel e colleghi hanno evidenziato, che l'elevata espressione di CD99 nelle cellule di sarcoma di Ewing promuove sia la capacità proliferativa che la capacità migratoria (Kreppel *et al.*, 2006), mentre il suo silenziamento non solo riduce la capacità tumorigenica e metastatica di queste cellule *in vitro* e *in vivo*, ma è accompagnata dall'induzione del differenziamento in senso neurale: l'ablazione di CD99 induce infatti la formazione di prolungamenti simili a neuriti e l'espressione di marcatori neurali terminali come il neurofilamento pesante (H-NF) e la β III-tubulina (Rocchi *et al.*, 2010). Per quanto concerne invece il ruolo dell'isoforma tronca nei tumori della famiglia di Ewing le informazioni sono molto limitate; sembra comunque che, analogamente a quanto osservato nei timociti, l'espressione dell'isoforma completa resti invariata mentre l'espressione di CD99 short si riduca progressivamente durante il differenziamento; è possibile quindi che questa isoforma agisca da regolatore negativo durante il

differenziamento in senso neurale, non solo nelle cellule neoplastiche, ma anche durante il normale sviluppo del sistema nervoso (*Lee et al., 2003*).

Nel linfoma di Hodgkin CD99 è scarsamente espresso, contrariamente a quanto accade nella controparte normale, cioè le cellule B immature; Kim e colleghi hanno dimostrato che la perdita dell'espressione di CD99, che può essere indotta a livello trascrizionale dalla EBV-LMP-1 (EpsteinBarr Virus – Latent Membrane Protein – 1), è un evento determinante nella generazione delle cellule tumorali giganti tipiche di questa neoplasia (cellule H-RS, Hodgkin-ReedStenberg) (*Kim et al., 1998; Kim et al., 2000*). Quindi, diversamente da quanto accade nelle cellule di sarcoma di Ewing, CD99 nel linfoma di Hodgkin ha ruolo oncosoppressore.

2.3 CD99 E OSTEOSARCOMA

Recenti evidenze sperimentali suggeriscono un ruolo della molecola CD99 nel processo di differenziamento osteoblastico: la trascrizione del gene MIC2 è regolata dal fattore di trascrizione CBFA-1 (RUNX2), cruciale nella regolazione del differenziamento osteoblastico (*Bertaux et al., 2005; Lian et al., 2004*); inoltre, l'espressione di CD99 è elevata in corrispondenza delle giunzioni cellulari degli osteoblasti maturi, mentre è più debole negli osteoblasti immaturi, caratterizzati da maggiore capacità proliferativa e migratoria (*Manara et al., 2006*). Diversamente da quanto osservato negli osteoblasti normali, nelle cellule di OS umano l'antigene CD99 è scarsamente espresso (*Bertaux et al., 2005; Manara et al., 2006; Scotlandi et al., 2007*); quindi, analogamente a quanto

osservato per le cellule di linfoma di Hodgkin, la perdita dell'espressione di CD99 potrebbe essere un evento importante durante la trasformazione maligna.

È stato dimostrato che nelle cellule di OS umano le due isoforme di CD99 svolgono funzioni opposte rispetto alla determinazione della malignità. In particolare, CD99 wt favorisce l'adesione alla matrice extracellulare e compromette *in vitro* la capacità migratoria e di crescita ancoraggio-indipendente e *in vivo* la capacità tumorigenica e metastatica. L'espressione ectopica di CD99 wt aumenta l'espressione della caveolina-1, normalmente poco espressa nelle cellule di OS umano, e riduce l'attività della chinasi cSrc: CD99 wt, caveolina-1 e cSrc colocalizzano a livello della membrana plasmatica e questi eventi molecolari sono necessari nella determinazione del fenotipo meno maligno indotto dall'espressione di CD99 wt. L'espressione dell'isoforma tronca, al contrario, riduce la capacità di aderire alla matrice extracellulare ed aumenta la capacità di crescita in assenza di ancoraggio, la capacità migratoria e, nel modello *in vivo*, il potenziale metastatico. CD99 sh, inoltre, non è in grado di up-regolare l'espressione della caveolina-1; pur essendo complessata con la chinasi cSrc, anziché inibirne l'attività la stimola conferendo in tal modo un fenotipo più aggressivo (Manara *et al.*, 2006; Scotlandi *et al.*, 2007).

Nonostante gli esigui livelli di espressione, l'analisi mediante RT-PCR, ha rivelato che nelle linee cellulari di OS umano, l'isoforma completa sembra essere espressa in maniera predominante. È stato inoltre osservato che l'espressione concomitante delle due isoforme in queste cellule tumorali induce effetti analoghi a quelli indotti dalla sola isoforma completa, indicando quindi che nell'attivazione della cascata di segnalazione che influenza la capacità invasiva e metastatica delle cellule di OS umano,

CD99 wild type prevale sull'isoforma tronca se il loro livello di espressione è simile
(*Scotlandi et al., 2007*).

SCOPO DELLA TESI

L'OS è una patologia molto aggressiva, caratterizzata da un decorso clinico estremamente rapido e da una spiccata tendenza a formare metastasi: circa il 10-20% dei pazienti, infatti, presenta metastasi evidenti alla diagnosi e circa il 30% dei pazienti affetti da OS localizzato sviluppa metastasi dopo il trattamento chemioterapico. La principale causa di morte è rappresentata da insufficienza respiratoria dovuta alla diffusione metastatica del tumore a livello polmonare. Risulta perciò di fondamentale importanza fare luce sui meccanismi alla base dei processi di diffusione metastatica delle cellule di OS, come la modulazione dei processi di adesione e di motilità cellulare.

È stato dimostrato che l'antigene di membrana CD99 risulta espresso a bassi livelli nell'OS. L'isoforma completa CD99 wt e l'isoforma tronca CD99 sh, che differisce per una delezione nel dominio intracitoplasmatico, sono state associate a due distinti esiti funzionali rispetto alla malignità tumorale. Il CD99 wt favorisce l'adesione alla matrice extracellulare e compromette *in vitro* la capacità migratoria e di crescita in condizioni di ancoraggio-indipendenza, e *in vivo* la capacità tumorigenica e metastatica; al contrario l'isoforma CD99 sh riduce la capacità di aderire alla matrice extracellulare ed aumenta la capacità di crescita in assenza di ancoraggio, la capacità migratoria e *in vivo* il potenziale metastatico. In questo studio, comparando cellule di OS caratterizzate da differenti capacità metastatiche e diversa espressione di CD99, è stata valutata la modulazione dei contatti cellula-cellula, la riorganizzazione del citoscheletro di actina e la modulazione delle vie di segnalazione a valle del CD99, al fine di identificare i meccanismi molecolari regolati da questa molecola e responsabili del comportamento migratorio e invasivo delle cellule di OS umano.

La dissezione dei meccanismi molecolari associati alle diverse proprietà indotte dalle due forme alternative del CD99 ha lo scopo di identificare nuovi bersagli terapeutici e opzioni di trattamento per una terapia che contrasti i processi di invasività e metastatizzazione.

MATERIALI

E METODI

1. COLTURE CELLULARI

Le linee cellulari di OS umano U-2 OS e Saos-2, di sarcoma di Ewing SKES-1 e di carcinoma del colon HCT8, sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). La linea di sarcoma di Ewing 6647 è stata gentilmente fornita da T.J. Triche (Children's Hospital, Los Angeles, CA); la linea di sarcoma di Ewing LAP-35 è stata ottenuta e caratterizzata presso i laboratori dell'Istituto Ortopedico Rizzoli (Bologna, Italia) e precedentemente descritta (*Benini et al., 1999; Scotlandi et al., 2003*).

I cloni derivanti dalla trasfezione stabile della linea U-2 OS e Saos-2 con la molecola CD99 (U-2/Pool Empty pcDNA3; U-2/CD99 wt57; U-2/CD99 wt136; U-2/CD99 sh51; U-2/CD99 sh95; U-2/CD99 wt TYR 30; U-2/CD99 wt TYR 31; U-2/CD99 wt SER 91; U-2/CD99 wt SER 96; Sa/CD99 wt66) sono stati generati in precedenza presso il Laboratorio di Oncologia sperimentale dell'Istituto Ortopedico Rizzoli (*Manara et al., 2006; Scotlandi et al., 2007*) mediante trasfezione con calcio fosfato (Calcium Phosphate Transfection System Kit, Invitrogen Life Technology) della linea parentale con plasmide pcDNA3 (Invitrogen Life Technology) contenente la sequenza codificante per il gene in esame, insieme a quello per la resistenza al farmaco di selezione.

Le cellule vengono coltivate in terreno Iscove modificato di Dulbecco (IMDM) (Lonza) supplementato con penicillina 20U/mL, streptomicina 100 µg/mL (Sigma) e 10% di siero fetale bovino inattivato mediante calore (FBS) (Lonza) e mantenute a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. I trasfettanti sono stati selezionati e coltivati in terreno addizionato con neomicina 500 µg/mL (Sigma) fino ad un massimo di otto passaggi *in vitro*.

Le cellule ogni 3 mesi vengono testate con MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza) per rilevare l'eventuale contaminazione da micoplasma. Inoltre, le linee cellulari sono state recentemente autenticate mediante analisi STR PCR impiegando i kit genRESVR MPX-2 e genRESVR MPX-3 (Serac).

2. ANALISI ULTRASTRUTTURALE

Prelievi da 5×10^6 di cellule, dopo due lavaggi in PBS 1X, sono stati fissati con gluteraldeide 2.5% in buffer cacodilato 0.1 M. Dopo la post-fissazione in osmio tetraossido 1% i campioni sono stati disidratati in etanolo e inclusi in araldite. Sottili sezioni sono state contrastate con acetato di uranile e piombo citrato ed esaminate con microscopio elettronico a trasmissione Philips 410 (Philips Research).

3. ANALISI MICROARRAY

Le ibridazioni comparative sono state eseguite su Human 1A (V2) Oligo Microarray Slides (Agilent Technologies) contenente 18716 sonde oligo. L'RNA totale è stato estratto in TRIzol (Invitrogen Life Technologies) e utilizzato per ottenere cRNA marcato, secondo le istruzioni del produttore (Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit, Agilent Technologies). I cRNA derivanti dai due cloni esperimenti CD99 wt (U-2 / CD99 wt57; U-2 / CD99 wt136) sono stati marcati con cianina 5-CTP (Cy5), mentre il cRNA derivante dalla linea parentale U-2OS è stato marcato con cianina 3 CTP (Cy3) e utilizzato come riferimento. Le immagini sono state ottenute utilizzando lo scanner GenePix 4000A (Axon Instruments) e il software GenePix PRO 3.0.

I dati filtrati sono stati analizzati mediante il software BRB-ArrayTools e normalizzati con la funzione di regressione lowess. Sono stati identificati i geni con espressione differenziale significativa mediante il software SAM (Significant Analysis of Microarrays) (tasso di falsi positivi del 3,8% utilizzato come soglia). Per l'analisi dei pathway di segnalazione differenzialmente coinvolti nei modelli cellulari confrontati è stata utilizzata la piattaforma GeneGo MetaCore (Thomson Reuters). I dati di microarray sono disponibili nel database Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) con il numero di accesso GSE39072.

4. SAGGIO DI LUCIFERASI

Le cellule sono state seminate in triplicato in piastra da 24 pozzetti. Dopo 24 ore sono state trasfettate mediante Lipofectamine 2000 Transfection Kit (Invitrogen Life Technologies) con il gene reporter sotto il controllo di TCF/LEF (promotore controllato dalla β -catenina), il controllo positivo o il controllo negativo (Signal Reporter Assay Kit, Qiagen) e dopo 4 ore è stato aggiunto cloruro di litio (40 mM). Il saggio di luciferasi (Dual Glo Luciferase Assay System, Promega) è stato eseguito 24 ore dopo la trasfezione secondo le istruzioni del produttore; l'attività della luciferasi è stata misurata usando il GloMax Multi Detection System (Promega). Il rapporto firefly/renilla è stato calcolato ed ogni campione è stato normalizzato rispetto al suo controllo negativo. La linea cellulare di carcinoma del colon HCT8, in cui la via canonica di Wnt è costitutivamente attiva, è stata usata come controllo positivo (*Rivat et al., 2004*).

5. TRATTAMENTI

L'inibitore specifico per ROCK2 N-(2-(2-(dimethylamino)ethoxy)-4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-2,3dihydrobenzo[b]1,4 dioxine-2-carboxamide (Stemolecule ROCK2 Inhibitor, Stemgent) e il pan-inibitore Y27632 (Calbiochem) sono stati impiegati ad una concentrazione finale di 10 μ M e incubati over-night a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Negli esperimenti di valutazione della dose-dipendenza, entrambi gli inibitori sono stati usati alle concentrazioni di 2 μ M, 10 μ M e 50 μ M e incubati per 24h, 48h e 72h.

L'inibitore di cSrc Herbimycin-A (Calbiochem) è stato impiegato ad una concentrazione finale di 2 μ M e incubato over-night a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

6. TRASFEZIONI TRANSIENTI

Per il silenziamento transiente di ROCK2 le cellule sono state trasfettate 24h dopo la semina con un pool di sequenze siRNA dirette contro ROCK2 (ON-TARGETplus SMARTpool, Human ROCK2, Dharmacon) o contro sequenze irrilevanti (ON-TARGETplus Non-targeting siRNA, Dharmacon) mediante Lipofectamine 2000 Transfection Kit (Invitrogen Life Technologies). Per la riespressione di ROCK2 le cellule sono state trasfettate 24h dopo la semina con il vettore di espressione pCMV5-HA3-ROCK2 (Zhang *et al.*, 2009) mediante calcio fosfato (Calcium Phosphate Transfection System Kit, Invitrogen Life Technologies). 48h dopo la trasfezione sono stati eseguiti i test funzionali.

7. SAGGIO DI AGGREGAZIONE OMOTIPICA

Prelievi da 2×10^6 di cellule sono stati risospesi in 200 μ l di IMDM 10% FBS e incubati per 30 minuti a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati risospesi una sola volta con una Gilson P1000 puntata a 200 μ l e contati in triplicato valutando, per ogni conta, il numero di cellule singole ed i gruppetti di 2-3 elementi (singole, doppie e triple).

8. VALUTAZIONE DELLA MIGRAZIONE CELLULARE: WOUND

ASSAY

Le cellule sono state seminate in petri da 60mm e, una volta raggiunta la confluenza, con uno scraper sterile è stato operato un graffio sulla superficie della petri. Le petri sono state così monitorate e fotografate a diversi intervalli di tempo.

9. VALUTAZIONE DELLA MIGRAZIONE CELLULARE: MOTILITY

ASSAY

Prelievi da 1×10^5 di cellule sono stati risospesi in 100 μ L di IMDM 10% FBS, in presenza o meno dei trattamenti farmacologici, e seminati nei compartimenti superiori di piastre Transwell Chambers (Corning Costar) con inserti di 6.5 mm di diametro e membrana di policarbonato con pori di 8 μ m. Nei compartimenti inferiori delle piastre è stato aggiunto IMDM 10% FBS. Dopo un'incubazione over-night a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ è stato rimosso il compartimento superiore. Le cellule migrate sono state fissate 4 ore dopo in metanolo 100% per 10 minuti a temperatura

ambiente, colorate con Giemsa 1:10 (in H₂O) (Sigma) per 20 minuti a temperatura ambiente e contate.

10. VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ DI CRESCITA ANCORAGGIO-INDIPENDENTE

Sospensioni cellulari da 1000 e da 3300 cellule sono state seminate in petri da 60 mm, in terreno semi-solido (IMDM al 10% FBS con 0.33% di soft agar (Sigma) in presenza o meno dei trattamenti farmacologici). Le petri sono state mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Dopo almeno 7 giorni dalla semina le colonie formate sono state contate.

11. VALUTAZIONE DEL CICLO CELLULARE

Le cellule sono state incubate con bromodesossipuridina (Sigma) alla concentrazione finale di 10 µM per 1 ora a 37 °C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Prelievi da almeno 5x10⁵ di cellule sono quindi stati fissati in etanolo 70% per 30 minuti in ghiaccio e lavati in PBS 1X - BSA 1% - Tween-20 0.5% (PAT). I campioni sono stati incubati con HCl 2N - Triton X 0.5% per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente con sodio tetraborato 0.1 M pH 8.5 per 5 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati successivamente incubati con l'anticorpo anti-BrdU (Becton Dickinson) (1:4 in PAT) per 30 minuti a temperatura ambiente e quindi con l'anticorpo secondario anti-mouse-FITC (Thermoscientific) (1:100 in PAT) per altri 30 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati risospesi in ioduro di propidio

(PI) 20 µg/ml (in PAT), incubati over-night a +4°C e analizzati mediante citometria a flusso (FACSCalibur, Becton Dickinson).

12. VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI

Prelievi da 5×10^5 di cellule sono stati incubati per 15 minuti a temperatura ambiente con 100 µl di Annexin-V-FLUOS Staining Kit (MBL, Medical and Biological Laboratories), preparato secondo le istruzioni del produttore. I campioni sono quindi stati risospesi nel buffer fornito dal kit ed analizzati mediante citometria a flusso (FACSCalibur, Becton Dickinson).

13. IMMUNOFLUORESCENZA SU CELLULE IN SOSPENSIONE

Due prelievi da 5×10^5 di cellule sono stati effettuati per ciascuna linea cellulare a partire da fiaschine sub-confluenti. Dopo un lavaggio in PBS 1X, i campioni sono stati risospesi con l'anticorpo primario anti-CD99 (O13, Signet) (1:80 in PBS 1X), mentre i controlli negativi sono stati risospesi in un uguale volume PBS 1X. Dopo 30 minuti in ghiaccio è stato effettuato un lavaggio in IMDM senza siero per bloccare la reazione e si è quindi proceduto all'incubazione dei campioni e dei controlli negativi con l'anticorpo secondario anti-mouse fluorescinato (Thermoscientific) (1:100 in PBS 1X) 30 minuti in ghiaccio. Dopo un lavaggio in IMDM senza siero i campioni sono stati risospesi in bromuro di etidio 1 µg/ml in PBS 1X e analizzati mediante citometria a flusso (FACSCalibur, Becton Dickinson).

14. IMMUNOFLUORESCENZA SU CELLULE IN ADERENZA

Le cellule sono state seminate in piastre contenenti vetrini coprioggetto sterili e dopo 48h sono state fissate in metanolo 100% oppure in paraformaldeide 4% (Sigma) per 10 minuti a temperatura ambiente. Le cellule fissate sono state quindi permeabilizzate con PBS 1X - Triton X 0.15% (Sigma) per 5 minuti a temperatura ambiente e i vetrini sono stati incubati prima con PBS 1X - BSA 4% (Sigma) per 1 ora a temperatura ambiente, al fine di bloccare i legami aspecifici, e poi in camera umida over-night a +4°C con i seguenti anticorpi primari diluiti in PBS 1X: anti- β -catenina (Santa Cruz Biotechnology) (1:50), anti-N-caderina (BD Transduction Labs) (1:100), anti-ARP2 (Santa Cruz Biotechnology) (1:25), anti-ezrina (Sigma)(1:200), anti-ROCK2 (Santa Cruz Biotechnology) (1:50).

I vetri sono quindi stati incubati in camera umida e al buio per 1 ora a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi secondari diluiti in PBS 1X: goat anti-mouse FITC (Pierce Biotechnology), (1:100), donkey anti-goat IgG NL493 (FITC equivalente) (R&D Systems) (1:50).

La colorazione del citoscheletro di actina è stata effettuata incubando i vetrini per 30 minuti a temperatura ambiente con PE-conjugated phalloidin (5 U/ml in PBS 1X - BSA 4%) (Sigma).

I nuclei sono stati colorati con Hoechst 33256 (Sigma) (1:100 in PBS 1X - Glicerolo 50%).

Le cellule sono quindi state osservate con il microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse 90i (Nikon Corp.) con un obiettivo 60x ad immersione.

15. WESTERN BLOT

Le cellule, una volta raccolte sono state lavate in PBS 1X e lisate per 30 minuti in ghiaccio con buffer Upstate per fosfo-proteine (Tris HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, NP-40 1%, Na-Deossicolato 0.25%, EGTA 1 mM, NaF 1 mM) a cui sono stati aggiunti gli inibitori di proteasi: PMSF 1mM, sodio ortovanadato 0.2 mM, aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 0.1 mM, phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma). La quantificazione dei lisati proteici è eseguita mediante Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) e lettura allo spettrofotometro (DU 730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer, Beckman Coulter) ($\lambda = 595 \text{ nm}$). 40 µg di proteine sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 10% di SDS e, dopo la corsa elettroforetica, trasferiti su membrane di nitrocellulosa. Il corretto trasferimento delle proteine è stato valutato mediante colorazione con Red Ponceau (Sigma) della membrana, che è stata poi incubata per 1 h con una soluzione TBST 1X (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM e Tween-20 0.1%) al 5% di non-fat dry milk (Bio-Rad Laboratories) per saturare i siti di legame aspecifici. Le membrane sono state incubate over-night a +4°C con i seguenti anticorpi primari diluiti in TBST 1X - non-fat dry milk 5% (Bio-Rad Laboratories): anti-CD99 (12E7, DAKO) (1:10000); anti-N-caderina (BD Transduction Labs) (1:2000); anti- β -catenina (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000); anti-ROCK2 (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000); anti-ROCK1 (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000); anti-ARP2 (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000); anti-ezrina (Sigma) (1:5000); anti-ezrin-raxdyin-moesin (Chemicon International) (1:1000); anti-fosfo-ezrina (Y576) (Sigma) (1:2000). Dopo una serie di lavaggi in TBST 1X, le membrane sono state incubate con i seguenti anticorpi secondari coniugati all'enzima perossidasi di rafano (HRP) diluiti in TBST 1X - non-fat dry milk 5%

(Bio-Rad Laboratories): anti-rabbit (GE Healthcare), anti-mouse (GE Healthcare) o anti-goat (Santa Cruz Biotechnology). Per la rilevazione del segnale, la membrana è stata incubata per 5 minuti a temperatura ambiente con ECL (Enhanced Chemio Luminescence) (EuroClone) ed esposta ad una lastra fotografica. Il controllo di caricamento dei lisati proteici è stato effettuato reincubando le membrane, dopo ripetuti lavaggi in TBST 1X, con anticorpo anti-actina (Chemicon International) (1:100000).

16. IMMUNOPRECIPITAZIONE

Le cellule, una volta raccolte sono state lavate in PBS 1X e lisate per 30 minuti in ghiaccio con buffer RIPA per proteine totali (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, EDTA 5 mM, Na-Deossicolato 1%, SDS 0.1%) a cui sono stati aggiunti gli inibitori di proteasi: PMSF 1 mM, sodio ortovanadato 0.2 mM, aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 0.1 mM, phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma). 500 µg di proteine sono stati incubati con 1,5 µg di anticorpo anti-CD99 (12E7, DAKO) a +4°C over-night in agitazione rotatoria; successivamente i campioni sono stati incubati con 40µl di protein G/A (Calbiochem) per 1 ora a temperatura ambiente in agitazione rotatoria. Dopo ripetuti lavaggi in RIPA buffer, i pellet sono stati risospesi in sample buffer 2X (Bio-Rad Laboratories), bolliti e analizzati mediante western blot.

17. VALUTAZIONE IN REAL TIME PCR DELL'ESPRESSIONE DI EZRINA

L'analisi in Real Time PCR è stata eseguita con CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) impiegando SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories) e le seguenti coppie di primer: Ezrina 5'-CGAAACCAATCAATGTCCG-3'; 3'-CTATTCTTCCACAGACGGG-5'; Tata Binding Protein (TBP) 5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'; 3'-ACCACCCCTCGACTACAC-5'; Hydroxymethylbilane synthase (HMBS) 5'-ACGTGTCCCCGGTACTCGCCG-3'; 3'-CACTAACGCACCCATGGG-5'. La presenza di prodotti aspecifici nelle reazioni di amplificazione è stata controllata mediante l'analisi della curva di dissociazione ed elettroforesi su gel di agarosio. I valori di espressione genica normalizzati ($\Delta\Delta Ct$) sono stati calcolati dal software CFX Manager (Bio-Rad Laboratories).

18. VALUTAZIONE IN REAL TIME PCR DELL'ESPRESSIONE DEL MicroRNA-138

L'RNA totale è stato estratto in TRIzol (Invitrogen Life Technologies), secondo le istruzioni del produttore, e retrotrascritto usando TaqMan MicroRNA Assay Kit e TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), secondo le istruzioni del produttore. L'analisi in Real Time PCR del microRNA-138 è stata quindi eseguita con ViiA7 Real Time PCR System (Applied Biosystems) usando il TaqMan MicroRNA Assay Kit e TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), secondo le istruzioni del produttore. I valori di espressione genica normalizzati ($\Delta\Delta Ct$)

sono stati calcolati usando come controllo endogeno lo small nuclear RNA (snRNA) RNU6B.

19. SILENZIAMENTO STABILE DI ROCK2 NELLE U-2 OS

Le sequenze oligonucleotidiche codificanti per lo small hairpin RNA diretto contro ROCK2 (sh-ROCK2-Fw: 5'- GATCC CGGCAACTGGCTCGTTCAATT TTCAAGAGA TTAAGTGGCTCGGTCAACG TTTTTT GGAAA -3'; sh-ROCK2-Rw: 5' – AGCTTTTCCAAAAA CGTTGACCGAGCAAGTTAA TCTCTTGAA AATTGAACGAGCCAGTTGC CGG-3') sono state clonate all'interno del vettore di espressione p-Silencer 2.1-U6 neo (Ambion Life Technology) secondo le istruzioni del produttore. La linea cellulare U-2 OS è stata trasfettata mediante calcio fosfato (Calcium Phosphate Transfection System Kit, Invitrogen Life Technologies) e posta in terreno addizionato con neomicina 500 µg/mL (Sigma) per la selezione. Per la linea trasfettata con il vettore di controllo, fornito dal kit, è stato selezionato un pool di cloni (U-2/SCR pool), mentre per la linea trasfettata con il vettore contenente shROCK2 singoli cloni sono stati selezionati e screenati mediante western blot e immunofluorescenza in aderenza, per verificare il silenziamento della chinasi. I due cloni migliori, U-2/shROCK2 #46 e U-2/shROCK2 #78, sono quindi stati impiegati nei successivi esperimenti.

20. ESPERIMENTO IN VIVO

Prelievi da 10^7 di cellule, risospese in PBS 1X, sono state iniettate sottocute in topi femmine NSG (NOD-SCID-gamma) (Charles Rivers), 6 topi per ciascuna linea cellulare

testata. L'emivolume del tumore è stato misurato ogni settimana (*Scotlandi et al., 2005*). Dopo 10 settimane, i topi sono stati sacrificati e sottoposti all'esame necroscopico. Gli esperimenti sono stati autorizzati dal comitato etico di Bologna, seguendo le norme di utilizzo degli animali italiane ed europee.

RISULTATI

1. CD99 MODULA L'ESPRESSIONE DI MOLECOLE COINVOLTE NEI PROCESSI DI ADESIONE E DI MIGRAZIONE CELLULARE

1.1 IL CD99 wt RAFFORZA L'ADESIONE CELLULA-CELLULA E FAVORISCE IL RECLUTAMENTO NELLA MEMBRANA PLASMATICA DI β - CATENINA E DI N-CADERINA

L'analisi ultrastrutturale mediante microscopia elettronica a trasmissione di linee di OS umano U-2 OS trasfettate con CD99 wt (U-2/CD99 wt) mostra la formazione di rudimentali giunzioni aderenti (Figura 1A) nelle cellule che esprimono l'isoforma CD99 wt rispetto alla linea parentale.

Alla luce di questa osservazione è stato valutato, mediante western blot, il livello di espressione di β -catenina ed N-caderina, due molecole note per essere coinvolte nelle interazioni cellula-cellula e che risultano espresse negli osteoblasti normali, ma down-regolate nelle cellule di OS umano (*Cheng et al., 1998; Kashima et al., 1999*).

In accordo con i risultati dell'analisi ultrastrutturale, nelle cellule in cui è forzata l'espressione della forma CD99 wt si osserva un aumento dell'espressione di β -catenina e di N-caderina, sia rispetto alla linea parentale U-2 OS che alle cellule che esprimono la forma tronca CD99 sh (Figura 1B). La valutazione mediante immunofluorescenza della localizzazione cellulare di β -catenina e di N-caderina, estesa anche al modello Saos-2, rivela inoltre che CD99 wt favorisce il reclutamento a livello della membrana plasmatica di entrambe queste proteine, mentre nelle cellule in cui è

forzata l'espressione dell'isoforma CD99 sh, β -catenina ed N-caderina scompaiono completamente dalla membrana cellulare (Figura 1C), in accordo con la più elevata capacità migratoria che caratterizza i cloni U-2/CD99 sh (Figura 1E).

La β -catenina, oltre a svolgere un ruolo importante nella formazione delle giunzioni intercellulari, rappresenta il principale mediatore della via di segnalazione canonica di Wnt: l'attivazione di questo pathway induce il disassemblaggio del complesso multiproteico al quale si trova associata la β -catenina e che è responsabile della sua degradazione; ciò causa un accumulo nel citosol di β -catenina che, quindi, trasloca nel nucleo dove, in associazione con i fattori di trascrizione della famiglia TCF/LEF, promuove la trascrizione di geni specifici.

Considerando quindi il ruolo della β -catenina come attivatore trascrizionale della via di Wnt, abbiamo cercato di valutare, nel modello U-2 OS, se la capacità del CD99 wt di modulare l'espressione di questa proteina potesse influenzare lo stato di attivazione del pathway di Wnt: le immagini in fluorescenza mostrano che la β -catenina, indipendentemente dal suo livello di espressione, non localizza mai a livello nucleare (Figura 1C, pannello superiore). Questo risultato, che suggerisce quindi che la via di segnalazione canonica di Wnt nella linea U-2 OS sia inattiva, è stato confermato tramite saggio di luciferasi. I risultati mostrano che nelle cellule di OS, indipendentemente dall'espressione di CD99, la via canonica di Wnt è sostanzialmente inattiva, sebbene funzionale: il trattamento con cloruro di litio (noto attivatore della via di Wnt) è infatti in grado di indurre un significativo aumento della trascrizione mediata da TCF/LEF in tutte le linee saggiate (Figura 1D).

Alle diverse capacità di migrazione espresse dalla linea parentale e dai cloni trasfettati, si associa anche una diversa organizzazione del citoscheletro di actina, come mostrano le immagini ottenute mediante immunofluorescenza: l'espressione dell'isoforma completa di CD99 riduce la motilità cellulare e induce la marcata formazione di fibre da stress, mentre l'espressione dell'isoforma tronca promuove la migrazione cellulare e il disassemblaggio delle fibre del citoscheletro di actina (Figura 1, pannello E ed F).

1.2 IL CD99 wt SOPPRIME ROCK2 E ARP2

Per determinare le basi molecolari della funzione del CD99 nell'OS, sono stati comparati i profili di espressione genica di cellule di OS trasfettate con CD99 wt rispetto alle linee parentali. L'analisi, effettuata utilizzando la piattaforma GeneGo MetaCore, ha permesso di identificare diverse vie di segnalazione modulate da CD99. Il pathway modulato con più alta significatività è quello denominato "Cytoskeleton Remodeling_TGF, WNT and cytoskeletal remodeling" (Figura 2A). Tra i numerosi geni appartenenti a questo pathway, elencati nella Tabella 1, abbiamo focalizzato l'attenzione su actin-related protein 2 homologue (yeast) (ACTR2, chiamato anche ARP2), actin-related protein 2/3 complex, subunit 1A (ARPC1A) e Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2 (ROCK2).

Questi geni, che risultano essere down-regolati dall'espressione di CD99 wt, sono infatti protagonisti chiave dei processi di rimodellamento del citoscheletro di actina durante la migrazione cellulare: ARP2 e ARPC1A codificano per due delle sette subunità che formano il complesso ARP2/3, un fattore di nucleazione dell'actina

essenziale per la protrusione dei lamellipodi e la motilità cellulare, mentre ROCK2 codifica per una serina/treonina chinasi che regola la formazione delle fibre da stress delle adesioni focali e la contrattilità cellulare basata sull'attività della miosina.

La down-regolazione di ARP2 e ROCK2 che si osserva a livello trascrizionale nelle cellule che esprimono la forma CD99 wt è stata confermata mediante tecniche di western blot e di immunofluorescenza anche a livello di prodotto proteico: nelle linee U-2/CD99 wt e Sa/CD99 wt, caratterizzate da una ridotta capacità di migrazione, si osserva infatti una significativa diminuzione nei livelli proteici di ROCK2 e di ARP2 (Figura 2, pannello B, C, D ed E) .

ARP2, inoltre, nelle linee parentali e in quelle trasfettate con CD99 sh, caratterizzate da elevata capacità migratoria, oltre ad essere altamente espresso, risulta avere una distribuzione polarizzata all'interno del citosol, in accordo con la sua funzione di fattore di nucleazione dell'actina (Figura 2, pannello C ed E).

1.3 IL CD99 wt SOPPRIME L'EZRINA

Diversi studi evidenziano una correlazione tra la prognosi e l'espressione di ezrina nelle cellule di OS: un elevato grado di espressione di questa molecola correla con una peggiore prognosi e con una maggiore tendenza alla formazione di metastasi polmonari (*Khanna et al., 2004; Kim et al., 2009; Bulut et al., 2012*). L'ezrina, membro della famiglia ezrin/radixin/moesin, connette il citoscheletro di actina alla membrana plasmatica ed ha un ruolo cruciale nei processi di migrazione cellulare; la sua forma attiva è fosforilata nel residuo Thr 567 e localizza a livello della membrana plasmatica.

La fosforilazione del residuo Thr 567 può essere mediata da diverse chinasi, tra cui ROCK2. Considerando quindi che la riespressione del CD99 wt nelle cellule di OS umano influenza la loro capacità migratoria e altera l'espressione della chinasi ROCK2, è stata valutata l'espressione e la localizzazione dell'eZRina nelle linee U-2 OS e Saos-2.

L'analisi mediante western blot evidenzia una riduzione dei livelli di eZRina e della sua forma fosforilata nelle cellule che esprimono CD99 wt rispetto alle linee parentali e alle linee trasfettate con CD99 sh, sia nel modello U-2 OS che nel modello Saos-2 (Figura 3A). Questa diminuzione interessa la quantità della proteina, ma non il suo trascritto, come mostrano i risultati dell'analisi di espressione genica condotta mediante Real Time PCR (Figura 3B). Le immagini ottenute mediante immunofluorescenza su cellule in aderenza mostrano che, sia nelle linee parentali ma ancora di più nei cloni U-2/CD99 sh, l'eZRina localizza principalmente a livello della membrana plasmatica, suggerendo che in tali cellule, altamente migranti, questa proteina sia presente nella sua forma attiva (Figura 3C).

1.4 CD99 NON INTERAGISCE DIRETTAMENTE CON LE PROTEINE DI MEMBRANA CHE REGOLA

I risultati finora ottenuti suggeriscono che il ruolo oncosoppressivo di CD99 nelle cellule di OS umano si espliciti mediante modulazione di molecole chiave dei processi di adesione e di motilità cellulare, quali N-caderina, β -catenina ed eZRina.

Per determinare se ci sia un'associazione diretta tra CD99 e queste molecole è stata valutata, tramite esperimenti di co-immunoprecipitazione utilizzando un anticorpo anti-CD99, la presenza di eventuali interazioni proteina-proteina. La successiva analisi mediante western blot dimostra che né l'isoforma completa né quella tronca di CD99 si trovano associate alla β -catenina, alla N-caderina e all'ezzrina (Figura 4), Questo risultato quindi depone a favore dell'esistenza, da parte di CD99, di un meccanismo di regolazione di tipo indiretto.

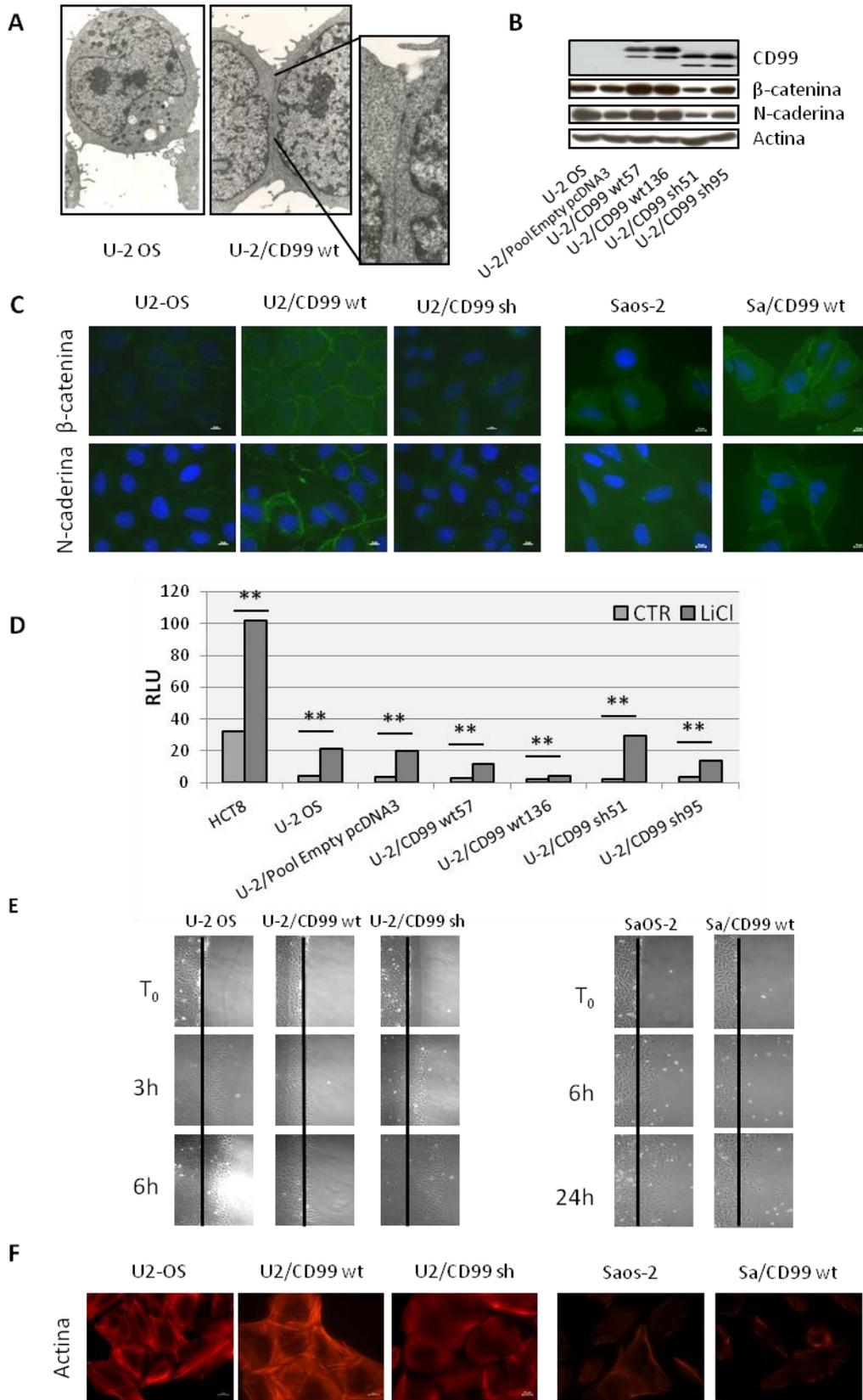


FIGURA 1. CD99 wt rafforza l'adesione cellula-cellula e favorisce il reclutamento nella membrana plasmatica di β -catenina e di N-caderina. (A) Analisi ultrastrutturale delle cellule U-2 OS e U-2/CD99 wt (ingrandimento 11'500 X). Nell'ingrandimento si apprezza la formazione di rudimentali giunzioni aderenti nelle cellule esprimenti CD99 wt (ingrandimento 22'000 X). **(B)** Valutazione in western blot sulla linea cellulare U-2 OS e sui cloni derivati, di CD99, β -catenina ed N-caderina; l'actina è stata usata come controllo di caricamento. **(C)** Valutazione in immunofluorescenza sulle linee cellulari U-2 OS e Saos-2 e sui cloni derivati, di β -catenina ed N-caderina (ingrandimento 60 X). **(D)** Valutazione dell'attività della via canonica di Wnt mediante saggio di luciferasi sulla linea cellulare U-2 OS e sui cloni derivati in presenza o meno di cloruro di litio 40 mM. La linea di carcinoma del colon HCT8 è stata usata come controllo positivo. Per ciascun campione il rapporto Firefly/Renilla, normalizzato sul rispettivo controllo negativo, è mostrato come Relative Luciferase Unit (RLU). Nel grafico sono mostrate la media \pm ES di almeno due esperimenti diversi. La significatività è calcolata mediante test T student per dati appaiati (** P value < 0.001). **(E)** Valutazione della migrazione cellulare mediante wound assay sulle linee cellulari U-2 OS, Saos-2 e sui cloni derivati (ingrandimento 10X). **(F)** Immunofluorescenza con colorazione del citoscheletro di actina mediante falloidina rodaminata (ingrandimento 60 X).

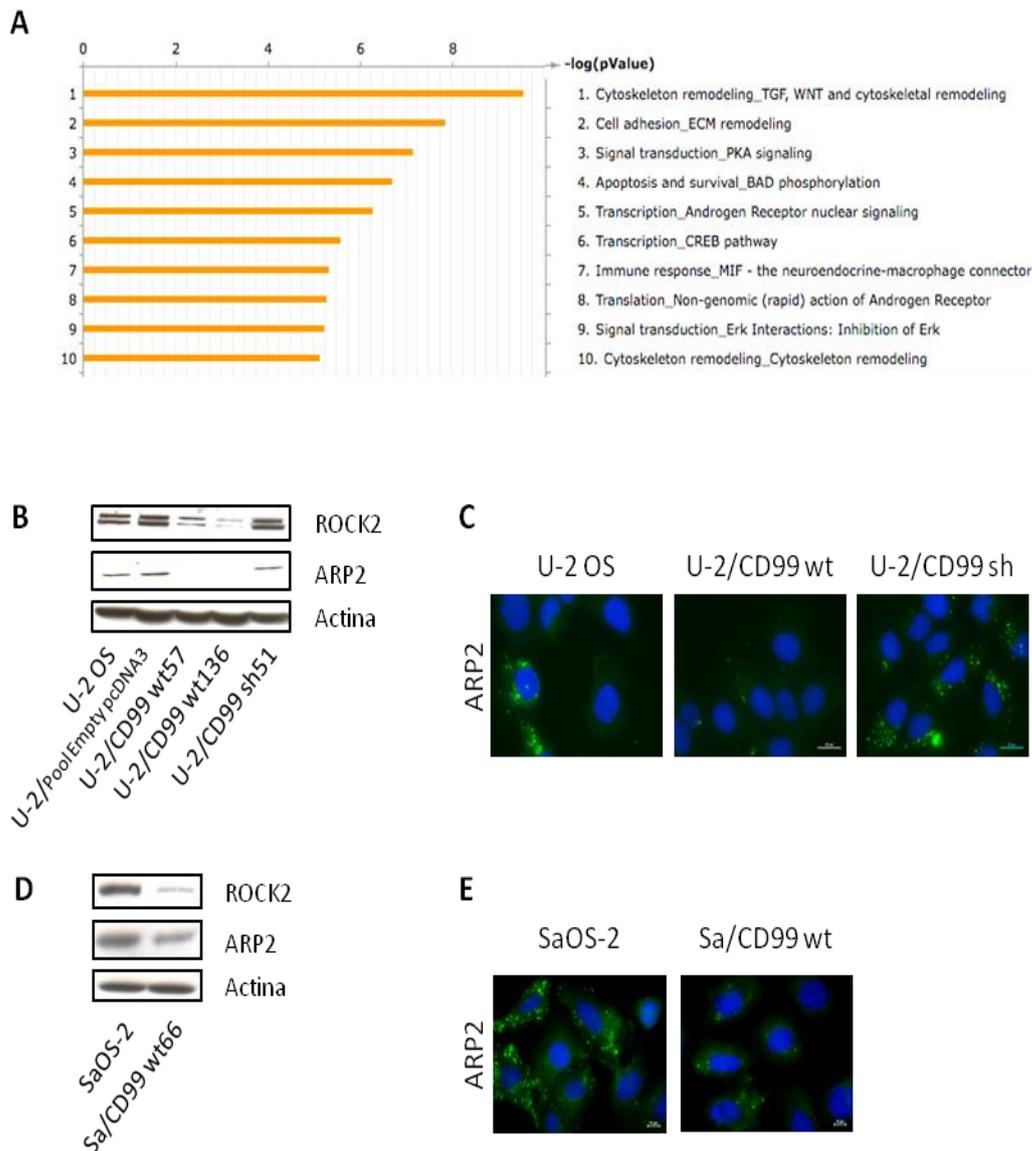


FIGURA 2. CD99 wt sopprime ROCK2 e ARP2. (A) Il confronto dei profili di espressione genica dei trasfettanti U-2/CD99 wt rispetto alla linea parentale U-2 OS e l'analisi GeneGo MetaCore identifica una serie di vie di segnalazione modulate da CD99 wt. La via modulata con maggiore significatività è "Cytoskeleton Remodeling_TGF, WNT and cytoskeletal remodeling". Le barre rappresentano il logaritmo inverso del p value. **(B)** Valutazione in western blot sulla linea cellulare U2 OS e sui cloni derivatidi ARP2 e di ROCK2, l'actina è stata usata come controllo di caricamento. **(C)** Valutazione in immunofluorescenza sulla linea cellulare U2 OS e sui cloni derivati di ARP2 (ingrandimento 60 X). **(D)** Valutazione in western blot sulla linea cellulare Saos-2 e sui cloni derivati di ARP2 e di ROCK2, l'actina è stata usata come controllo di caricamento.

(E) Valutazione in immunofluorescenza sulla linea cellulare Saos-2 e sui cloni derivati di ARP2 (ingrandimento 60 X).

Symbol	Name	Log Ratio
ACTR2	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	-0.74
PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isozyme	-0.69
DVL2	dishevelled, dsh homolog 2 (Drosophila)	-0.64
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	-0.58
ROCK2	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2	-0.56
AXIN1	axin 1	-0.54
WNT6	wingless-type MMTV integration site family, member 6	-0.52
PPP1CA	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isozyme	-0.52
ARPC1A	actin related protein 2/3 complex, subunit 1A, 41kDa	-0.47
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	-0.45
CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	-0.44
MAP3K11	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	-0.40
PIK3CA	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	-0.39
AXIN2	axin 2	-0.37
WNT3	wingless-type MMTV integration site family, member 3	-0.36
FOXO3	forkhead box O3	-0.34
MYLPF	myosin regulatory light chain 2	-0.33
MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13	0.27
WNT11	wingless-type MMTV integration site family, member 11	0.31
VCL	vinculin	0.35
PLG	plasminogen (isoform1)	0.47
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	0.47
ACTC1	actin, alpha, cardiac muscle 1	0.48
CSNK2B	casein kinase 2, beta polypeptide	0.49
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	0.50
PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor (isoform 1)	0.50
PPP1R12B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B	0.54
ACTN2	actinin, alpha 2	0.56
SMAD3	SMAD family member 3(isoform 1)	0.67
PLAU	plasminogen activator, urokinase (isoform 1)	0.77
MAP2K1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	0.82
FZD10	frizzled homolog 10 (Drosophila)	0.84

TABELLA 1. Geni differenzialmente espressi appartenenti alla pathway “Cytoskeleton remodeling-TGF, WNT and cytoskeleton remodelling”. Il profilo di espressione genica della linea parentale di OS umano U-2 OS è stata confrontato con quello dei trasfettanti U-2/CD99 wt.

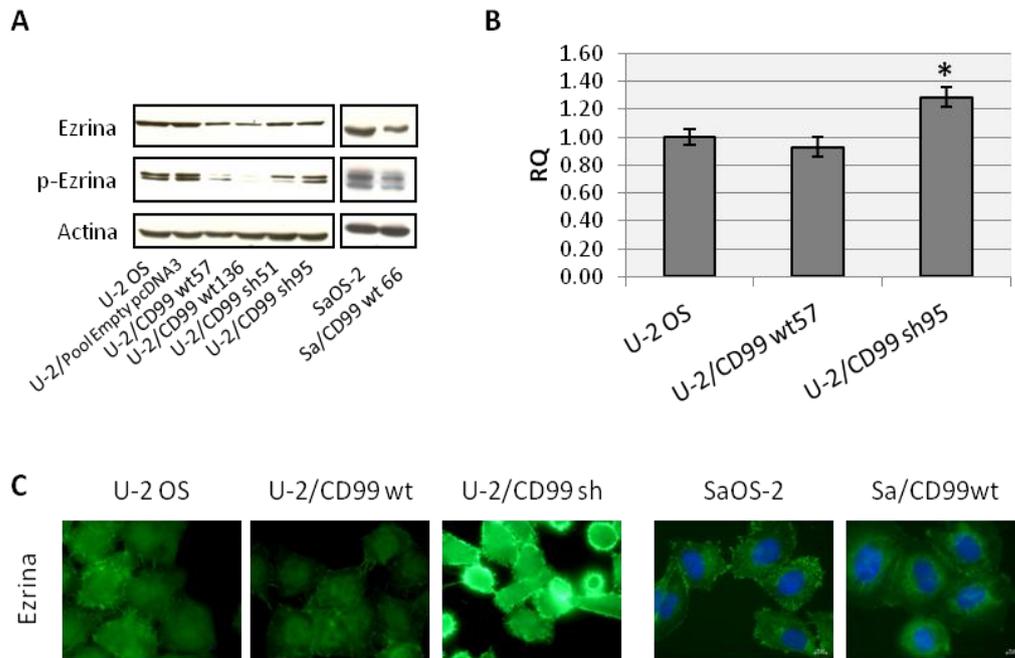


FIGURA 3. CD99 wt sopprime l'ezrina. (A) Valutazione in western blot sulle linee cellulari U2 OS e Saos-2 e sui cloni derivati di Ezrina e di fosfo-ezrina (T567), l'actina è stata usata come controllo di caricamento. **(B)** Valutazione in real time PCR sulla linea cellulare U2 OS e sui cloni derivati dell'espressione di ezrina. Il valore di espressione normalizzato ($\Delta\Delta Ct$), calcolato usando due geni endogeni, è mostrato come Relative Quantity (RQ) rispetto alla linea parentale. Nel grafico sono mostrate la media \pm ES di almeno due esperimenti diversi. La significatività è calcolata mediante test T student per dati appaiati (* P value < 0.05). **(C)** Valutazione in immunofluorescenza sulle linee cellulari U2 OS e Saos-2 e sui cloni derivati di ezrina (ingrandimento 60 X).

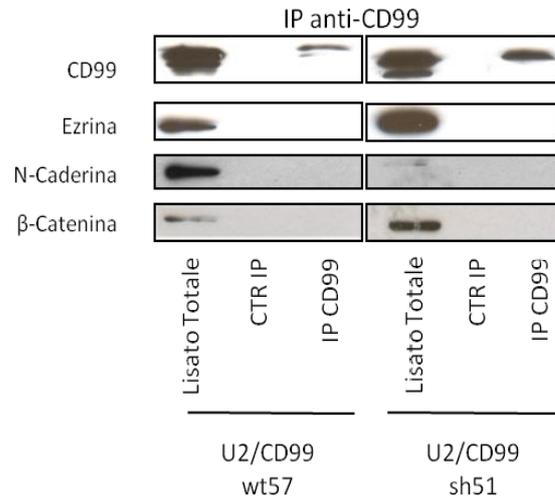


FIGURA 4. CD99 non interagisce direttamente con le proteine di membrana che regola. Analisi dei trasfettanti U-2/CD99 in western blot su: lisati totali, immunoprecipitati con un anticorpo IgG di controllo e immunoprecipitati con mAb anti-CD99 (12E7), per la valutazione di ezrina, N-caderina e β -catenina. Il blot per CD99 è stato usato come controllo dell'avvenuta immunoprecipitazione.

2. IDENTIFICAZIONE DI ROCK2 COME MEDIATORE CRUCIALE DEGLI EFFETTI DI CD99 SU ADESIONE E MIGRAZIONE

La down-regolazione di ROCK2 osservata nelle cellule trasfettate con CD99 wt rispetto alla linea parentale suggerisce un possibile ruolo di questa molecola come mediatore del fenotipo indotto da CD99 wt nelle cellule di OS umano. In considerazione di ciò, ci siamo proposti di valutare gli effetti della inattivazione e della over-espressione di ROCK2 sulle capacità adesive e migratorie di queste cellule.

2.1 ROCK2 MODULA LA CAPACITÀ DI ADESIONE OMOTIPICA

Il trattamento con l'inibitore specifico di ROCK2 (N-(2-(2-(dimethylamino)ethoxy)-4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl)-2,3dihydrobenzo[b]1,4dioxine-2carboxamide) induce un aumento della capacità di aggregazione omotipica sia nelle linee parentali che nei cloni U-2/CD99 sh, come si può osservare dalla significativa riduzione del numero di cellule singole. Al contrario, dopo il trattamento con l'inibitore non si osserva alcuna alterazione della capacità adesiva delle cellule esprimenti CD99 wt, in linea con il fatto che l'espressione di ROCK2 è già down-regolata in queste ultime (Figura 5A). Come evidenziato dai risultati dell'analisi mediante western blot e dalle immagini di immunofluorescenza, l'inibizione farmacologica di ROCK2 induce parallelamente anche l'incremento dell'espressione di β -catenina e di N-caderina, e il reclutamento di queste molecole a livello della membrana plasmatica (Figura 5, pannello B, C e D).

Per confermare l'associazione funzionale fra ROCK2 e le molecole coinvolte nell'adesione e nel rimodellamento del citoscheletro, ROCK2 è stato silenziato mediante small interfering RNA sia nelle U-2OS che nelle Saos-2. Le cellule deprivate dell'espressione di ROCK2 mostrano un aumento della capacità di aggregazione omotipica (Figura 5, pannelli E ed F), accompagnata dalla up-regolazione e dal reclutamento in membrana di β -catenina e di N-caderina (Figura 5, pannello G e H).

2.2 ROCK2 MODULA LA CAPACITÀ MIGRATORIA

L'inibizione specifica di ROCK2 compromette significativamente la capacità migratoria della linea parentale U-2 OS e di entrambi i cloni esprimenti CD99 sh, mentre nei trasfettanti CD99 wt l'effetto del trattamento sul numero di cellule migrate è irrilevante (U-2/CD99 wt57) o scarsamente significativo (U-2/CD99 wt136) (Figura 6A). Come evidenziato dai risultati dell'analisi mediante western blot e dalle immagini di immunofluorescenza, l'inibizione farmacologica di ROCK2 induce parallelamente anche una riduzione dose-dipendente dell'espressione di ezrina, (Figura 6B), la quale non è più visibile a livello della membrana cellulare (Figura 6C) in entrambi i modelli cellulari utilizzati.

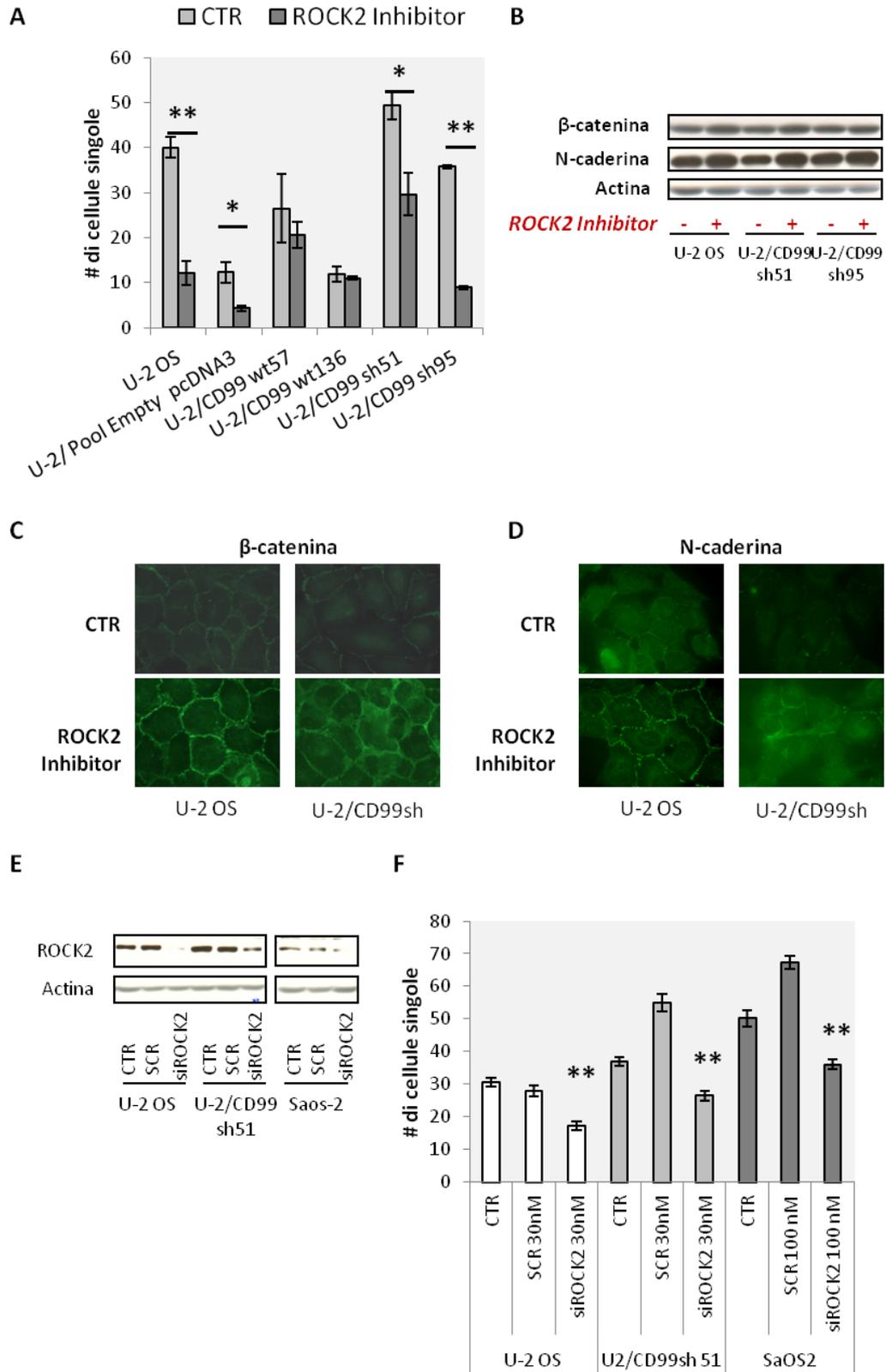
La capacità migratoria e l'espressione delle proteine effettrici sono state valutate anche dopo silenziamento transiente di ROCK2 nelle linee parentali e nella linea U-2/CD99 sh95. La repressione di ROCK2, verificata mediante western blot (Figura 5E), riduce significativamente il numero di cellule migrate in tutte e tre le linee testate (Figura 6D) e induce una riduzione dei livelli e dell'attività di ezrina (Figura 6E).

Al contrario, in seguito al silenziamento di ROCK2 non è stata osservata alcuna modulazione né dell'espressione né della localizzazione intracellulare di ARP2 (Figura 6F). Questo dato suggerisce che l'espressione di ARP2, sebbene specchio del fenotipo migrante, non sia funzionalmente connessa a ROCK2.

2.3 LA RIESPRESSIONE DI ROCK2 RIPRISTINA ADESIONE E MIGRAZIONE

I risultati degli esperimenti di inibizione farmacologica e silenziamento di ROCK2 supportano il ruolo cruciale di questa chinasi nella determinazione del fenotipo indotto dall'espressione di CD99 wt.

Abbiamo pertanto valutato se la riespressione di ROCK2 nelle linee cellulari trasfettate con CD99 wt fosse effettivamente in grado di ripristinare il fenotipo maligno caratteristico delle linee parentali. L'espressione ectopica di ROCK2 compromette significativamente la capacità di aggregazione omotipica delle cellule esprimenti CD99 wt e ne ripristina la capacità migratoria (Figura 7) in entrambi i modelli cellulari considerati, confermando quindi che l'effetto oncosoppressivo di CD99 wt nelle cellule di OS umano è verosimilmente mediato dalla repressione di ROCK2.



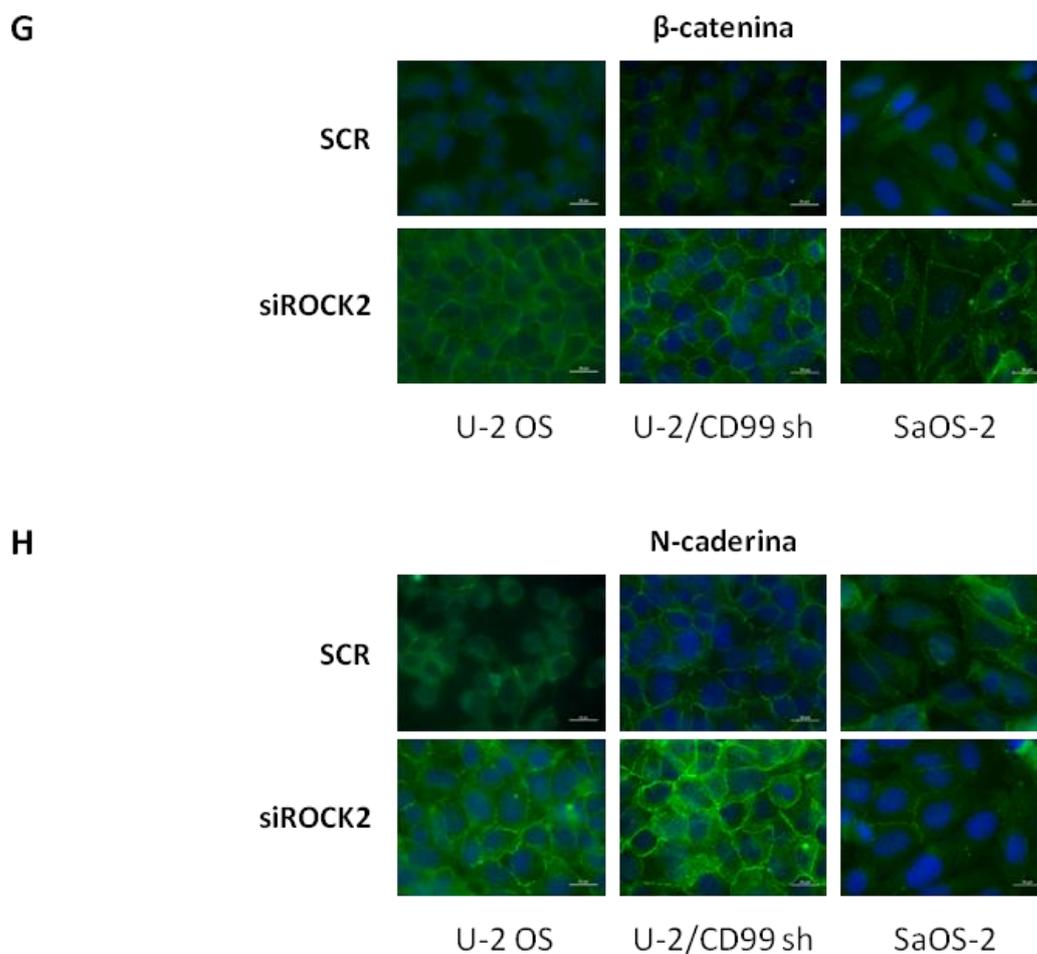
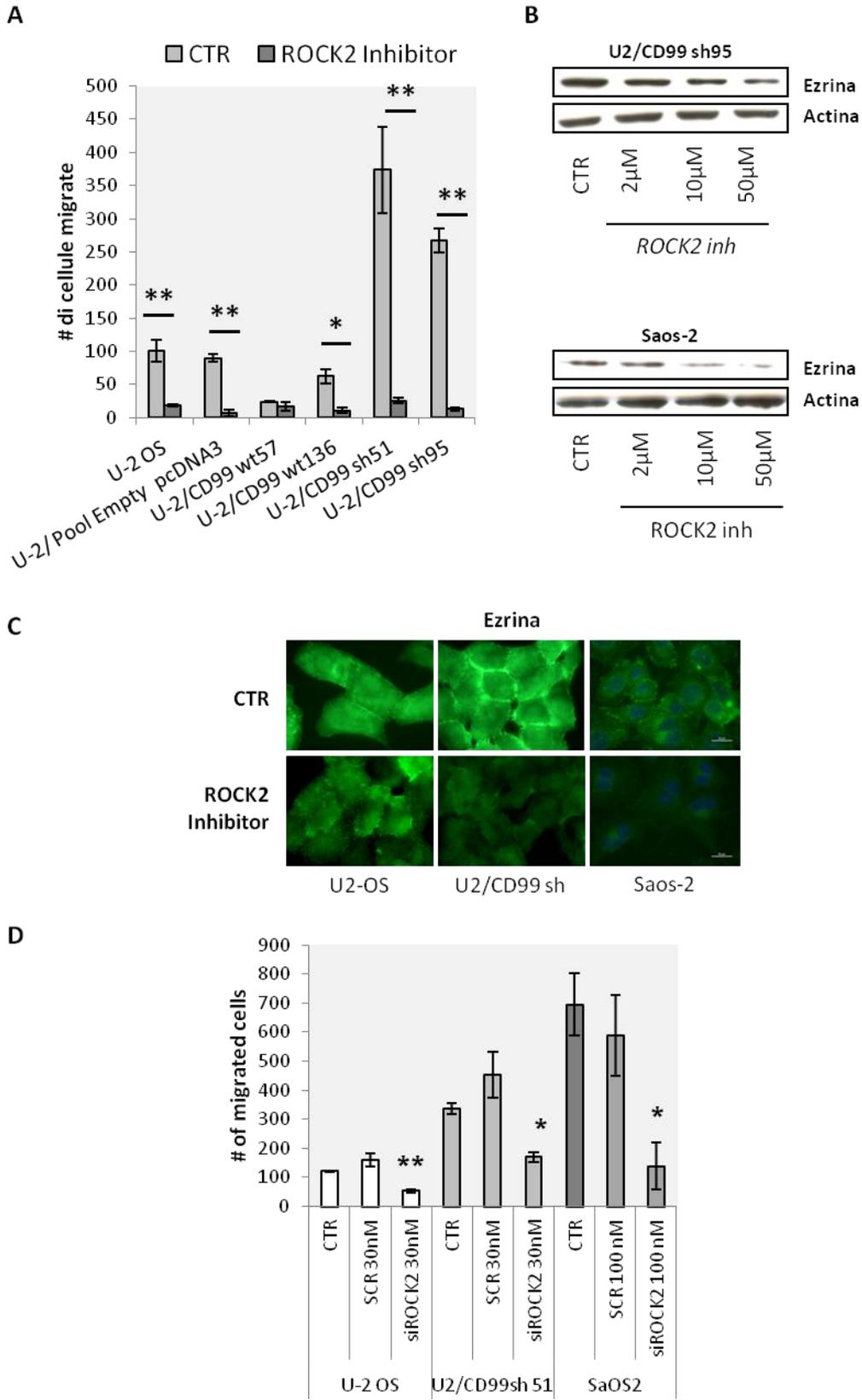


FIGURA 5. ROCK2 modula la capacità di adesione omotipica. (A) Effetti dell'inibitore specifico per ROCK2 (10 μ M) sulla capacità di aggregazione omotipica sulla linea cellulare U2 OS e sui cloni derivati. Le colonne rappresentano la media \pm ES di almeno due esperimenti, la significatività è calcolata mediante test T student per dati appaiati (* P value < 0.05; ** P value < 0.001). **(B)** Valutazione in western blot di β -catenina ed N-caderina sulla linea U-2 OS e i trasfettanti CD99 sh esposti all'inibitore specifico per ROCK2 (10 μ M), l'actina è stata usata come controllo di caricamento. **(C)** Valutazione in immunofluorescenza di β -catenina e di N-caderina **(D)** sulla linea U-2 OS e i trasfettanti CD99 sh esposti all'inibitore specifico per ROCK2 (10 μ M) (ingrandimento 60 X). **(E)** Conferma in western blot dell'avvenuto silenziamento di ROCK2 nelle linee U-2 OS, U-2/CD99 sh51 e Saos-2, l'actina è stata usata come controllo di caricamento. **(F)** Effetti del silenziamento di ROCK2 sulla capacità di aggregazione omotipica di U-2 OS, U-2/CD99 sh51 e Saos-2. Le colonne rappresentano la media \pm ES di almeno due esperimenti, la significatività è calcolata mediante test T student per dati appaiati (** P value < 0.001). **(G)** Valutazione in immunofluorescenza di β -catenina e di N-caderina **(H)** su U-2 OS, U-2/CD99 sh51 e Saos-2, dopo il silenziamento di ROCK2 (ingrandimento 60 X).



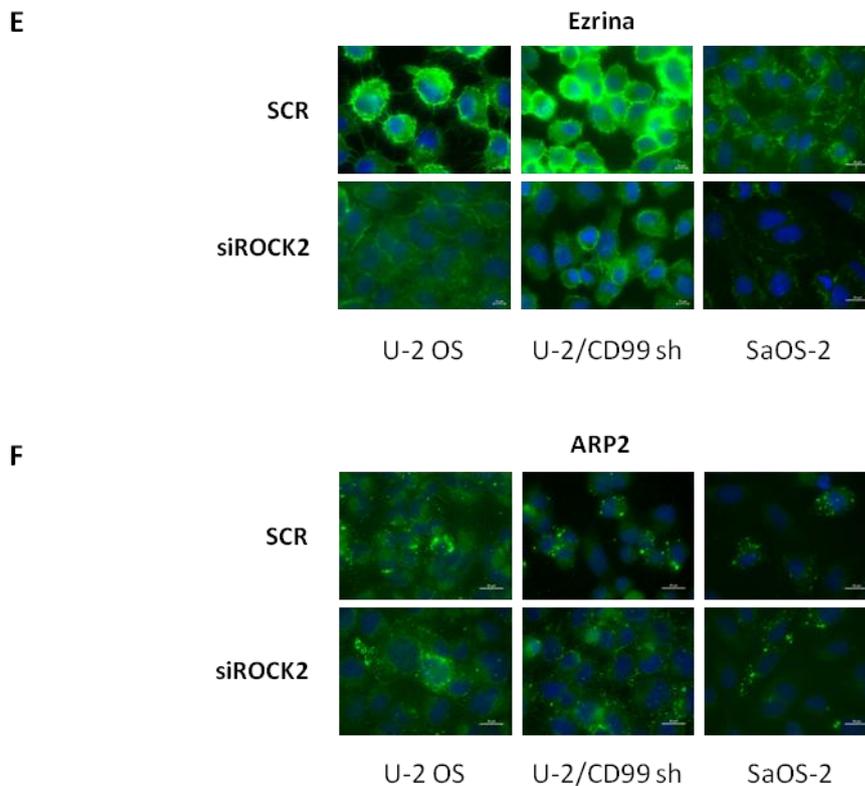


FIGURA 6. ROCK2 modula la capacità migratoria. (A) Effetti dell'inibitore specifico per ROCK2 (10 μ M) sulla capacità migratoria sulla linea cellulare U2 OS e sui cloni derivati. Le colonne rappresentano la media \pm ES di almeno due esperimenti, la significatività è calcolata mediante test T student per dati appaiati (* P value < 0.05; ** P value < 0.001). **(B)** Valutazione in western blot di ezrina su U-2/CD99 sh51 e Saos-2 esposte a dosi crescenti dell'inibitore specifico per ROCK2 (2 μ M, 10 μ M, 50 μ M), l'actina è stata usata come controllo di caricamento. **(C)** Valutazione in immunofluorescenza di ezrina su U-2 OS, U-2/CD99 sh e Saos-2 esposti all'inibitore specifico per ROCK2 (10 μ M) (ingrandimento 60 X). **(D)** Effetti del silenziamento di ROCK2 sulla capacità migratoria di U-2 OS, U-2/CD99 sh51 e Saos-2. Le colonne rappresentano la media \pm ES di almeno due esperimenti, la significatività è calcolata mediante test T student per dati appaiati (* P value < 0.05; ** P value < 0.001). **(E)** Valutazione in immunofluorescenza di ezrina e di ARP2 **(F)** su U-2 OS, U-2/CD99 sh51 e Saos-2, dopo il silenziamento di ROCK2 (ingrandimento 60 X).

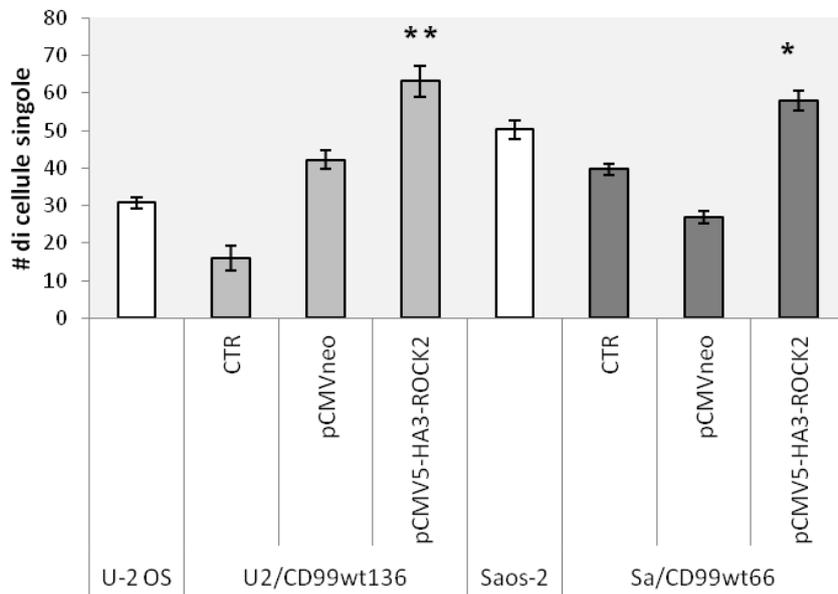
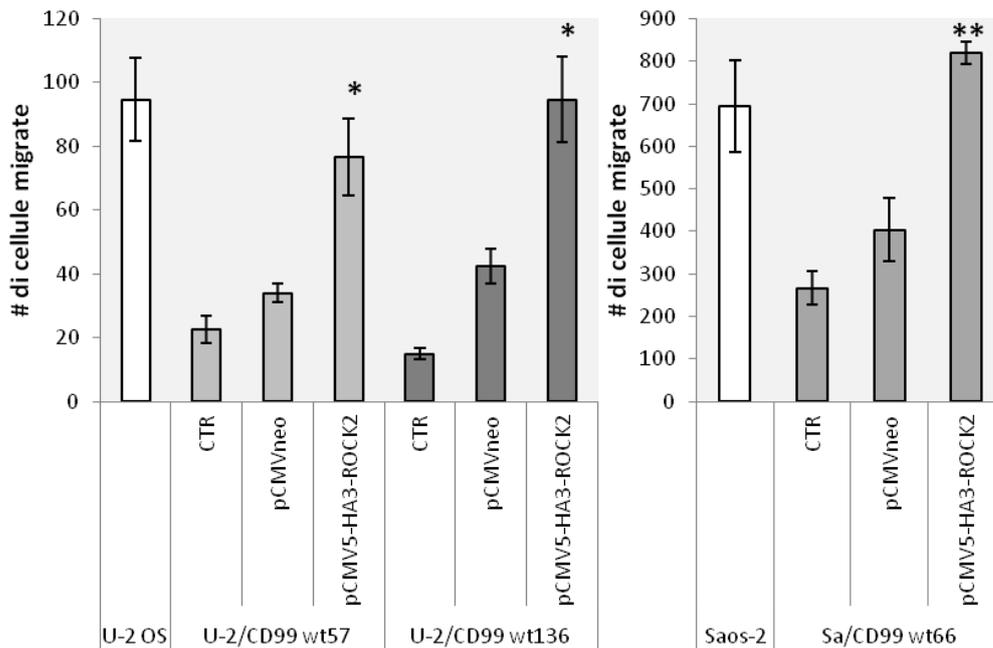
A**B**

FIGURA 7. La riespressione di ROCK2 ripristina adesione e migrazione. Effetti della riespressione di ROCK2 sulla capacità di aggregazione omotipica **(A)** e sulla capacità migratoria **(B)** dei trasfettanti CD99 wt. Le colonne rappresentano la media \pm ES di almeno due esperimenti, la significatività è calcolata mediante test T student per dati appaiati (* P value < 0.05; ** P value < 0.001).

3. IL CD99 wt SOPPRIME L'EZRINA E AUMENTA L'ESPRESSIONE DI β -CATENINA E DI N-CADERINA MEDIANTE LA MODULAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI ROCK2 E SRC

È stato precedentemente dimostrato che nelle cellule di OS umano le due isoforme della molecola CD99 esibiscono la capacità di regolare differenzialmente l'attività della chinasi cSrc: l'isoforma completa è in grado di reprimere l'attività della chinasi (colocalizzando con la caveolina-1, infatti, CD99 wt mantiene cSrc sequestrato a livello della membrana plasmatica in una conformazione inattiva); l'isoforma tronca, al contrario, pur colocalizzando con cSrc a livello della membrana plasmatica, non è in grado di inibirne l'attività. L'inibizione di cSrc da parte di CD99 wt è indispensabile per la determinazione del fenotipo a ridotta malignità osservato nei trasfettanti CD99 wt (*Manara et al., 2006; Scotlandi et al., 2007*).

Considerando che cSrc è in grado di fosforilare, e quindi di attivare ROCK2 (*Jiao et al., 2008; Lee et al., 2010*) e che la sua inibizione farmacologica induce nelle cellule di OS una riduzione della motilità cellulare (*Scotlandi et al., 2007*), si è valutata l'associazione funzionale tra cSrc e i mediatori a valle di CD99: ROCK2, ezrina, N-caderina e β -catenina.

Come evidenziato dall'analisi mediante western blot, l'inibizione farmacologica di cSrc (tramite trattamento con erbimicina-A) nelle linee parentali e nei trasfettanti CD99 sh, in accordo con la riduzione della capacità migratoria osservata dopo il trattamento,

induce una significativa riduzione nell'espressione di ROCK2 (Figura 8A) e di ezrina e parallelamente un aumento dell'espressione di N-caderina e β -catenina (Figura 8B).

Per rafforzare l'ipotesi di un coinvolgimento di cSrc nella determinazione del fenotipo meno aggressivo indotto dall'espressione del CD99 wt sono state impiegate delle cellule stabilmente trasfettate con CD99 wt mutato in Tyr 146 (nella porzione intracellulare comune alle due isoforme) o in Ser 168 (nella porzione N-terminale della proteina, deleta nell'isoforma tronca). La prima mutazione non altera il fenotipo indotto da CD99 wt, mentre la mutazione in Ser 168 compromette l'interazione con cSrc e ripristina la capacità migratoria (*Scotlandi et al., 2007*). In accordo con ciò, l'espressione di ROCK2, ezrina, fosfo-ezrina Thr 567 ed ERM è inibita nelle U-2/CD99 wt TYR, analogamente a quanto osservato nelle U-2/CD99 wt, ma è ripristinata ai livelli della linea parentale in seguito alla mutazione in Ser 168 (Figura 8C).

I dati confermano l'esistenza di un'asse ROCK2, ezrina e migrazione/metastasi che può essere invertito dall'espressione di CD99 wt attraverso la modulazione dell'attività di cSrc mediata dal residuo Ser 168 del CD99.

L'interazione funzionale descritta in letteratura tra cSrc e ROCK2, pur giustificando la regolazione dell'attività di ROCK2 da parte di cSrc, non spiega la down-regolazione di ROCK2 osservata nelle cellule esperimenti nelle cellule CD99 wt. Considerando che il prodotto della trascrizione di ROCK2 è un bersaglio descritto del micro-RNA-138 (*Lu Jiang et al., 2010*) abbiamo valutato l'espressione di questo miRNA nelle linee esperimenti CD99 wt.

I risultati mostrano che l'espressione di CD99 wt si accompagna effettivamente ad un aumento dei livelli del miRNA-138 (Figura 9), confermando quindi il possibile coinvolgimento di questo micro-RNA nella down-regolazione di ROCK2 indotta dall'espressione di CD99 wt.

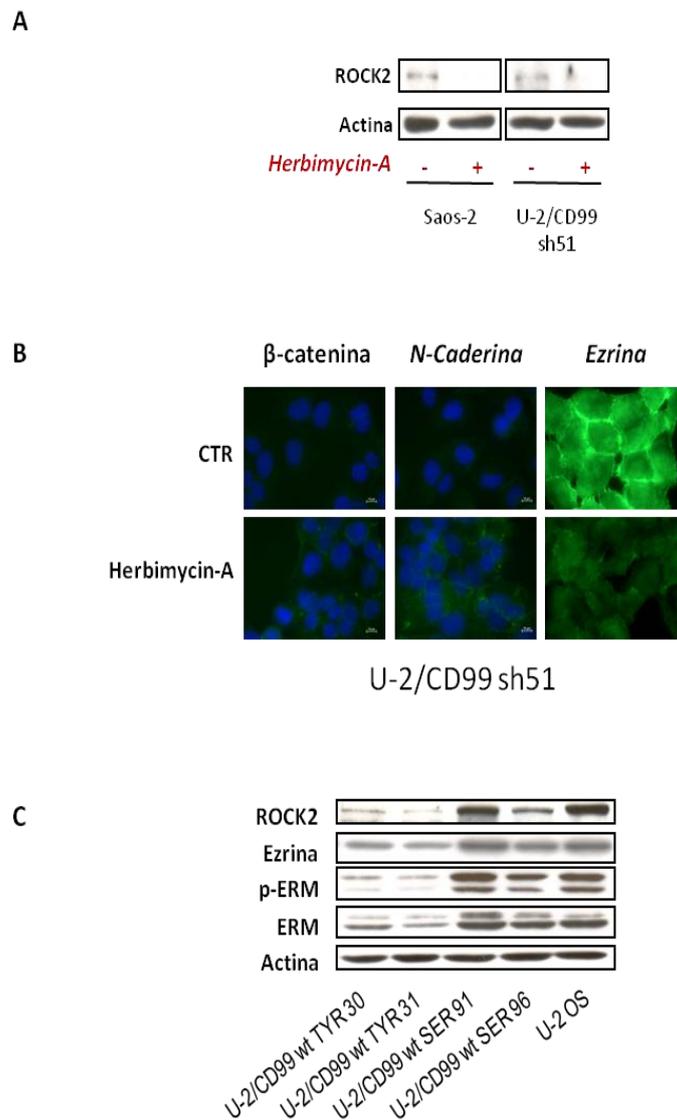


FIGURA 8. CD99 wt sopprime l'eziprina e aumenta l'espressione di β -catenina e di N-caderina mediante la modulazione dell'attività di ROCK2 e SRC. (A) Valutazione in western blot di ROCK2 su Saos-2 e U-2/CD99 sh51 esposte all'inibitore specifico per cSrc (Herbimycin-A,

2 μ M), l'actina è stata usata come controllo di caricamento. **(B)** Valutazione in immunofluorescenza di β -catenina, N-caderina ed ezrina su U-2/CD99 sh esposte a Herbimycin-A (2 μ M) (ingrandimento 60 X). **(C)** Valutazione in western blot di ROCK2, ezrina, fosfo-ezrina (T567) ed ERM sulla linea U2OS e sui cloni trasfettati con CD99 wt mutato in Tyr 146 o Ser 168, l'actina è stata usata come controllo di caricamento.

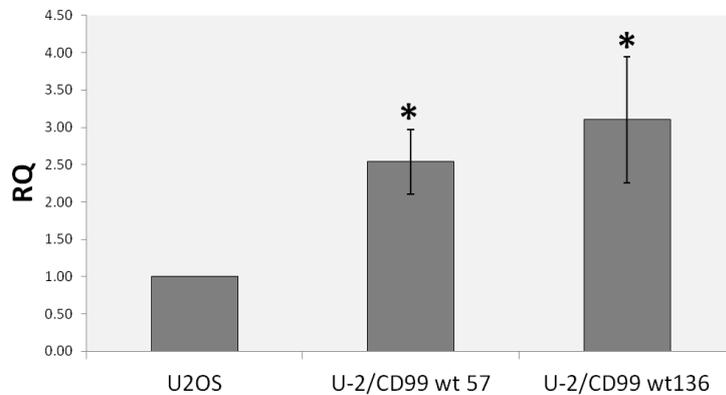


FIGURA 9. CD99 wt up-regola il microRNA-138. Valutazione in real time PCR dell'espressione del miRNA-138 su U-2 OS e trasfettanti CD99 wt. Il valore di espressione normalizzato ($\Delta\Delta$ Ct), calcolato usando il gene endogeno RNU6B, è mostrato come Relative Quantity (RQ) rispetto alla linea parentale. Nel grafico sono mostrate la media \pm ES di almeno due esperimenti diversi. La significatività è calcolata mediante test T student per dati appaiati (* P value < 0.05).

4. ROCK2 MEDIA LA DIFFUSIONE METASTATICA DELLE CELLULE DI OS UMANO

4.1 CREAZIONE DI UNA LINEA DI OS UMANO STABILMENTE SILENZIATA PER ROCK2

La chinasi ROCK2 modula la capacità migratoria e la capacità adesiva nelle cellule di OS umano *in vitro*; per poter confermare *in vivo* il ruolo di ROCK2 nella determinazione del potenziale metastatico delle cellule di OS, è stata creata una linea di OS umano in cui ROCK2 fosse stabilmente silenziato.

Due *short hairpin* RNA contenenti rispettivamente la sequenza per il silenziamento di ROCK2 e la sequenza di controllo sono stati clonati all'interno di vettori *p-silencer* e impiegati per trasfettare stabilmente la linea cellulare U-2 OS. L'attento screening, mediante valutazione sia in western blot che in immunofluorescenza in aderenza, ha permesso di individuare i cloni migliori in termini di silenziamento.

L'ulteriore caratterizzazione di questi cloni, in termini non solo di silenziamento di ROCK2, ma anche di espressione degli antigeni delle proteine di interesse a valle, di capacità migratoria e di crescita in assenza di ancoraggio, ha ancora una volta confermato la funzione *in vitro* di ROCK2: la sua repressione induce la riorganizzazione del citoscheletro di actina, il reclutamento in membrana di N-caderina e la riduzione dei livelli di ezrina (Figura 10A). Le cellule deplete per ROCK2 mostrano inoltre una significativa riduzione sia della capacità migratoria (Figura 10B) che della capacità di

crescita ancoraggio-indipendente (Figura 10, pannello C e D), indice quest'ultima della capacità che hanno le cellule tumorali di formare metastasi nei modelli *in vivo*.

4.2 IL SILENZAMENTO DI ROCK2 COMPROMETTE LA DIFFUSIONE METASTATICA DELLE CELLULE DI OS *IN VIVO*

Due cloni silenziati per ROCK2 (U-2/shROCK2 #46 e U-2/shROCK2 #78), insieme con la linea di controllo (U-2/SCR pool), sono stati inoculati sotto cute in topi NSG (NOD-SCID-gamma, Charles Rivers). Sono state inoltre testate allo stesso modo la linea parentale U-2 OS e il clone U-2/CD99 wt57.

Questo modello murino, caratterizzato dalla mancanza di cellule mature T, cellule B, e natural killer (NK), è privo delle vie di segnalazione mediate dalle citochine e presenta molteplici difetti nell'immunità innata (*Shultz et al., 2005*) e rappresenta per questo un ottimo modello per lo studio della disseminazione metastatica.

I dati ottenuti mostrano che, come già precedentemente osservato da Manara e collaboratori (*Manara et al., 2006*), l'espressione forzata di CD99 wt compromette in parte la capacità proliferativa delle cellule di OS umano (Figura 11A) mentre ne riduce fortemente la capacità metastatica (Figura 11B).

Al pari di quanto osservato per questo modello, anche il silenziamento stabile di ROCK2 influenza più la capacità metastatica che non la capacità proliferativa delle cellule inoculate (Figura 11, pannello C e D): dei due cloni testati, infatti, U-2/shROCK2 #46 non è in grado di proliferare e di dare origine al tumore né di produrre metastasi,

mentre il clone U-2/shROCK2 #78 è in grado di generare il tumore, ma mostra una capacità proliferativa ridotta rispetto alla linea di controllo U-2/SCR pool e, a differenza di quest'ultima, non è in grado di indurre la formazione di metastasi.

Complessivamente dunque, questi dati ci confermano la centralità della chinasi ROCK2 nel processo di diffusione metastatica delle cellule di OS umano.

4.3 VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'EFFICACIA DEL PAN-INIBITORE DI ROCK Y27632

I dati ottenuti sperimentalmente suggeriscono che ROCK2 possa rappresentare un interessante bersaglio per contrastare la diffusione metastatica delle cellule di OS umano nel modello murino. Il silenziamento genico tuttavia, sebbene rappresenti un ottimo approccio per studiare le funzioni di una molecola e il suo ruolo nell'ambito di uno specifico processo cellulare, non si presta ad essere traslato in campo clinico. L'impiego di molecole con funzione inibitoria, invece, offre maggiori possibilità di applicazione.

È stato quindi condotto un esperimento pilota per valutare *in vivo* l'efficacia dell'inibitore specifico di ROCK2 nel contrastare la diffusione metastatica delle cellule di OS in topi Rag2(-/-);gammac(-/-) (Nanni *et al.*, 2010). Poiché non ci sono dati disponibili in letteratura sull'uso dell'inibitore specifico di ROCK2 in esperimenti *in vivo*, la dose da impiegare nel trattamento (10 mg/Kg/topo) è stata ricavata empiricamente a partire dai dati disponibili in letteratura riguardanti il pan-inibitore di ROCK (Y27632);

questa dose è però risultata tossica e ha dato, anche nei controlli, elevati livelli di infiammazione locale che possono avere alterato i risultati che riguardano la valutazione delle metastasi. Considerando inoltre l'esiguo numero di topi impiegati nell'esperimento (4 trattati e 4 controlli), non è stato possibile trarre conclusioni da questi risultati (dati non mostrati). La tossicità collaterale del trattamento potrebbe essere riconducibile al fatto che l'inibitore specifico di ROCK2 è insolubile in acqua o in tampone salino, ed è quindi stato necessario risospenderlo in DMSO (Dimetilsolfossido). Si è quindi deciso di ricorrere all'uso del pan-inibitore Y27632: questa molecola non è specifica per ROCK2, dal momento che agisce su entrambe le isoforme ROCK1 e ROCK2, ma ha il vantaggio di essere solubile in acqua e il suo impiego è ampiamente documentato in letteratura. Si è quindi proceduto a testare *in vitro* gli effetti di questo inibitore nel nostro modello sperimentale per verificare se questi fossero paragonabili a quelli indotti dall'inibitore specifico per il solo ROCK2.

In primo luogo si è valutata la capacità dell'inibitore di ridurre la capacità migratoria delle cellule di OS umano: il trattamento delle linee U-2 OS e Saos-2 con l'inibitore Y27632 induce una riduzione significativa della motilità cellulare, ma di inferiore entità rispetto a quella osservata dopo il trattamento con l'inibitore specifico per ROCK2 (Figura 12A).

Al fine di ottenere informazioni riguardo la eventuale tossicità del trattamento delle cellule di OS, si è valutato l'effetto di entrambi gli inibitori sulla capacità proliferativa, sul ciclo cellulare e sull'apoptosi. I dati mostrano che il trattamento delle cellule di OS con Y27632 non altera significativamente il ciclo cellulare (Figura 12B) e non induce apoptosi (Figura 12C). Il trattamento con l'inibitore specifico di ROCK2, invece, causa in

entrambe le linee cellulari testate un'alterazione nel ciclo cellulare (Figura 12D): nelle U-2 OS si osserva un lieve effetto citostatico alle alte dosi, con un accumulo di cellule in fase G1; nelle Saos-2 osserviamo invece un accumulo, dose dipendente, di cellule in fase G2/M. Per quanto riguarda invece gli effetti dell'inibitore specifico per ROCK2 in relazione all'induzione di apoptosi, si osserva che il trattamento non induce effetti significativi nella linea U-2 OS, mentre nelle Saos-2 l'induzione di apoptosi avviene in modo dose- e tempo-dipendente (Figura 12E).

Complessivamente quindi il trattamento con Y27632, risulta efficace, seppure in misura minore, rispetto al trattamento con l'inibitore specifico di ROCK2, nel ridurre la motilità nelle cellule di OS. L'impatto del trattamento con Y27632 sulla capacità di proliferazione è invece sostanzialmente ridotto. I dati ottenuti depongono quindi a favore di un possibile utilizzo del trattamento con Y27632 nella sperimentazione *in vivo*.

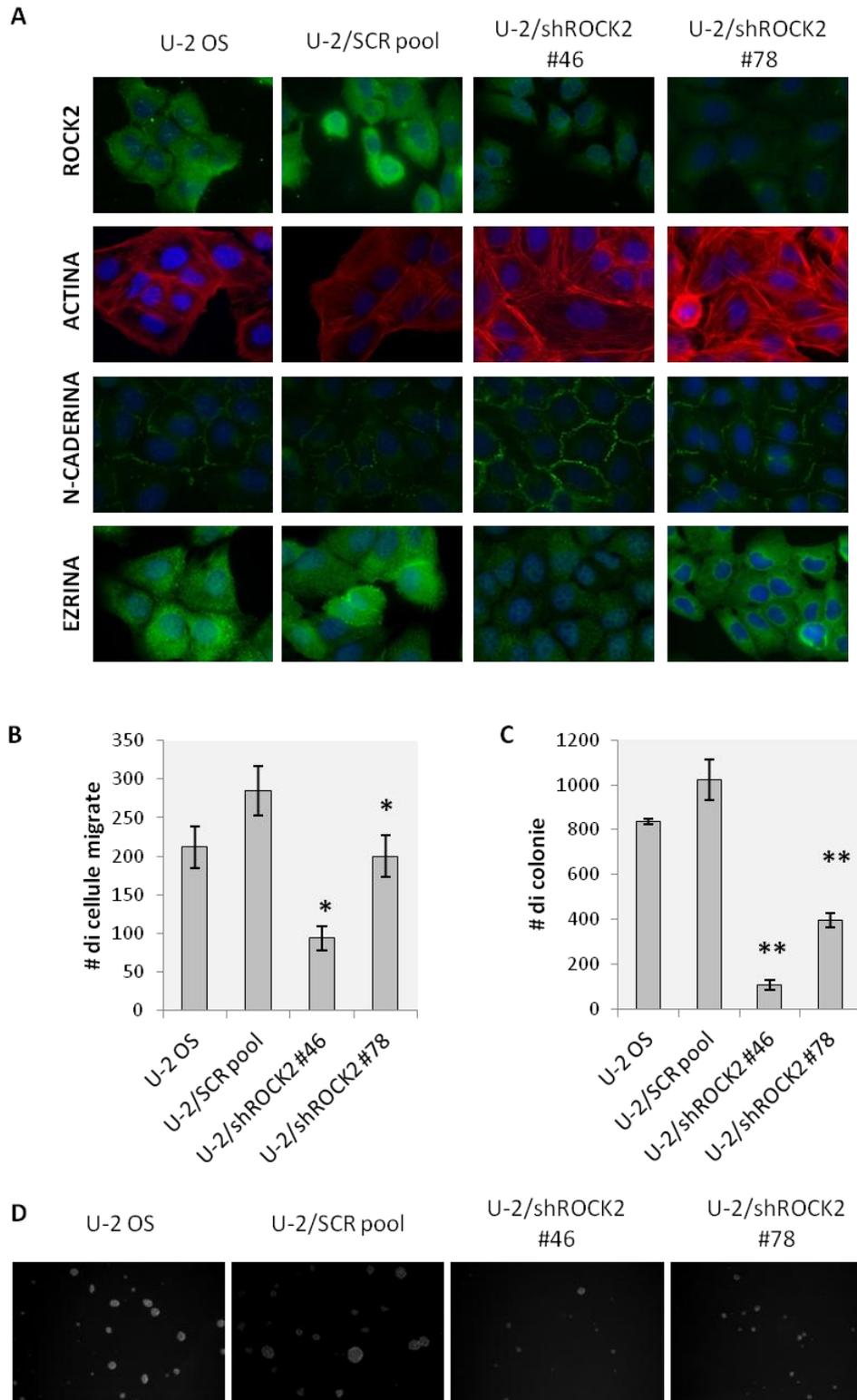


FIGURA 10. Caratterizzazione delle linee di OS umano stabilmente silenziate per ROCK2. (A) Valutazione in immunofluorescenza di ROCK2, actina, N-caderina ed ezrina nella linea cellulare parentale U2 OS, su U-2/SCR pool e sui cloni U-2/shROCK2 (ingrandimento 60 X). **(B)** Effetti del silenziamento stabile di ROCK2 sulla capacità migratoria e sulla capacità di crescita in assenza di ancoraggio **(C)**. Le colonne rappresentano la media \pm ES di almeno due esperimenti,

la significatività è calcolata mediante test T student per dati appaiati (* P value < 0.05; ** P value < 0.001). **(D)** Effetti del silenziamento stabile di ROCK2 sulla formazione di colonie in soft-agar (ingrandimento 4X).

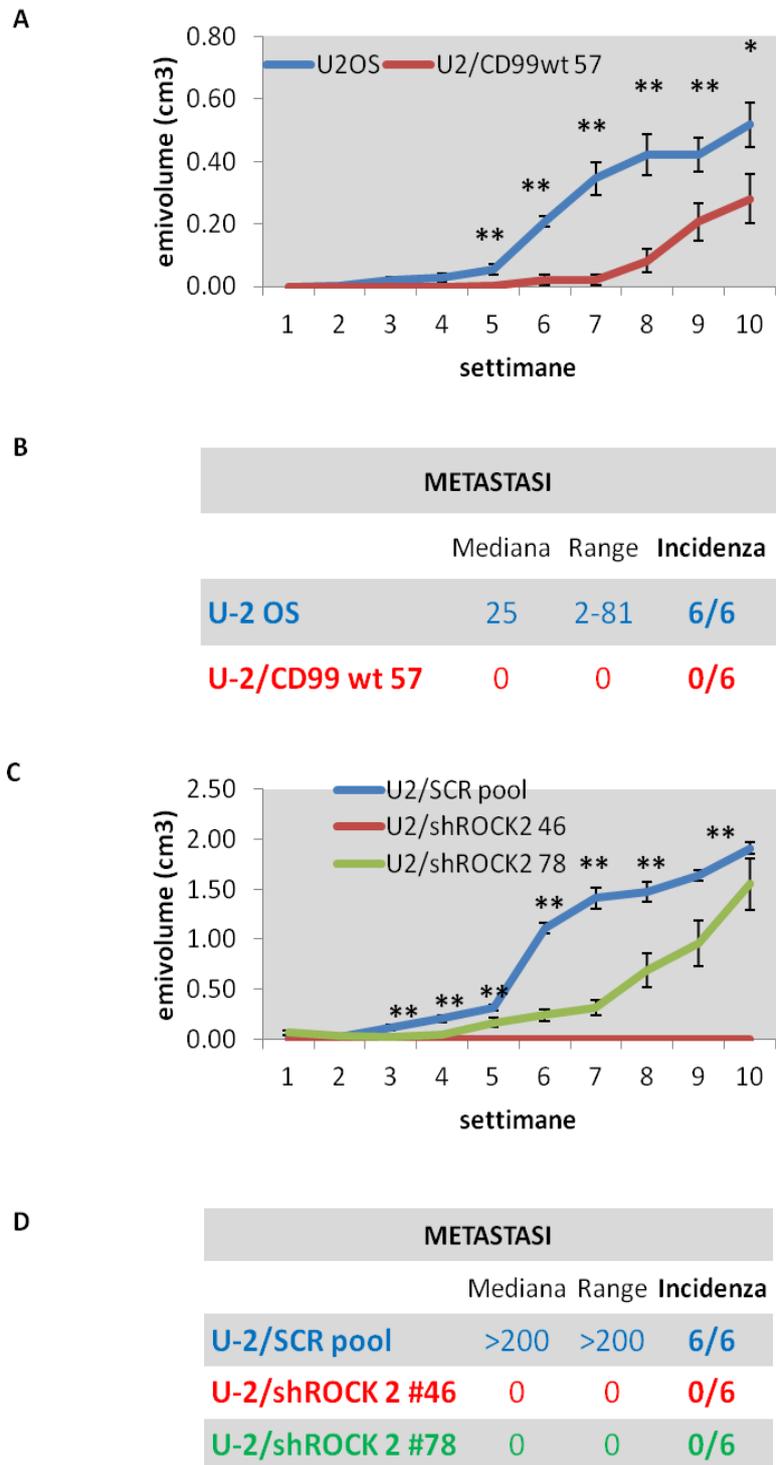
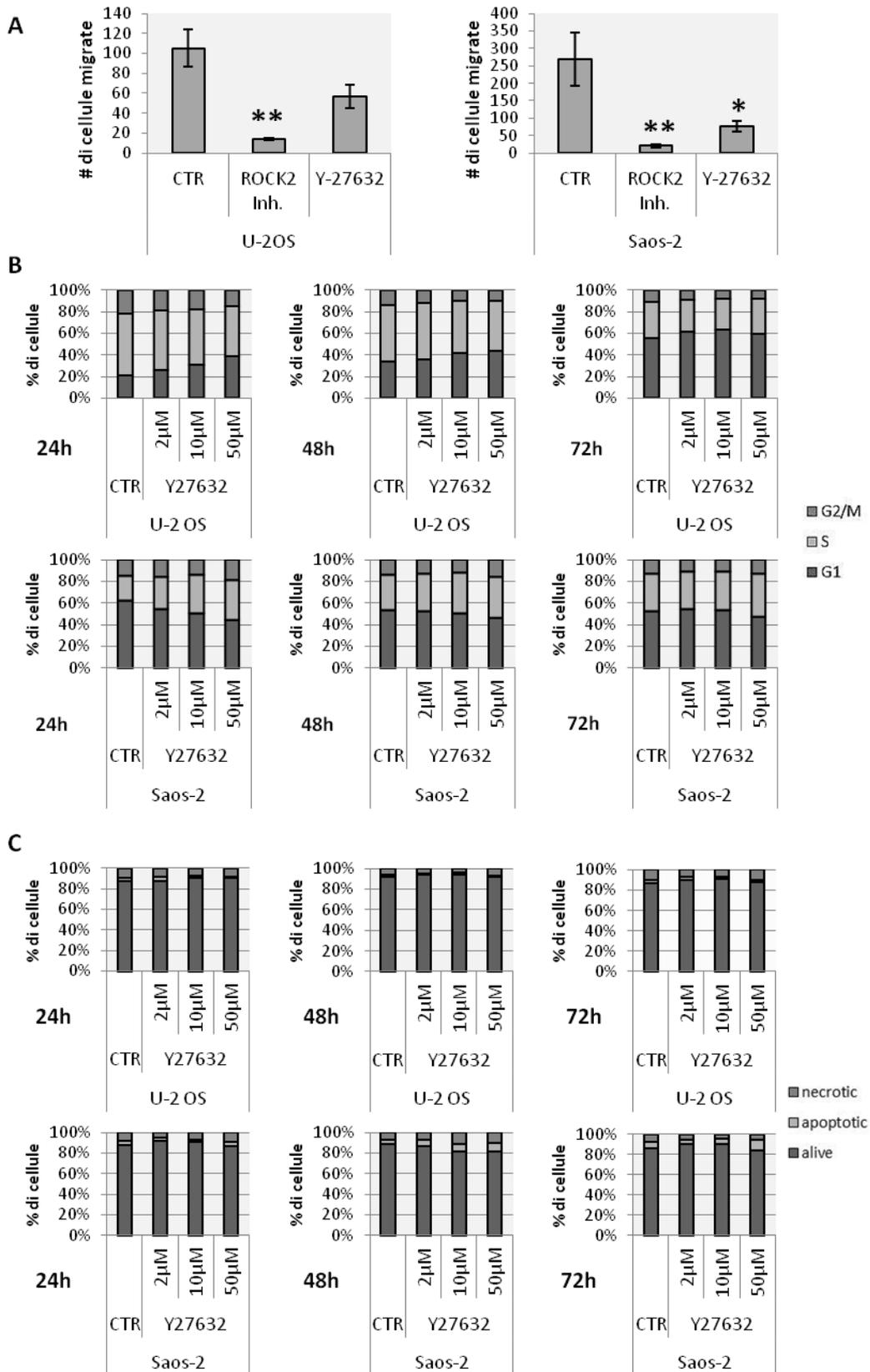


FIGURA 11. CD99 wt e shROCK2 compromettono la diffusione metastatica delle cellule di OS *in vivo*. (A, B) Valutazione della capacità tumorigenica e metastatica di cellule U-2 OS e U-2/CD99 wt57 inoculate sotto-cute in topi NSG. **(C, D)** Valutazione della capacità tumorigenica e metastatica di cellule U-2/SCR pool e trasfettanti U-2/shROCK2 inoculate sottocute in topi NSG. La significatività è calcolata mediante test T student per dati appaiati (* P value < 0.05, ** P value < 0.001).



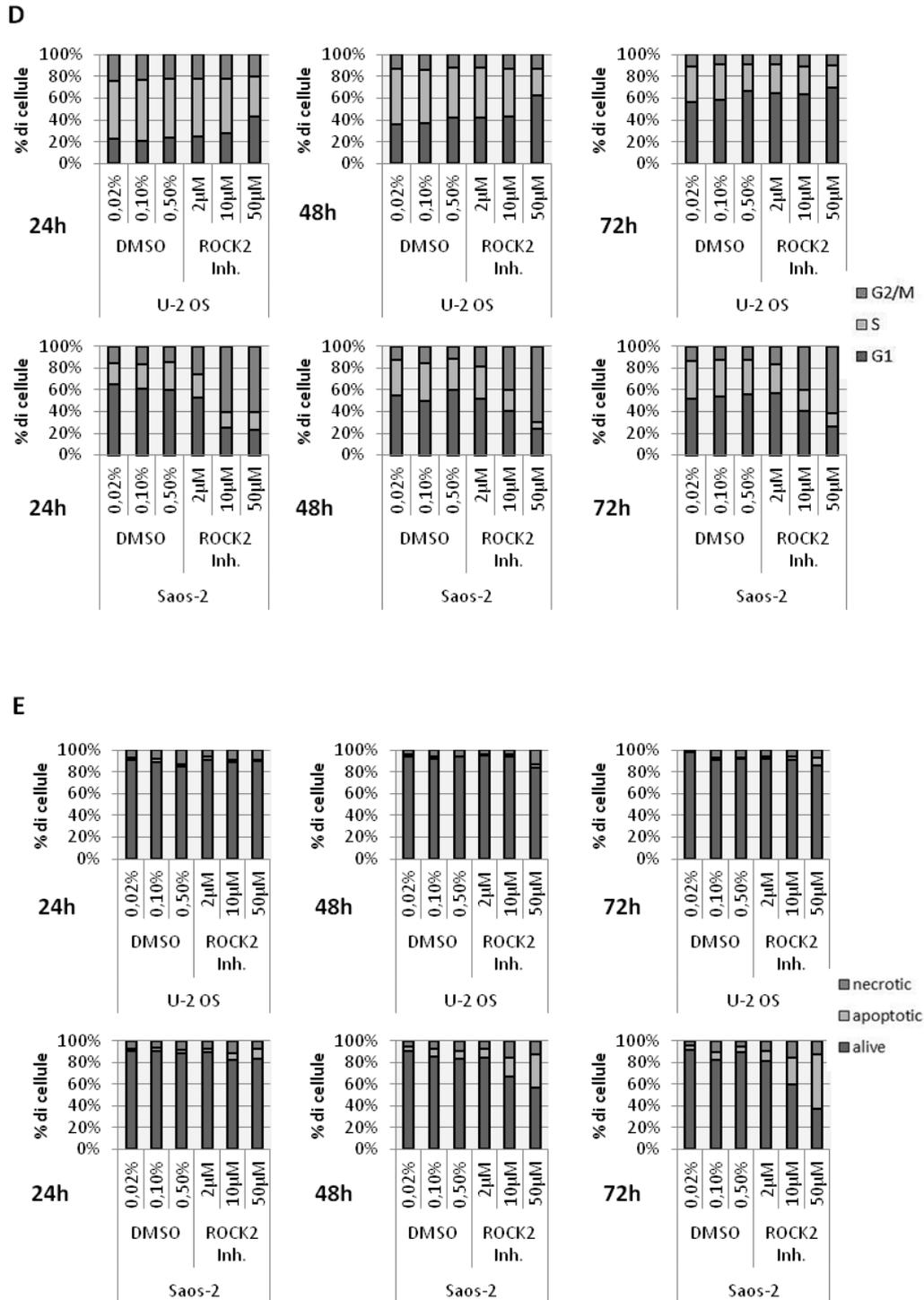


FIGURA 12. Test *in vitro* del pan-inibitore di ROCK (Y27632) su linee di OS. (A) Effetti dell'inibitore specifico per ROCK2 e del pan-inibitore Y27632 (10 µM) sulla capacità migratoria di U-2 OS e Saos-2. Le colonne rappresentano la media ± ES di almeno due esperimenti, la significatività è calcolata mediante test T student per dati appaiati (* P value < 0.05; ** P value < 0.001). (B) Valutazione del ciclo cellulare sulle linee U-2 OS e Saos-2 esposte a dosi crescenti

del pan-inibitore Y27632 (2 μ M, 10 μ M, 50 μ M) dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento. **(C)** Valutazione dell'induzione di apoptosi sulle linee U-2 OS e Saos-2 esposte a dosi crescenti del pan-inibitore Y27632 (2 μ M, 10 μ M, 50 μ M) dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento. **(D)** Valutazione del ciclo cellulare sulle linee U-2 OS e Saos-2 esposte a dosi crescenti dell'inibitore specifico per ROCK2 (2 μ M, 10 μ M, 50 μ M) dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento. **(E)** Valutazione dell'induzione di apoptosi sulle linee U-2 OS e Saos-2 esposte a dosi crescenti dell'inibitore specifico per ROCK2 (2 μ M, 10 μ M, 50 μ M) dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento. I grafici mostrano i risultati di singoli esperimenti rappresentativi.

5. CD99 E ROCK2 NEL SARCOMA DI EWING

Per approfondire le conoscenze del meccanismo che permette al CD99 wt di modulare l'espressione di ROCK2 abbiamo esteso lo studio ad un modello in cui il CD99 ha ruolo oncogenico: il sarcoma di Ewing.

Il sarcoma di Ewing rappresenta la seconda malattia più comune delle ossa negli adolescenti e nei giovani adulti, dopo l'osteosarcoma; è anch'esso un tumore molto aggressivo: tende a ricorrere dopo l'asportazione e ha una spiccata tendenza a formare metastasi nelle ossa, nel midollo osseo e nei polmoni. Il tasso sopravvivenza è molto basso: a 5 anni è del 50%, 25% nei casi in cui le metastasi sono già presenti all'esordio, a 10 anni è minore del 30% (*Riggi et al., 2007*); CD99 rappresenta un importante marcatore per la diagnosi differenziale di questa famiglia di tumori.

Dati preliminari, ottenuti mediante analisi western blot e PCR su un ampio pannello di linee ES, indicano che nelle cellule di sarcoma di Ewing l'isoforma predominante di CD99 è quella completa.

5.1 ROCK2 MODULA LA CAPACITÀ MIGRATORIA DELLE CELLULE DI SARCOMA DI EWING

Al contrario di quanto osservato nelle cellule di OS, nelle cellule di sarcoma di Ewing una maggiore espressione di CD99, compatibilmente con la funzione oncogenica che esercita in questa neoplasia, è associata ad una maggiore capacità migratoria e ad una maggiore capacità di crescita in assenza di ancoraggio (Figura 13, pannelli A, B, e C); a

livello molecolare l'espressione di CD99 è associata all'up-regolazione di ROCK2, di ROCK1 e di ezrina (Figura 13D).

Questi dati suggeriscono che, indipendentemente dall'espressione di CD99, la chinasi ROCK2 nelle cellule di sarcoma di Ewing potrebbe avere un ruolo nella determinazione del potenziale metastatico, al pari di quanto osservato nelle cellule di OS.

A conferma di questa ipotesi, il silenziamento transiente di ROCK2 mediante siRNA nelle cellule di sarcoma di Ewing, verificato mediante western blot (Figura 13E), induce un decremento della capacità migratoria che è tanto più significativo quanto maggiore è l'espressione di ROCK2 in condizioni basali (Figura 13F).

Questi dati nel complesso indicano che ROCK2 mantiene il suo ruolo nella determinazione del potenziale metastatico a prescindere dal ruolo oncogenico/oncosoppressore del CD99 nei sarcomi muscolo-scheletrici.

5.2 VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'EFFICACIA DEL PAN-INIBITORE DI ROCK Y27632

I test finora condotti sulle linee cellulari di sarcoma di Ewing evidenziano la centralità di ROCK2 nella determinazione del potenziale metastatico di queste cellule. ROCK2 rappresenta dunque un possibile bersaglio terapeutico anche in questa neoplasia. Per tale ragione abbiamo esteso alle linee di sarcoma di Ewing i test *in vitro* per valutare l'efficacia degli inibitori di ROCK nel contrastare la capacità migratoria e l'entità di eventuali effetti tossici indotti dal trattamento.

Abbiamo osservato che sia l'inibitore specifico di ROCK2, sia il pan-inibitore sono in grado di alterare la morfologia cellulare: dopo il trattamento, infatti, le cellule

appaiono più adese al supporto rispetto ai controlli non trattati, che invece crescono prevalentemente in sospensione; inoltre, l'inibitore specifico per ROCK2 sembra più efficace rispetto al pan-inibitore: già infatti alla concentrazione di 2 μ M è in grado di alterare la morfologia cellulare (Figura 14A).

Si è quindi valutata l'efficacia dei due inibitori nel ridurre la capacità migratoria e la capacità di crescita ancoraggio-indipendente delle cellule tumorali: entrambi gli inibitori compromettono sia la migrazione (Figura 14B) che la capacità di crescita in soft-agar (Figura 14C) delle cellule di sarcoma di Ewing, tuttavia gli effetti indotti dal pan-inibitore Y27632 risultano, in entrambe le linee cellulari testate, meno significativi rispetto agli effetti indotti dall'inibitore specifico di ROCK2.

Abbiamo quindi testato se l'inibizione farmacologica di ROCK fosse in grado di alterare il ciclo cellulare o di indurre apoptosi. I dati mostrano che il trattamento delle cellule di sarcoma di Ewing sia con l'inibitore specifico per ROCK2 sia con il pan-inibitore Y27632 non ha effetti significativi sull'induzione di apoptosi, se non dopo 72h di trattamento nella linea 6647 (Figura 14, pannello E e G). Per quanto riguarda invece gli effetti sulla regolazione del ciclo cellulare si osservano alterazioni di modesta entità (Figura 14, pannello D ed F): nella linea 6647 il trattamento con l'inibitore specifico per ROCK2 induce un accumulo dose-dipendente di cellule in fase G2/M, mentre l'inibitore aspecifico Y27632 non altera il ciclo cellulare; al contrario, nella linea SKES-1 è il pan-inibitore Y27632 a indurre un accumulo dose-dipendente in fase S dopo 72h di trattamento, mentre l'inibitore specifico per ROCK2 non ha effetti rilevanti sul ciclo.

Complessivamente quindi i risultati mettono in evidenza come l'effetto dell'inibizione di ROCK si eserciti principalmente su migrazione e invasività piuttosto che su

proliferazione e sopravvivenza, confermando il ruolo di ROCK2 nella determinazione del potenziale metastatico anche nelle cellule di sarcoma di Ewing.

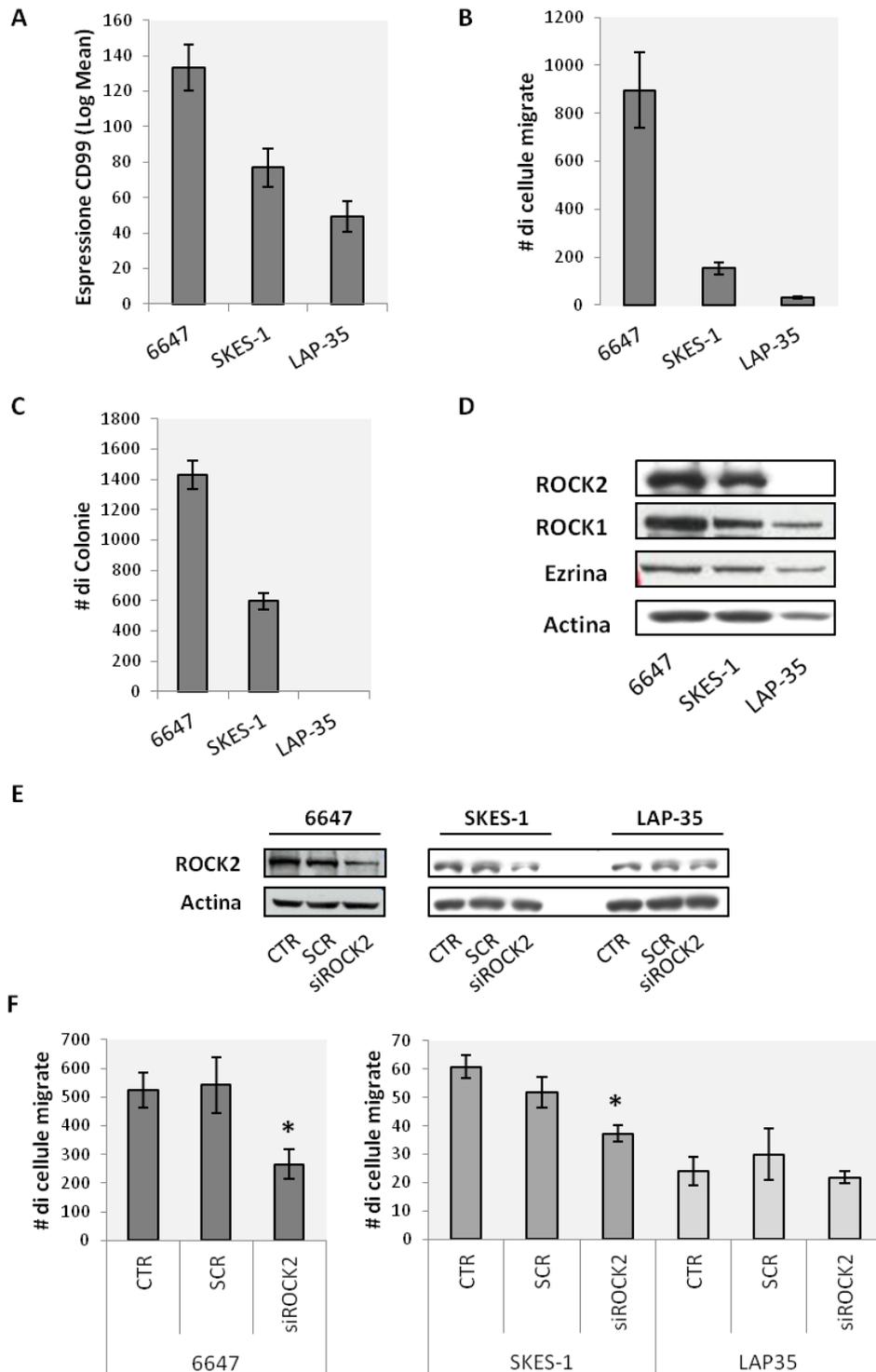
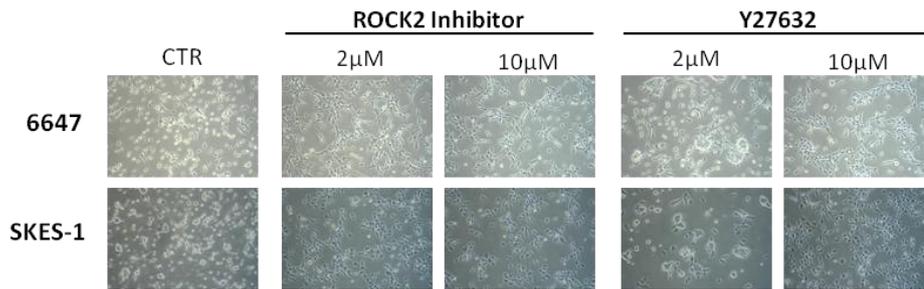


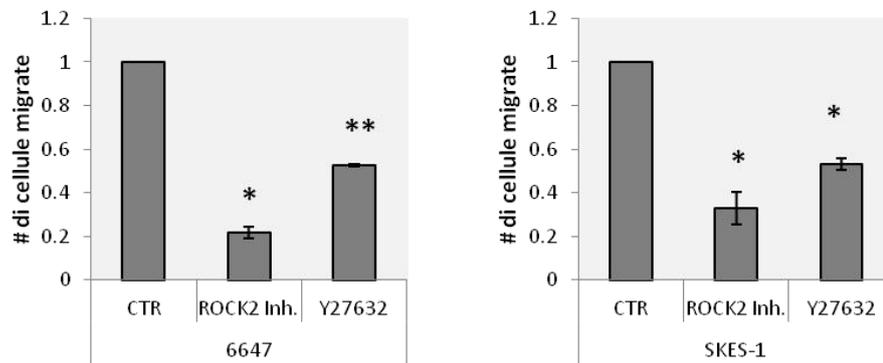
FIGURA 13. ROCK2 modula la capacità migratoria delle cellule di sarcoma di Ewing. (A) Valutazione di CD99, mediante immunofluorescenza in sospensione, nelle linee cellulari di Sarcoma di Ewing 6647, SKES-1 e LAP-35. **(B)** Valutazione della capacità migratoria e della capacità di crescita in assenza di ancoraggio **(C)** delle linee 6647, SKES-1 e LAP-35. **(D)** Valutazione in western blot di ROCK1, ROCK2 ed ezrina sulle linee cellulari 6647, SKES-1 e LAP-35, l'actina è stata usata come controllo di caricamento. **(E)** Conferma in western blot

dell'avvenuto silenziamento di ROCK2 nelle linee 6647, SKES-1 e LAP35, l'actina è stata usata come controllo di caricamento. **(F)** Effetti del silenziamento di ROCK2 sulla capacità migratoria delle linee di sarcoma di Ewing. In tutti i grafici le colonne rappresentano la media \pm ES di almeno due esperimenti, la significatività è calcolata mediante test T student per dati appaiati (* P value < 0.05).

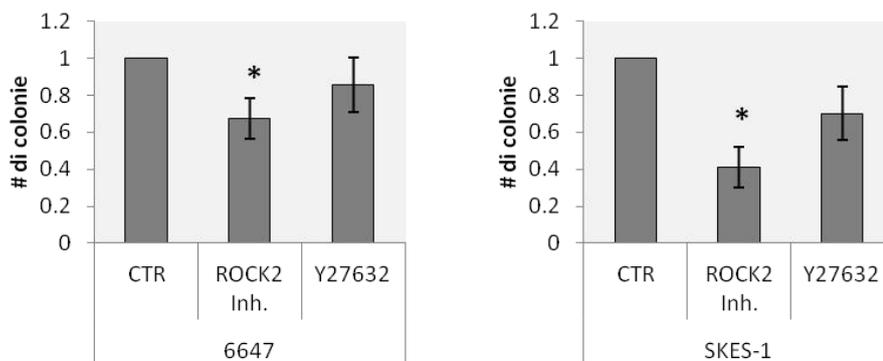
A



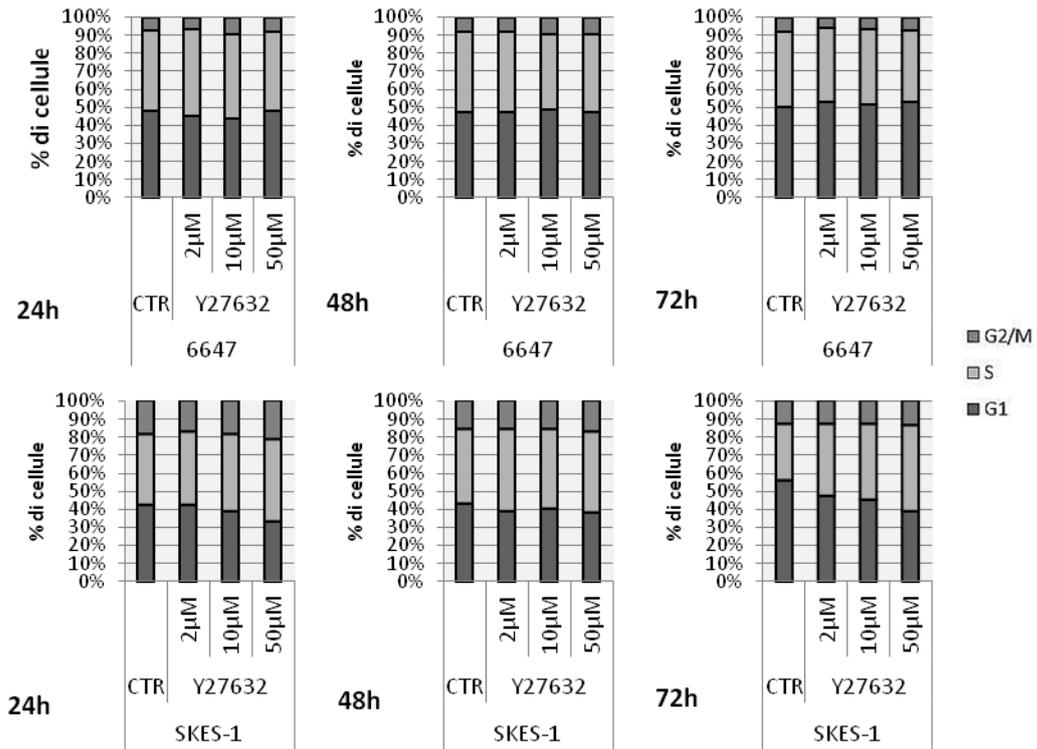
B



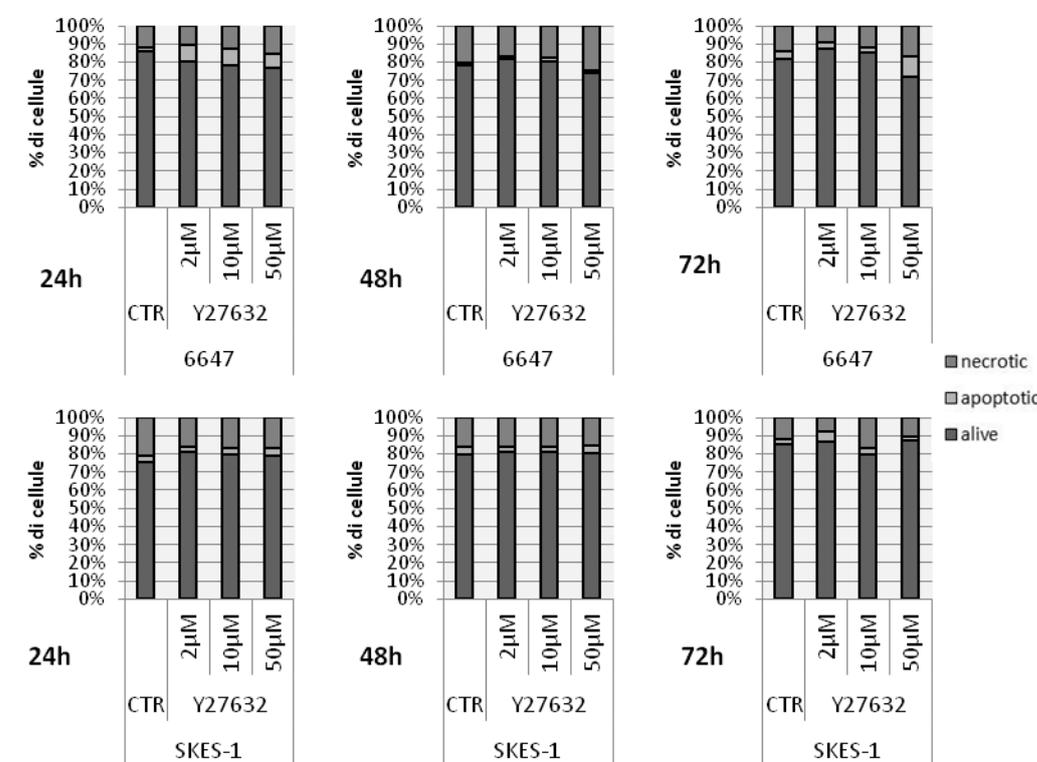
C



D



E



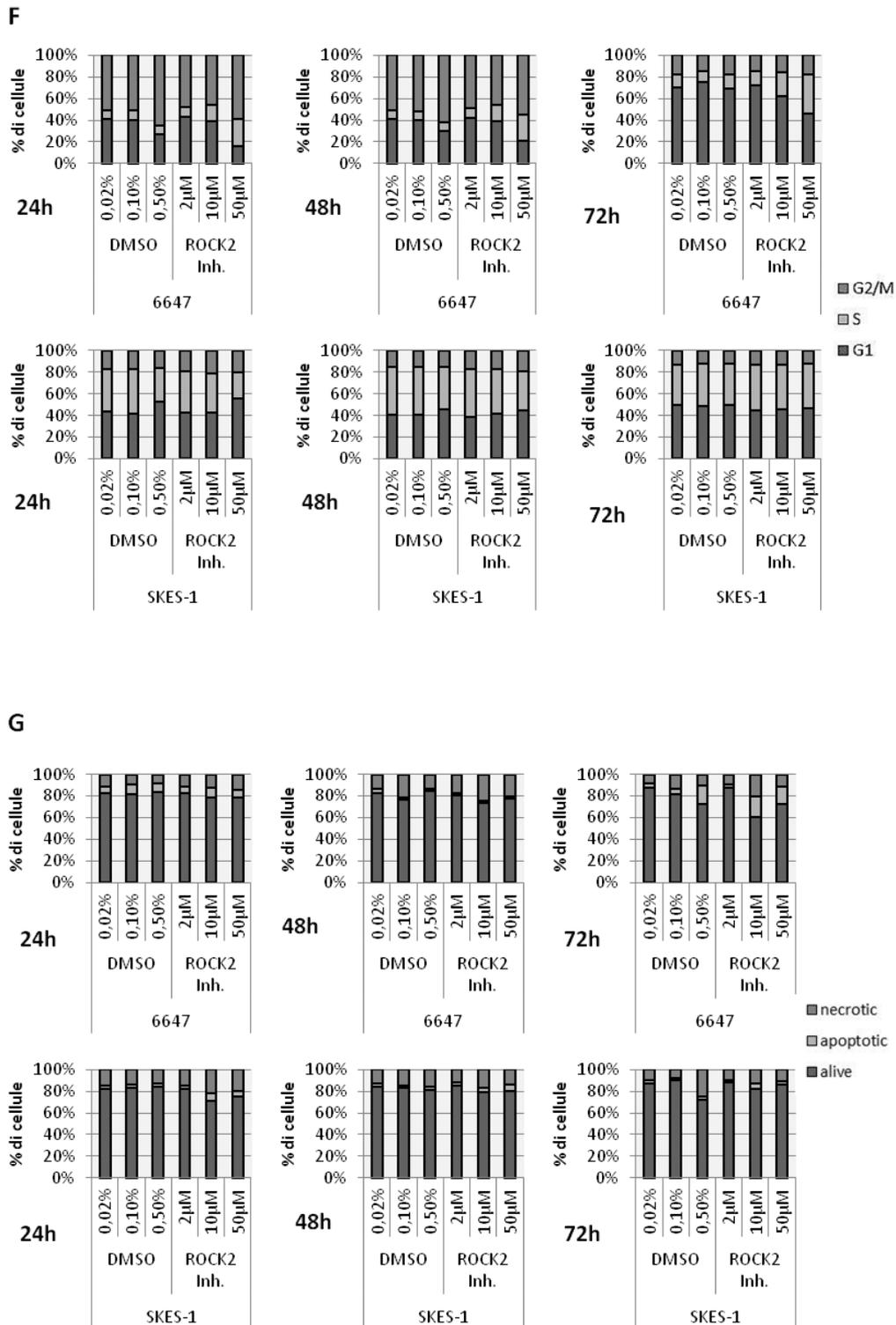


FIGURA 14. Test *in vitro* del pan-inibitore di ROCK (Y27632) su linee di sarcoma di Ewing. (A) L'esposizione all'inibitore specifico per ROCK2 e al pan-inibitore Y27632 (2 µM, 10 µM) altera la morfologia cellulare. Le cellule sono state fotografate dopo 24 ore di trattamento (ingrandimento 10 X). (B) Effetti dell'inibitore specifico per ROCK2 e del pan-inibitore Y27632 (10 µM) sulla capacità migratoria e sulla capacità di crescita in assenza di ancoraggio (C) delle

linee cellulari 6647 e SKES-1. Le colonne rappresentano la media \pm ES delle variazioni rispetto al controllo (fold change) di almeno due esperimenti, la significatività è calcolata mediante test T student per dati appaiati (* P value < 0.05; ** P value < 0.001). **(D)** Valutazione del ciclo cellulare sulle linee 6647 e SKES-1 esposte a dosi crescenti del pan-inibitore Y27632 (2 μ M, 10 μ M, 50 μ M) dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento. **(E)** Valutazione dell'induzione di apoptosi sulle linee 6647 e SKES-1 esposte a dosi crescenti del pan-inibitore Y27632 (2 μ M, 10 μ M, 50 μ M) dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento. **(F)** Valutazione del ciclo cellulare su 6647 e SKES-1 esposte a dosi crescenti dell'inibitore specifico per ROCK2 (2 μ M, 10 μ M, 50 μ M) dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento. **(G)** Valutazione dell'induzione di apoptosi su 6647 e SKES-1 esposte a dosi crescenti dell'inibitore specifico per ROCK2 (2 μ M, 10 μ M, 50 μ M) dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento. I grafici mostrano i risultati di singoli esperimenti rappresentativi.

DISCUSSIONE

Il ruolo oncosoppressore di CD99 nell'ambito dell'OS umano è stato recentemente confermato da Zhou e colleghi: l'analisi immunohistochimica su una casistica di 130 pazienti ha dimostrato che l'antigene è moderatamente o debolmente espresso nelle cellule tumorali e che, rispetto al corrispondente tessuto sano, risulta essere significativamente down-regolato. La perdita di espressione di CD99 correla inoltre significativamente sia con fattori prognostici sfavorevoli, quali la presenza di metastasi e la scarsa risposta alla chemioterapia, sia con un minore tasso di sopravvivenza nei pazienti affetti da OS (Zhou *et al.*, 2014).

La regolazione dei processi di adesione e di migrazione cellulare è una componente essenziale della diffusione metastatica. Nonostante le cellule possiedano un ampio spettro di meccanismi di migrazione ed invasione, sono stati descritti due modi principali mediante cui le cellule tumorali invadono i tessuti circostanti: la migrazione di tipo ameboide, caratterizzata da cellule dalla morfologia tondeggianti con un'elevata tensione corticale e scarsa adesione alla matrice extracellulare, che è dipendente dalla contrattilità acto-miosinica indotta dalla segnalazione via Rho e ROCK, e la migrazione di tipo mesenchimale, con cellule dalla morfologia allungata caratterizzate dalla presenza di fibre da stress, che è dipendente dalla proteolisi extracellulare (Pankova *et al.*, 2010). Nonostante queste due modalità di migrazione possano essere facilmente distinte *in vitro*, le evidenze sperimentali suggeriscono che esse non sono mutuamente esclusive e che le cellule possono passare da una modalità all'altra in risposta alle variazioni nel microambiente (Wolf *et al.*, 2003). Le giunzioni intercellulari non vengono mantenute né nella migrazione mesenchimale né in quella ameboide e il rimodellamento del citoscheletro di actina ha un ruolo fondamentale in

entrambi i processi. Infatti, il primo passo nel processo di migrazione cellulare è rappresentato proprio da un rimodellamento dinamico dei microfilamenti di actina del citoscheletro che, nel movimento di tipo mesenchimale permette la formazione di protrusioni cellulari che aderiscono alla matrice extracellulare, mentre nel movimento di tipo ameboide genera le forze contrattili che muovono la cellula (*Pankova et al., 2010*). Questi eventi sono guidati da una dinamica e complessa rete di mediatori intracellulari, che spesso funziona in maniera cellula-specifica. Interferendo con gli elementi che governano questi meccanismi e controllano la migrazione cellulare si può compromettere la capacità opportunistica delle cellule tumorali di invadere i tessuti circostanti e metastatizzare in organi distanti, e ciò rappresenta un passo fondamentale nell'ottica di un intervento terapeutico mirato.

In questo lavoro, abbiamo dimostrato che l'espressione forzata di CD99 wt nelle cellule di OS umano induce la formazione di giunzioni aderenti e il reclutamento di N-caderina e di β -catenina a livello della membrana cellulare. Le caderine classiche sono una famiglia di molecole che mediano l'interazione cellula-cellula tramite il proprio dominio extracellulare, mentre il loro dominio citoplasmatico si lega a proteine quali α - e β -catenina per comunicare con il citoscheletro di actina. Nell'OS la N-caderina si comporta come un oncosoppressore, inibendo la migrazione cellulare e la formazione di metastasi. N-caderina e β -catenina sono espresse sulla superficie degli osteoblasti normali, mentre vengono down-regolate nelle cellule di OS (*Kashima et al., 1999; Marie et al., 2002*). La riespressione di N-caderina nelle cellule di OS non altera la capacità proliferativa, ma compromette la capacità migratoria *in vitro* e la capacità metastatica *in vivo* (*Kashima et al., 2003*). È stato inoltre descritto che nella linea

cellulare Saos-2 l'espressione di N-caderina aumenta quando le cellule vengono indotte a differenziare in senso osteoblastico (*Ferrari et al., 2000*), questo processo sembra inoltre favorito dall'espressione ectopica di CD99 wt (*Sciandra et al., 2014*). Tali evidenze rafforzano ulteriormente l'ipotesi che l'azione oncosoppressiva di CD99 sia almeno in parte sostenuta dalla capacità di questa molecola di modulare le componenti delle giunzioni aderenti nelle cellule di OS umano.

La β -catenina, oltre a svolgere un ruolo importante nella formazione delle giunzioni intercellulari, rappresenta il principale mediatore della via di segnalazione canonica di Wnt. Dai nostri risultati emerge che nelle cellule di OS, indipendentemente dall'espressione di CD99, la via canonica di Wnt è funzionante ma non è attiva, in accordo con quanto precedentemente descritto (*Cai et al., 2009*). La riattivazione di questa via di segnalazione promuove il differenziamento oppure, nelle linee cellulari incapaci di differenziare, compromette la capacità proliferativa (*Cai et al., 2009*). Questi risultati suggeriscono che la β -catenina nell'ambito dell'OS umano abbia un ruolo predominante nell'adesione cellulare e che il CD99 sia in grado di influenzare principalmente questa funzione della proteina più che la sua attività di regolatore trascrizionale.

Oltre al reclutamento in membrana di β -catenina ed N-caderina, l'espressione forzata di CD99 wt nelle cellule di OS umano, risulta anche in grado di indurre la repressione di geni cruciali per il rimodellamento del citoscheletro di actina come ARP2, ARPC1A (entrambi appartenenti al complesso di nucleazione dell'actina Arp2/3) e ROCK2. L'invasività delle cellule tumorali in diversi modelli sperimentali è sostenuta dal processo di nucleazione dell'actina mediato dal complesso Arp2/3 (*Nurnberg et al.,*

2011). Infatti, una marcata espressione di ARP2 è stata evidenziata nelle cellule tumorali e stromali da campioni di cancro coloretale (*Otsubo et al., 2004*). Inoltre, è stato riportato che il silenziamento di ARPC1A nelle cellule tumorali del pancreas induce una drammatica riduzione dell'invasività cellulare (*Laurila et al., 2009*). In accordo con queste considerazioni, abbiamo osservato che ARP2 e ARPC1 sono down-regolati quando le cellule di OS acquisiscono l'espressione di CD99 wt, parallelamente alla riduzione della loro capacità migratoria.

Poiché la riorganizzazione dinamica del citoscheletro di actina costituisce la forza che guida la migrazione cellulare, non è sorprendente che ROCK2, un effettore a valle delle piccole GTPasi monomeriche della famiglia di Rho, sia implicata nella regolazione degli effetti indotti da CD99 sulla migrazione delle cellule di OS. Le proteine della famiglia di Rho sono note infatti per avere un ruolo fondamentale nell'invasione tumorale e nella metastatizzazione, in virtù della loro capacità di regolare sia la polimerizzazione dell'actina all'estremità trainante della cellula che migra, sia la formazione di fibre da stress e il turn-over delle adesioni focali (*Hall et al., 2000; Ridley et al., 2003*).

Il dominio catalitico delle due isoforme ROCK1 e ROCK2 condivide l'87% di omologia di sequenza (*Rath et al., 2012*), pertanto generalmente si presume che le due molecole abbiano le stesse funzioni; è emerso tuttavia che le due chinasi da un punto di vista funzionale non sono equivalenti: la deplezione di ROCK2 accelera l'assemblaggio dei fasci di microfilamenti di actina a formare fibre da stress e la formazione di adesioni focali, mentre la deplezione di ROCK1 induce una variazione opposta del fenotipo (*Yoneda et al., 2005; Yoneda et al., 2007; Lock et al., 2012*). In seguito all'inibizione di ROCK sono stati descritti sia l'aumento che la riduzione del tasso di migrazione, in base

al tipo cellulare (Lee et al., 2010; Jaganathan et al., 2007; Borensztajn et al., 2010; Salhia et al., 2005; Zhang et al., 2011). I nostri risultati mostrano una down-regolazione di ROCK2 nelle cellule che esprimono CD99 wt, e tale modulazione è associata con il cambiamento del comportamento migratorio e adesivo di queste cellule. I cloni in cui l'attività di ROCK2 è inibita e le cellule deprivate dell'espressione di ROCK2 mostrano una ridotta migrazione cellulare, un aumento dell'adesione cellula-cellula e del reclutamento di componenti delle giunzioni aderenti come l'N-caderina e la β -catenina a livello della membrana cellulare.

Questo risultato è in linea con quanto emerso da altri studi che mostrano come l'attivazione di ROCK2 possa portare alla dissociazione delle giunzioni aderenti, alla disaggregazione dei cluster cellulari e ad una maggiore motilità (Croft et al., 2004). Inoltre, l'elevata espressione di ROCK2 è stata associata con una maggiore invasività e con la progressione tumorale in diversi tipi di cancro, inclusi il carcinoma del colon e della vescica, i tumori delle cellule germinali dei testicoli e il carcinoma epatocellulare (Kamai et al., 2003; Vishnubhotla et al., 2007; Kamai et al., 2004; Wong et al., 2009).

Considerati nel loro insieme i dati emersi dalla sperimentazione *in vitro* supportano l'ipotesi che il ruolo oncosoppressore esercitato da CD99 wt nell'OS sia mediato dalla soppressione della chinasi ROCK2. In linea con queste evidenze, la repressione di ROCK2 nelle cellule di OS, al pari dell'espressione ectopica di CD99 wt, compromette in parte la capacità tumorigenica delle cellule neoplastiche, ma soprattutto ne riduce drammaticamente la disseminazione metastatica nei topi xenotrapiantati; tale evidenza rende l'impiego di inibitori di ROCK2 una strategia attraente per prevenire la disseminazione metastatica dell'OS.

Il trattamento *in vitro* con il pan-inibitore Y27632, rispetto all'inibitore specifico per l'isoforma ROCK2, risulta meno efficace nel contrastare la motilità cellulare, e questo risultato conferma il ruolo predominante di ROCK2 nella mediazione della motilità nelle cellule di OS. Schofield e colleghi hanno recentemente dimostrato che l'espressione dell'isoforma ROCK1 induce un aumento dell'espressione di β -catenina nella linea di OS U-2 OS (Schofield *et al.*, 2013). Questa osservazione potrebbe almeno in parte giustificare la riduzione dell'impatto del pan-inibitore rispetto all'inibitore specifico sulla motilità cellulare.

Per quanto riguarda il meccanismo con cui il CD99 modula l'espressione di ROCK2, i nostri risultati suggeriscono un coinvolgimento del microRNA-138, di cui ROCK2 è bersaglio documentato (Lu Jiang *et al.*, 2010) e i cui livelli aumentano nelle cellule che esprimono il CD99 wt rispetto alle linee parentali.

È interessante notare che anche nelle cellule di sarcoma di Ewing, modello in cui la molecola CD99 svolge una funzione chiaramente oncogenica, la deplezione specifica di ROCK2 compromette la capacità migratoria e la capacità di crescita ancoraggio-indipendente. Questo risultato sostiene l'ipotesi che ROCK2 abbia nei sarcomi muscolo-scheletrici un ruolo cruciale nella determinazione del potenziale metastatico, a prescindere dal ruolo oncogenico/oncosoppressore svolto da CD99.

Dati pregressi indicano che le due isoforme di CD99 influenzano in maniera opposta la migrazione e la metastatizzazione nelle cellule di OS (Scotlandi *et al.*, 2007): mentre CD99 wt agisce da potente soppressore di questi processi, le cellule che esprimono CD99 sh riacquisiscono o aumentano le loro capacità migratorie e metastatiche. In questo studio, abbiamo evidenziato che questo comportamento opposto non solo è

associato all'espressione differenziale di ROCK2 ma anche dell'eZRina, una proteina multifunzionale che regola l'adesione cellulare e la motilità connettendo il citoscheletro di actina alla matrice extracellulare (Yu et al., 2011). Dati clinici hanno indicato l'esistenza di un'associazione positiva tra l'espressione di eZRina e la progressione tumorale in diverse neoplasie (Bruce et al., 2007). In particolare l'eZRina è generalmente espressa a più alti livelli nei sarcomi rispetto ai carcinomi e sembra essere necessaria per la metastatizzazione dell'OS (Khanna et al., 2004), tanto che l'uso di molecole inibitorie dell'eZRina è stato recentemente proposto come approccio terapeutico per prevenire la disseminazione metastatica dell'OS (Bulut et al., 2012).

Le cellule di OS comunemente non esprimono CD99, ma presentano elevati livelli di eZRina. Al contrario, gli osteoblasti e gli osteociti nella matrice ossea generalmente esprimono CD99 ad alti livelli (Manara et al., 2006), ma esibiscono scarsa immunoreattività alle proteine della famiglia ERM (Nakamura et al., 1996). La riespressione di CD99 wt, riduce non solo i livelli proteici di eZRina, ma anche della sua forma fosforilata. La fosforilazione in Thr 567 dell'eZRina è un evento importante per la sua attivazione conformazionale (Fievet et al., 2004; Hamada et al., 2000). Sebbene sia stato dimostrato un legame diretto fra CD99 e diverse proteine legate all'adesione, come CD44 o CD95, la molecola CD99 non sembra essere direttamente associata all'eZRina nelle cellule di OS. La nostra ipotesi è che il CD99 possa regolare l'attività dell'eZRina in modo indiretto, probabilmente anche attraverso ROCK2.

Recenti evidenze suggeriscono che un'asse di segnalazione cSrc/Akt/ROCK2 regola lo stato dell'eZRina nei fibroblasti e nelle cellule tumorali (Zheng et al., 2011). Inoltre è stato precedentemente documentato come le due isoforme di CD99 siano in grado di

influenzare in modo opposto l'attività della chinasi cSrc (*Scotlandi et al., 2007*). In questo studio si evidenzia come l'inibizione delle funzioni di cSrc sia associata alla repressione di ROCK2 e all'inibizione dell'ezrina. In questa azione il residuo Ser 168 della molecola CD99 ha un ruolo critico: le cellule il cui CD99 manca di questo residuo, a causa di specifiche mutazioni o di delezioni di porzioni maggiori del frammento intracitoplasmatico, non sono in grado di formare il complesso CD99/caveolina-1/cSrc, che è necessario per mantenere cSrc nella sua conformazione inattiva (*Scotlandi et al., 2007*). In linea con la riacquisizione dell'attività di cSrc, nei mutanti Ser 168 si osserva il ripristino dell'espressione di ROCK2, ezrina e fosfo-ezrina, parallelamente al recupero della elevata capacità migratoria. Nei cloni CD99 wt i livelli di fosfo-ezrina sono ridotti parallelamente ai livelli di ezrina, indicando che ROCK2 influenza l'ezrina regolandone anche l'espressione oltre che l'attività, sebbene il meccanismo con cui questo avviene sia ancora da chiarire.

CONCLUSIONI

Con questo studio abbiamo dimostrato che il ruolo oncosoppressivo del CD99 nelle cellule di OS umano, recentemente confermato in ambito clinico anche da altri autori, si esplica mediante modulazione dei processi di adesione e di motilità cellulare, ed è mediato dall'inibizione della chinasi ROCK2. Il CD99 wt, attraverso l'inibizione dell'attività di cSrc e ROCK2, induce uno switch nell'espressione di molecole di superficie che regolano la riorganizzazione del citoscheletro di actina e il movimento cellulare (Figura 15). In particolare, quando l'asse cSrc/ROCK2 è inibito, l'ezrina decresce o addirittura scompare, mentre la N-caderina e la β -catenina traslocano in membrana e funzionano da ponti molecolari per il citoscheletro di actina. Favorendo dunque il reclutamento in membrana di N-caderina e β -catenina, la formazione di giunzioni aderenti e interazioni cellula-cellula stabili, la riespressione di CD99 wt aumenta la forza dei contatti intercellulari e riattiva segnali anti-migratori che contrastano l'azione pro-migratoria, altrimenti dominante, dell'ezrina nelle cellule di OS umano.

Se si pensa che il 10-20% dei pazienti affetti da OS presenta metastasi evidenti alla diagnosi, che circa il 30% dei pazienti con tumore localizzato sviluppa recidive e metastasi dopo il trattamento e che la principale causa di morte tra i pazienti affetti da questa neoplasia è rappresentata da insufficienza respiratoria dovuta alla presenza di metastasi polmonari, si intuisce facilmente l'importanza di individuare nuovi bersagli terapeutici per contrastare la diffusione metastatica dell'OS. I risultati di questo studio indicano che la repressione di ROCK2, attraverso l'utilizzo di molecole ad attività inibitoria, rappresenta un buon approccio per contrastare le proprietà migratorie e

invasive delle cellule di OS che sostengono la elevata capacità metastatica di tale neoplasia.

Inoltre abbiamo messo in evidenza che l'ablazione di ROCK2 potrebbe avere una rilevanza terapeutica anche per i tumori della famiglia di Ewing, per i quali, analogamente a quanto descritto per l'OS, la disseminazione metastatica rappresenta uno dei principali limiti dal punto di vista terapeutico.

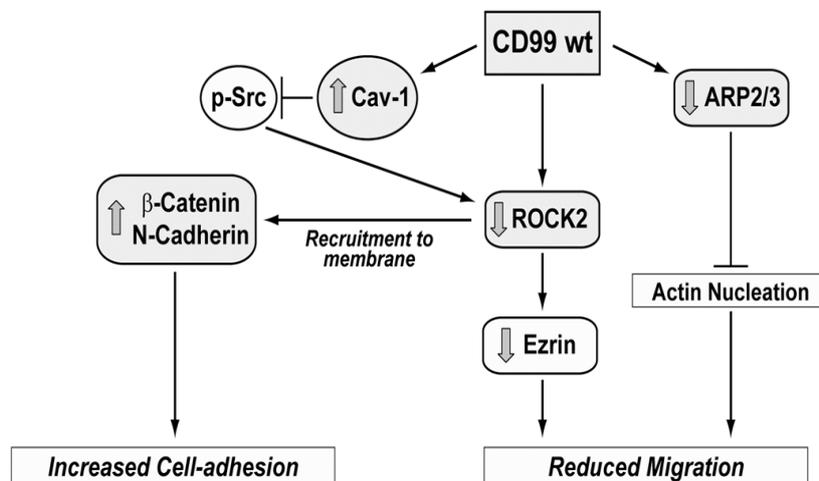


FIGURA 15. Rappresentazione schematica degli effetti di CD99 wt sulla capacità adesiva e migratoria delle cellule di OS umano. L'inibizione dell'asse cSrc/ROCK2 causata dall'espressione di CD99 wt inibisce l'ezrina e induce il reclutamento in membrana di β-catenina e di N-caderina.

BIBLIOGRAFIA

Alberti I, Bernard G, Rouquette-Jazdanian AK, Pelassy C, Pourtein M, Aussel C, Bernard A. *CD99 isoforms expression dictates T cell functional outcomes*. FASEB J. 2002 Dec;16(14):1946-8. Epub 2002 Oct 4.

Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M. *MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration*. Cancer. 1991 Apr 1;67(7):1886-93.

Anne-Marie Cleton-Jansen, Horst Buerger, Pancras C.W. Hogendoorn. *Central high-grade osteosarcoma of bone: Diagnostic and genetic considerations*. Current Diagnostic Pathology. 2005 Dec; 11(6):390-399, ISSN 0968-6053.

Aubrit F, Gelin C, Pham D, Raynal B, Bernard A. *The biochemical characterization of E2, a T cell surface molecule involved in rosettes*. Eur J Immunol. 1989 Aug;19(8):1431-6.

Aussel C, Bernard G, Breittmayer JP, Pelassy C, Zoccola D, Bernard A. *Monoclonal antibodies directed against the E2 protein (MIC2 gene product) induce exposure of phosphatidylserine at the thymocyte cell surface*. Biochemistry. 1993 Sep 28;32(38):10096-101.

Bacci G, Ferrari S, Lari S, Mercuri M, Donati D, Longhi A, Forni C, Bertoni F, Versari M, Pignotti E. *Osteosarcoma of the limb. Amputation or limb salvage in patients treated by neoadjuvant chemotherapy*. J Bone Joint Surg Br. 2002 Jan;84(1):88-92. No abstract available.

Banting GS, Pym B, Goodfellow PN. *Biochemical analysis of an antigen produced by both human sex chromosomes*. EMBO J. 1985 Aug;4(8):1967-72.

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 Feb 9;80(4):581-8.

Bernard A, Aubrit F, Raynal B, Pham D, Boumsell L. *A T cell surface molecule different from CD2 is involved in spontaneous rosette formation with erythrocytes*. J Immunol. 1988 Mar 15;140(6):1802-7.

Bernard G, Breittmayer JP, de Matteis M, Trampont P, Hofman P, Senik A, Bernard A. *Apoptosis of immature thymocytes mediated by E2/CD99*. J Immunol. 1997 Mar 15;158(6):2543-50.

Bernard G, Zoccola D, Deckert M, Breittmayer JP, Aussel C, Bernard A. *The E2 molecule (CD99) specifically triggers homotypic aggregation of CD4+ CD8+ thymocytes*. J Immunol. 1995 Jan 1;154(1):26-32.

Bertaux K, Broux O, Chauveau C, Jeanfils J, Devedjian JC. *Identification of CBFA1-regulated genes on SaOs-2 cells*. J Bone Miner Metab. 2005;23(2):114-22.

Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA. *Coagulation Factor Xa inhibits cancer cell migration via LIMK1-mediated cofilin inactivation*. Thromb Res. 2010 Jun;125(6):e323-8. doi: 10.1016/j.thromres.2010.02.018. Epub 2010 Mar 26.

Brown RE, Boyle JL. *Mesenchymal chondrosarcoma: molecular characterization by a proteomic approach, with morphogenic and therapeutic implications*. Ann Clin Lab Sci. 2003 Spring;33(2):131-41.

Bruce B, Khanna G, Ren L, Landberg G, Jirström K, Powell C, Borczuk A, Keller ET, Wojno KJ, Meltzer P, Baird K, McClatchey A, Bretscher A, Hewitt SM, Khanna C. *Expression of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers*. Clin Exp Metastasis. 2007;24(2):69-78. Epub 2007 Mar 17.

Bulut G, Hong SH, Chen K, Beauchamp EM, Rahim S, Kosturko GW, Glasgow E, Dakshanamurthy S, Lee HS, Daar I, Toretsky JA, Khanna C, Uren A. *Small molecule inhibitors of ezrin inhibit the invasive phenotype of osteosarcoma cells*. Oncogene. 2012 Jan 19;31(3):269-81. doi: 10.1038/onc.2011.245. Epub 2011 Jun 27.

Buxton D, Bacchi CE, Gualco G, Weiss LM, Zuppan CW, Rowsell EH, Huang Q, Wang J. *Frequent expression of CD99 in anaplastic large cell lymphoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 160 cases*. Am J Clin Pathol. 2009 Apr;131(4):574-9. doi: 10.1309/AJCPE68HZXCGWTKK.

Cai Y, Mohseny AB, Karperien M, Hogendoorn PC, Zhou G, Cleton-Jansen AM. *Inactive Wnt/beta-catenin pathway in conventional high-grade osteosarcoma*. J Pathol. 2010 Jan;220(1):24-33. doi: 10.1002/path.2628.

Campanacci M. *Bone and Soft Tissue Tumors*. Wien: Springer-Verlag, 463-491(1999).

Cerisano V, Aalto Y, Perdichizzi S, Bernard G, Manara MC, Benini S, Cenacchi G, Preda P, Lattanzi G, Nagy B, Knuutila S, Colombo MP, Bernard A, Picci P, Scotlandi K. *Molecular mechanisms of CD99-induced caspase-independent cell death and cell-cell adhesion in Ewing's sarcoma cells: actin and zyxin as key intracellular mediators*. Oncogene. 2004 Jul 22;23(33):5664-74.

Cheng SL, Lecanda F, Davidson MK, Warlow PM, Zhang SF, Zhang L, Suzuki S, St John T, Civitelli R. *Human osteoblasts express a repertoire of cadherins, which are critical for BMP-2-induced osteogenic differentiation*. J Bone Miner Res. 1998 Apr;13(4):633-44.

Cho EY, Choi Y, Chae SW, Sohn JH, Ahn GH. *Immunohistochemical study of the expression of adhesion molecules in ovarian serous neoplasms*. Pathol Int. 2006 Feb;56(2):62-70.

Choi EY, Park WS, Jung KC, Kim SH, Kim YY, Lee WJ, Park SH. *Engagement of CD99 induces up-regulation of TCR and MHC class I and II molecules on the surface of human thymocytes.* J Immunol. 1998 Jul 15;161(2):749-54.

Croft DR, Sahai E, Mavria G, Li S, Tsai J, Lee WM, Marshall CJ, Olson MF. *Conditional ROCK activation in vivo induces tumor cell dissemination and angiogenesis.* Cancer Res. 2004 Dec 15;64(24):8994-9001.

Darling SM, Banting GS, Pym B, Wolfe J, Goodfellow PN. *Cloning an expressed gene shared by the human sex chromosomes.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Jan;83(1):135-9.

Dworzak MN, Fritsch G, Buchinger P, Fleischer C, Printz D, Zellner A, Schöllhammer A, Steiner G, Ambros PF, Gadner H. *Flow cytometric assessment of human MIC2 expression in bone marrow, thymus, and peripheral blood.* Blood. 1994 Jan 15;83(2):415-25.

Dworzak MN, Fritsch G, Fleischer C, Printz D, Fröschl G, Buchinger P, Mann G, Gadner H. *CD99 (MIC2) expression in paediatric B-lineage leukaemia/lymphoma reflects maturation-associated patterns of normal B-lymphopoiesis.* Br J Haematol. 1999 Jun;105(3):690-5.

Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Zen LD, Gaipa G, Ratei R, Basso G, Biondi A, Ludwig WD, Gadner H. *CD99 expression in T-lineage ALL: implications for flow cytometric detection of minimal residual disease.* Leukemia. 2004 Apr;18(4):703-8.

Engels EA. *Cancer risk associated with receipt of vaccines contaminated with simian virus 40: epidemiologic research.* Expert Rev Vaccines. 2005 Apr;4(2):197-206. Review.

Ferrari S. *Chemotherapy in Osteosarcoma.* Springer International Publishing 2014. Picci P, Manfrini M, Fabbri N, Gambarotti M, Vanel D. (Eds.): Atlas of Musculoskeletal Tumors and Tumorlike Lesions, The Rizzoli Case Archive.

Ferrari SL, Traianedes K, Thorne M, Lafage-Proust MH, Genever P, Cecchini MG, Behar V, Bisello A, Chorev M, Rosenblatt M, Suva LJ. *A role for N-cadherin in the development of the differentiated osteoblastic phenotype.* J Bone Miner Res. 2000 Feb;15(2):198-208.

Fievet BT, Gautreau A, Roy C, Del Maestro L, Mangeat P, Louvard D, Arpin M. *Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin.* J Cell Biol. 2004 Mar 1;164(5):653-9.

Finkel MP, Biskis BO, Jinkins PB. *Virus induction of osteosarcomas in mice.* Science. 1966 Feb 11;151(3711):698-701.

Fisher C. *Synovial sarcoma.* Ann Diagn Pathol. 1998 Dec;2(6):401-21. Review.

Fouchet C, Gane P, Huet M, Fellous M, Rouger P, Banting G, Cartron JP, Lopez C. *A study of the coregulation and tissue specificity of XG and MIC2 gene expression in eukaryotic cells.* Blood. 2000 Mar 1;95(5):1819-26.

Fuchs B, Pritchard DJ. *Etiology of osteosarcoma.* Clin Orthop Relat Res. 2002 Apr;(397):40-52. Review.

Gelin C, Aubrit F, Phalipon A, Raynal B, Cole S, Kaczorek M, Bernard A. *The E2 antigen, a 32 kd glycoprotein involved in T-cell adhesion processes, is the MIC2 gene product.* EMBO J. 1989 Nov;8(11):3253-9.

Goodfellow P, Banting G, Levy R, Povey S, McMichael A. *A human X-linked antigen defined by a monoclonal antibody.* Somatic Cell Genet. 1980 Nov;6(6):777-87.

Goodfellow P, Banting G, Sheer D, Ropers HH, Caine A, Ferguson-Smith MA, Povey S, Voss R. *Genetic evidence that a Y-linked gene in man is homologous to a gene on the X chromosome.* Nature. 1983 Mar 24-30;302(5906):346-9.

Goodfellow P, Pym B, Mohandas T, Shapiro LJ. *The cell surface antigen locus, MIC2X, escapes X-inactivation.* Am J Hum Genet. 1984 Jul;36(4):777-82.

Goodfellow PJ, Darling SM, Thomas NS, Goodfellow PN. *A pseudoautosomal gene in man.* Science. 1986 Nov 7;234(4777):740-3.

Goto A, Niki T, Terado Y, Fukushima J, Fukayama M. *Prevalence of CD99 protein expression in pancreatic endocrine tumours (PETs).* Histopathology. 2004 Oct;45(4):384-92.

Granter SR, Renshaw AA, Fletcher CD, Bhan AK, Rosenberg AE. *CD99 reactivity in mesenchymal chondrosarcoma.* Hum Pathol. 1996 Dec;27(12):1273-6.

Grimer RJ, Taminiau AM, Cannon SR; Surgical Subcommittee of the European Osteosarcoma Intergroup. *Surgical outcomes in osteosarcoma.* J Bone Joint Surg Br. 2002 Apr;84(3):395-400.

HaDuong JH, Martin AA, Skapek SX, Mascarenhas L. *Sarcomas.* Pediatr Clin North Am. 2015 Feb;62(1):179-200. doi: 10.1016/j.pcl.2014.09.012. Review.

Hahn JH, Kim MK, Choi EY, Kim SH, Sohn HW, Ham DI, Chung DH, Kim TJ, Lee WJ, Park CK, Ree HJ, Park SH. *CD99 (MIC2) regulates the LFA-1/ICAM-1-mediated adhesion of lymphocytes, and its gene encodes both positive and negative regulators of cellular adhesion.* J Immunol. 1997 Sep 1;159(5):2250-8.

Hahn MJ, Yoon SS, Sohn HW, Song HG, Park SH, Kim TJ. *Differential activation of MAP kinase family members triggered by CD99 engagement.* FEBS Lett. 2000 Mar 31;470(3):350-4.

- Hall A, Nobes CD. *Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2000 Jul 29;355(1399):965-70. Review.
- Hamada K, Shimizu T, Matsui T, Tsukita S, Hakoshima T. *Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain*. EMBO J. 2000 Sep 1;19(17):4449-62.
- Hayden JB, Hoang BH. *Osteosarcoma: basic science and clinical implications*. Orthop Clin North Am. 2006 Jan;37(1):1-7.
- Hayden JB, Hoang BH. *Osteosarcoma: basic science and clinical implications*. Orthop Clin North Am. 2006 Jan;37(1):1-7. Review.
- Huber AH, Weis WI. *The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin*. Cell. 2001 May 4;105(3):391-402.
- Huvos AG, Woodard HQ, Cahan WG, Higinbotham NL, Stewart FW, Butler A, Bretsky SS. *Postradiation osteogenic sarcoma of bone and soft tissues. A clinicopathologic study of 66 patients*. Cancer. 1985 Mar 15;55(6):1244-55.
- Ishizawa K, Komori T, Shimada S, Hirose T. *Olig2 and CD99 are useful negative markers for the diagnosis of brain tumors*. Clin Neuropathol. 2008 May-Jun;27(3):118-28.
- Jaganathan BG, Ruester B, Dressel L, Stein S, Grez M, Seifried E, Henschler R. *Rho inhibition induces migration of mesenchymal stromal cells*. Stem Cells. 2007 Aug;25(8):1966-74. Epub 2007 May 17.
- Jiang L, Liu X, Kolokythas A, Yu J, Wang A, Heidbreder CE, Shi F, Zhou X. *Downregulation of the Rho GTPase signaling pathway is involved in the microRNA-138-mediated inhibition of cell migration and invasion in tongue squamous cell carcinoma*. Int J Cancer. 2010 Aug 1;127(3):505-12. doi: 10.1002/ijc.25320.
- Jiao X, Katiyar S, Liu M, Mueller SC, Lisanti MP, Li A, Pestell TG, Wu K, Ju X, Li Z, Wagner EF, Takeya T, Wang C, Pestell RG. *Disruption of c-Jun reduces cellular migration and invasion through inhibition of c-Src and hyperactivation of ROCK II kinase*. Mol Biol Cell. 2008 Apr;19(4):1378-90. doi: 10.1091/mbc.E07-08-0753. Epub 2008 Jan 23.
- Jung KC, Park WS, Bae YM, Hahn JH, Hahn K, Lee H, Lee HW, Koo HJ, Shin HJ, Shin HS, Park YE, Park SH. *Immunoreactivity of CD99 in stomach cancer*. J Korean Med Sci. 2002 Aug;17(4):483-9.

Kalil R, Bridge JA. *Small cell osteosarcoma*. IARC Press: Lyon 2002. Fletcher C.D.M., Unni K.K., Mertens F. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and IARC Press: Lyon 2002. Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone.

Kamai T, Tsujii T, Arai K, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H. *Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer*. Clin Cancer Res. 2003 Jul;9(7):2632-41.

Kamai T, Yamanishi T, Shirataki H, Takagi K, Asami H, Ito Y, Yoshida K. *Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer*. Clin Cancer Res. 2004 Jul 15;10(14):4799-805.

Kansara M, Thomas DM. *Molecular pathogenesis of osteosarcoma*. DNA Cell Biol. 2007 Jan;26(1):1-18. Review.

Kashima T, Kawaguchi J, Takeshita S, Kuroda M, Takanashi M, Horiuchi H, Imamura T, Ishikawa Y, Ishida T, Mori S, Machinami R, Kudo A. *Anomalous cadherin expression in osteosarcoma. Possible relationships to metastasis and morphogenesis*. Am J Pathol. 1999 Nov;155(5):1549-55.

Kashima T, Nakamura K, Kawaguchi J, Takanashi M, Ishida T, Aburatani H, Kudo A, Fukayama M, Grigoriadis AE. *Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma in vivo*. Int J Cancer. 2003 Mar 20;104(2):147-54.

Kasinrerk W, Tokrasinwit N, Moonsom S, Stockinger H. *CD99 monoclonal antibody induce homotypic adhesion of Jurkat cells through protein tyrosine kinase and protein kinase C-dependent pathway*. Immunol Lett. 2000 Jan 10;71(1):33-41.

Kempf-Bielack B, Bielack SS, Jürgens H, Branscheid D, Berdel WE, Exner GU, Göbel U, Helmke K, Jundt G, Kabisch H, Kevric M, Klingebiel T, Kotz R, Maas R, Schwarz R, Semik M, Treuner J, Zoubek A, Winkler K. *Osteosarcoma relapse after combined modality therapy: an analysis of unselected patients in the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS)*. J Clin Oncol. 2005 Jan 20;23(3):559-68.

Khanna C, Wan X, Bose S, Cassaday R, Olomu O, Mendoza A, Yeung C, Gorlick R, Hewitt SM, Helman LJ. *The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis*. Nat Med. 2004 Feb;10(2):182-6. Epub 2004 Jan 4.

Kim C, Shin E, Hong S, Chon HJ, Kim HR, Ahn JR, Hong MH, Yang WI, Roh JK, Rha SY. *Clinical value of ezrin expression in primary osteosarcoma*. Cancer Res Treat. 2009 Sep;41(3):138-44. doi: 10.4143/crt.2009.41.3.138. Epub 2009 Sep 28.

- Kim HY, Kim YM, Shin YK, Park SH, Lee W. *Solution structure of the cytoplasmic domain of human CD99 type I*. Mol Cells. 2004 Aug 31;18(1):24-9.
- Kim MK, Choi YL, Kim MK, Kim SH, Choi EY, Park WS, Bae YM, Woo SK, Park SH. *MHC class II engagement inhibits CD99-induced apoptosis and up-regulation of T cell receptor and MHC molecules in human thymocytes and T cell line*. FEBS Lett. 2003 Jul 10;546(2-3):379-84.
- Kim SH, Choi EY, Shin YK, Kim TJ, Chung DH, Chang SI, Kim NK, Park SH. *Generation of cells with Hodgkin's and Reed-Sternberg phenotype through downregulation of CD99 (Mic2)*. Blood. 1998 Dec 1;92(11):4287-95.
- Kim SH, Shin YK, Lee IS, Bae YM, Sohn HW, Suh YH, Ree HJ, Rowe M, Park SH. *Viral latent membrane protein 1 (LMP-1)-induced CD99 down-regulation in B cells leads to the generation of cells with Hodgkin's and Reed-Sternberg phenotype*. Blood. 2000 Jan 1;95(1):294-300.
- King MS, Porchia SJ, Hiatt KM. *Differentiating spitzoid melanomas from Spitz nevi through CD99 expression*. J Cutan Pathol. 2007 Jul;34(7):576-80.
- Kovar H, Dworzak M, Strehl S, Schnell E, Ambros IM, Ambros PF, Gadner H. *Overexpression of the pseudoautosomal gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor*. Oncogene. 1990 Jul;5(7):1067-70.
- Kreppel M, Aryee DN, Schaefer KL, Amann G, Kofler R, Poremba C, Kovar H. *Suppression of KCMF1 by constitutive high CD99 expression is involved in the migratory ability of Ewing's sarcoma cells*. Oncogene. 2006 May 4;25(19):2795-800.
- Laurila E, Savinainen K, Kuuselo R, Karhu R, Kallioniemi A. *Characterization of the 7q21-q22 amplicon identifies ARPC1A, a subunit of the Arp2/3 complex, as a regulator of cell migration and invasion in pancreatic cancer*. Genes Chromosomes Cancer. 2009 Apr;48(4):330-9. doi: 10.1002/gcc.20643.
- Lee EJ, Lee HG, Park SH, Choi EY, Park SH. *CD99 type II is a determining factor for the differentiation of primitive neuroectodermal cells*. Exp Mol Med. 2003 Oct 31;35(5):438-47.
- Lee HH, Tien SC, Jou TS, Chang YC, Jhong JG, Chang ZF. *Src-dependent phosphorylation of ROCK participates in regulation of focal adhesion dynamics*. J Cell Sci. 2010 Oct 1;123(Pt 19):3368-77. doi: 10.1242/jcs.071555. Epub 2010 Sep 7.
- Lee HH, Tien SC, Jou TS, Chang YC, Jhong JG, Chang ZF. *Src-dependent phosphorylation of ROCK participates in regulation of focal adhesion dynamics*. J Cell Sci. 2010 Oct 1;123(Pt 19):3368-77. doi: 10.1242/jcs.071555. Epub 2010 Sep 7.

Lee SP, Park S, Park J, Hong J, Ko YH. *Clinicopathologic characteristics of CD99-positive diffuse large B-cell lymphoma*. *Acta Haematol.* 2011;125(3):167-74. doi: 10.1159/000322551. Epub 2010 Dec 24.

Levy R, Dilley J, Fox RI, Warnke R. *A human thymus-leukemia antigen defined by hybridoma monoclonal antibodies*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Dec;76(12):6552-6.

Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS. *Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2004;14(1-2):1-41. Review.

Lock FE, Ryan KR, Poulter NS, Parsons M, Hotchin NA. *Differential regulation of adhesion complex turnover by ROCK1 and ROCK2*. *PLoS One.* 2012;7(2):e31423. doi: 10.1371/journal.pone.0031423. Epub 2012 Feb 13.

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. Epub 2006 Jul 24. Review.

Lou O, Alcaide P, Luscinskas FW, Muller WA. *CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils*. *J Immunol.* 2007 Jan 15;178(2):1136-43.

Luetke A, Meyers PA, Lewis I, Juergens H. *Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review*. *Cancer Treat Rev.* 2014 May;40(4):523-32. doi: 10.1016/j.ctrv.2013.11.006. Epub 2013 Nov 27. Review.

Mahfouz S, Aziz AA, Gabal SM, el-Sheikh S. *Immunohistochemical study of CD99 and EMA expression in endymomas*. *Medscape J Med.* 2008 Feb 19;10(2):41.

Maitra A, Hansel DE, Argani P, Ashfaq R, Rahman A, Naji A, Deng S, Geradts J, Hawthorne L, House MG, Yeo CJ. *Global expression analysis of well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms using oligonucleotide microarrays*. *Clin Cancer Res.* 2003 Dec 1;9(16 Pt 1):5988-95.

Manara MC, Bernard G, Lollini PL, Nanni P, Zuntini M, Landuzzi L, Benini S, Lattanzi G, Sciandra M, Serra M, Colombo MP, Bernard A, Picci P, Scotlandi K. *CD99 acts as an oncosuppressor in osteosarcoma*. *Mol Biol Cell.* 2006 Apr;17(4):1910-21. Epub 2006 Jan 18.

Marie PJ. *Role of N-cadherin in bone formation*. *J Cell Physiol.* 2002 Mar;190(3):297-305. Review.

Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R. *Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma*. *Oncologist.* 2004;9(4):422-41. Review.

Matsuno T, Okada K, Knuutila S. *Telangiectatic osteosarcoma*. IARC Press: Lyon 2002. Fletcher C.D.M., Unni K.K., Mertens F. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and IARC Press: Lyon 2002. Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone.

Mendoza SM, Konishi T, Miller CW. *Integration of SV40 in human osteosarcoma DNA*. Oncogene. 1998 Nov 12;17(19):2457-62.

Mentzel T, Bainbridge TC, Katenkamp D. *Solitary fibrous tumour: clinicopathological, immunohistochemical, and ultrastructural analysis of 12 cases arising in soft tissues, nasal cavity and nasopharynx, urinary bladder and prostate*. Virchows Arch. 1997 Jun;430(6):445-53.

Milanezi F, Pereira EM, Ferreira FV, Leitão D, Schmitt FC. *CD99/MIC-2 surface protein expression in breast carcinomas*. Histopathology. 2001 Dec;39(6):578-83.

Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. *Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*. Cancer. 2009 Apr 1;115(7):1531-43. doi: 10.1002/cncr.24121.

Nakamura H, Ozawa H. *Immunolocalization of CD44 and the ERM family in bone cells of mouse tibiae*. J Bone Miner Res. 1996 Nov;11(11):1715-22.

Nanni P, Nicoletti G, Landuzzi L, Croci S, Murgio A, Palladini A, Antognoli A, Ianzano ML, Stivani V, Grosso V, Maira SM, García-Echeverría C, Scotlandi K, De Giovanni C, Lollini PL. *High metastatic efficiency of human sarcoma cells in Rag2/gammac double knockout mice provides a powerful test system for antimetastatic targeted therapy*. Eur J Cancer. 2010 Feb;46(3):659-68. doi: 10.1016/j.ejca.2009.11.018. Epub 2009 Dec 22.

Nürnberg A, Kitzing T, Grosse R. *Nucleating actin for invasion*. Nat Rev Cancer. 2011 Mar;11(3):177-87. doi: 10.1038/nrc3003. Epub 2011 Feb 10. Review.

Otsubo T, Iwaya K, Mukai Y, Mizokami Y, Serizawa H, Matsuoka T, Mukai K. *Involvement of Arp2/3 complex in the process of colorectal carcinogenesis*. Mod Pathol. 2004 Apr;17(4):461-7.

Panková K, Rösel D, Novotný M, Brábek J. *The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells*. Cell Mol Life Sci. 2010 Jan;67(1):63-71. doi: 10.1007/s00018-009-0132-1. Epub 2009 Aug 26. Review.

Park CK, Shin YK, Kim TJ, Park SH, Ahn GH. *High CD99 expression in memory T and B cells in reactive lymph nodes*. J Korean Med Sci. 1999 Dec;14(6):600-6.

Pata S, Otáhal P, Brdička T, Laopajon W, Mahasongkram K, Kasinrerker W. *Association of CD99 short and long forms with MHC class I, MHC class II and tetraspanin CD81 and recruitment into immunological synapses*. BMC Res Notes. 2011 Aug 13;4:293. doi: 10.1186/1756-0500-4-293.

Pellín A, Boix-Ferrero J, Carpio D, López-Terrada D, Carda C, Navarro S, Peydró-Olaya A, Triche TJ, Llombart-Bosch A. *Molecular alterations of the RB1, TP53, and MDM2 genes in primary and xenografted human osteosarcomas*. Diagn Mol Pathol. 1997 Dec;6(6):333-41.

Pelosi G, Fraggetta F, Sonzogni A, Fazio N, Cavallon A, Viale G. *CD99 immunoreactivity in gastrointestinal and pulmonary neuroendocrine tumours*. Virchows Arch. 2000 Sep;437(3):270-4.

Picci P. *Osteosarcoma (osteogenic sarcoma)*. Orphanet J Rare Dis. 2007 Jan 23;2:6. Review.

Picci P. *Osteosarcomas*. Springer International Publishing 2014. Picci P, Manfrini M, Fabbri N, Gambarotti M, Vanel D. (Eds.): Atlas of Musculoskeletal Tumors and Tumorlike Lesions, The Rizzoli Case Archive.

Price CH. *Primary bone-forming tumours and their relationship to skeletal growth*. J Bone Joint Surg Br. 1958 Aug;40-B(3):574-93.

Ramani P, Rampling D, Link M. *Immunocytochemical study of 12E7 in small round-cell tumours of childhood: an assessment of its sensitivity and specificity*. Histopathology. 1993 Dec;23(6):557-61.

Rath N, Olson MF. *Rho-associated kinases in tumorigenesis: re-considering ROCK inhibition for cancer therapy*. EMBO Rep. 2012 Oct;13(10):900-8. doi: 10.1038/embor.2012.127. Epub 2012 Sep 11. Review.

Raymond AK, Ayala AG, Knuutila S. *Conventional osteosarcoma*. IARC Press: Lyon 2002. Fletcher C.D.M., Unni K.K., Mertens F. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science. 2003 Dec 5;302(5651):1704-9. Review.

Riggi N, Stamenkovic I. *The Biology of Ewing sarcoma*. Cancer Lett. 2007 Aug 28;254(1):1-10. Epub 2007 Jan 23. Review.

Rivat C, De Wever O, Bruyneel E, Mareel M, Gespach C, Attoub S. *Disruption of STAT3 signaling leads to tumor cell invasion through alterations of homotypic cell-cell adhesion complexes*. Oncogene. 2004 Apr 22;23(19):3317-27.

Rocchi A, Manara MC, Sciandra M, Zambelli D, Nardi F, Nicoletti G, Garofalo C, Meschini S, Astolfi A, Colombo MP, Lessnick SL, Picci P, Scotlandi K. *CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis*. J Clin Invest. 2010 Mar;120(3):668-80. doi: 10.1172/JCI36667. Epub 2010 Feb 8.

Roura S, Miravet S, Piedra J, García de Herreros A, Duñach M. *Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation*. J Biol Chem. 1999 Dec 17;274(51):36734-40.

Rozeman LB, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PC. *Pathology of primary malignant bone and cartilage tumours*. Int Orthop. 2006 Dec;30(6):437-44. Epub 2006 Aug 30. Review.

Salhia B, Rutten F, Nakada M, Beaudry C, Berens M, Kwan A, Rutka JT. *Inhibition of Rho-kinase affects astrocytoma morphology, motility, and invasion through activation of Rac1*. Cancer Res. 2005 Oct 1;65(19):8792-800.

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

Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA. *CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions*. Nat Immunol. 2002 Feb;3(2):143-50. Epub 2002 Jan 14.

Schofield AV, Gamell C, Bernard O. *Tubulin polymerization promoting protein 1 (TPPP1) increases β -catenin expression through inhibition of HDAC6 activity in U2OS osteosarcoma cells*. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jul 12;436(4):571-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.076. Epub 2013 May 29.

Sciandra M, Marino MT, Manara MC, Guerzoni C, Grano M, Oranger A, Lucarelli E, Lollini PL, Dozza B, Pratelli L, Renzo MF, Colombo MP, Picci P, Scotlandi K. *CD99 drives terminal differentiation of osteosarcoma cells by acting as a spatial regulator of ERK 1/2*. J Bone Miner Res. 2014;29(5):1295-309. doi: 10.1002/jbmr.2141.

Scotlandi K, Baldini N, Cerisano V, Manara MC, Benini S, Serra M, Lollini PL, Nanni P, Nicoletti G, Bernard G, Bernard A, Picci P. *CD99 engagement: an effective therapeutic strategy for Ewing tumors*. Cancer Res. 2000 Sep 15;60(18):5134-42.

Scotlandi K, Manara MC, Nicoletti G, Lollini PL, Lukas S, Benini S, Croci S, Perdichizzi S, Zambelli D, Serra M, García-Echeverría C, Hofmann F, Picci P. *Antitumor activity of the insulin-like growth factor-1 receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 in musculoskeletal tumors*. Cancer Res. 2005 May 1;65(9):3868-76.

Scotlandi K, Manara MC, Strammiello R, Landuzzi L, Benini S, Perdichizzi S, Serra M, Astolfi A, Nicoletti G, Lollini PL, Bertoni F, Nanni P, Picci P. *C-kit receptor expression in Ewing's sarcoma: lack of prognostic value but therapeutic targeting opportunities in appropriate conditions.* J Clin Oncol. 2003 May 15;21(10):1952-60.

Scotlandi K, Zuntini M, Manara MC, Sciandra M, Rocchi A, Benini S, Nicoletti G, Bernard G, Nanni P, Lollini PL, Bernard A, Picci P. *CD99 isoforms dictate opposite functions in tumour malignancy and metastases by activating or repressing c-Src kinase activity.* Oncogene. 2007 Oct 11;26(46):6604-18. Epub 2007 Apr 30.

Seol HJ, Chang JH, Yamamoto J, Romagnuolo R, Suh Y, Weeks A, Agnihotri S, Smith CA, Rutka JT. *Overexpression of CD99 Increases the Migration and Invasiveness of Human Malignant Glioma Cells.* Genes Cancer. 2012 Sep;3(9-10):535-49. doi: 10.1177/1947601912473603.

Shin SJ, Lee H, Jung G, Gil M, Park H, Park YS, Yoon DH, Suh C, Park CJ, Huh J, Park CS. *Expression of CD99 in Multiple Myeloma: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of 170 Cases.* Korean J Pathol. 2014 Jun;48(3):209-16. doi: 10.4132/KoreanJPathol.2014.48.3.209. Epub 2014 Jun 26.

Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, Kotb M, Gillies SD, King M, Mangada J, Greiner DL, Handgretinger R. *Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells.* J Immunol. 2005 May 15;174(10):6477-89.

Smith MJ, Goodfellow PJ, Goodfellow PN. *The genomic organisation of the human pseudoautosomal gene MIC2 and the detection of a related locus.* Hum Mol Genet. 1993 Apr;2(4):417-22.

Sohn HW, Choi EY, Kim SH, Lee IS, Chung DH, Sung UA, Hwang DH, Cho SS, Jun BH, Jang JJ, Chi JG, Park SH. *Engagement of CD99 induces apoptosis through a calcineurin-independent pathway in Ewing's sarcoma cells.* Am J Pathol. 1998 Dec;153(6):1937-45.

Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal S, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Quail MA, Burton J, Swerdlow H, Carter NP, Morsberger LA, Iacobuzio-Donahue C, Follows GA, Green AR, Flanagan AM, Stratton MR, Futreal PA, Campbell PJ. *Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development.* Cell. 2011 Jan 7;144(1):27-40. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.055.

Sung CO, Ko YH, Park S, Kim K, Kim W. *Immunoreactivity of CD99 in non-Hodgkin's lymphoma: unexpected frequent expression in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma*. J Korean Med Sci. 2005 Dec;20(6):952-6.

Szuhai K, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PC, Bovée JV. *Molecular pathology and its diagnostic use in bone tumors*. Cancer Genet. 2012 May;205(5):193-204. doi: 10.1016/j.cancergen.2012.04.001. Review.

Tjalma RA. *Canine bone sarcoma: estimation of relative risk as a function of body size*. J Natl Cancer Inst. 1966 Jun;36(6):1137-50.

Torzicky M, Viznerova P, Richter S, Strobl H, Scheinecker C, Foedinger D, Riedl E. *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) and CD99 are critical in lymphatic transmigration of human dendritic cells*. J Invest Dermatol. 2012 Apr;132(4):1149-57. doi: 10.1038/jid.2011.420. Epub 2011 Dec 22. Erratum in: J Invest Dermatol. 2012 Jul;132(7):1938.

Úrias U, Marie SK, Uno M, da Silva R, Evagelinellis MM, Caballero OL, Stevenson BJ, Silva WA Jr, Simpson AJ, Oba-Shinjo SM. *CD99 is upregulated in placenta and astrocytomas with a differential subcellular distribution according to the malignancy stage*. J Neurooncol. 2014 Aug;119(1):59-70. doi: 10.1007/s11060-014-1462-x. Epub 2014 May 6.

Vishnubhotla R, Sun S, Huq J, Bulic M, Ramesh A, Guzman G, Cho M, Glover SC. *ROCK-II mediates colon cancer invasion via regulation of MMP-2 and MMP-13 at the site of invadopodia as revealed by multiphoton imaging*. Lab Invest. 2007 Nov;87(11):1149-58. Epub 2007 Sep 17.

Waclavicek M, Majdic O, Stulnig T, Berger M, Sunder-Plassmann R, Zlabinger GJ, Baumruker T, Stöckl J, Ebner C, Knapp W, Pickl WF. *CD99 engagement on human peripheral blood T cells results in TCR/CD3-dependent cellular activation and allows for Th1-restricted cytokine production*. J Immunol. 1998 Nov 1;161(9):4671-8.

Wilkerson AE, Glasgow MA, Hiatt KM. *Immunoreactivity of CD99 in invasive malignant melanoma*. J Cutan Pathol. 2006 Oct;33(10):663-6.

Wingett D, Forcier K, Nielson CP. *A role for CD99 in T cell activation*. Cell Immunol. 1999 Apr 10;193(1):17-23.

Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Bröcker EB, Friedl P. *Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis*. J Cell Biol. 2003 Jan 20;160(2):267-77. Epub 2003 Jan 13.

Wong CC, Wong CM, Tung EK, Man K, Ng IO. *Rho-kinase 2 is frequently overexpressed in hepatocellular carcinoma and involved in tumor invasion*. Hepatology. 2009 May;49(5):1583-94. doi: 10.1002/hep.22836.

Yoneda A, Multhaupt HA, Couchman JR. *The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity*. J Cell Biol. 2005 Aug 1;170(3):443-53. Epub 2005 Jul 25.

Yoneda A, Ushakov D, Multhaupt HA, Couchman JR. *Fibronectin matrix assembly requires distinct contributions from Rho kinases I and -II*. Mol Biol Cell. 2007 Jan;18(1):66-75. Epub 2006 Oct 25.

Yoon SS, Jung KI, Choi YL, Choi EY, Lee IS, Park SH, Kim TJ. *Engagement of CD99 triggers the exocytic transport of ganglioside GM1 and the reorganization of actin cytoskeleton*. FEBS Lett. 2003 Apr 10;540(1-3):217-22.

Yu H, Zhang Y, Ye L, Jiang WG. *The FERM family proteins in cancer invasion and metastasis*. Front Biosci (Landmark Ed). 2011 Jan 1;16:1536-50. Review.

Zhang X, Li C, Gao H, Nabeka H, Shimokawa T, Wakisaka H, Matsuda S, Kobayashi N. *Rho kinase inhibitors stimulate the migration of human cultured osteoblastic cells by regulating actomyosin activity*. Cell Mol Biol Lett. 2011 Jun;16(2):279-95. doi: 10.2478/s11658-011-0006-z. Epub 2011 Mar 9.

Zhang Y, Li X, Qi J, Wang J, Liu X, Zhang H, Lin SC, Meng A. *Rock2 controls TGFbeta signaling and inhibits mesoderm induction in zebrafish embryos*. J Cell Sci. 2009 Jul 1;122(Pt 13):2197-207. doi: 10.1242/jcs.040659. Epub 2009 Jun 9.

Zheng S, Huang J, Zhou K, Zhang C, Xiang Q, Tan Z, Wang T, Fu X. *17β-Estradiol enhances breast cancer cell motility and invasion via extra-nuclear activation of actin-binding protein ezrin*. PLoS One. 2011;6(7):e22439. doi: 10.1371/journal.pone.0022439. Epub 2011 Jul 26.

Zhou Q, Xu J, Zhao J, Zhang S, Pan W. *Downregulation of CD99 and upregulation of human leukocyte antigen class II promote tumor aggravation and poor survival in patients with osteosarcomas*. Onco Targets Ther. 2014 Mar 24;7:477-84. doi: 10.2147/OTT.S54765. eCollection 2014.

RINGRAZIAMENTI

Questa tesi è il risultato di un progetto sperimentale iniziato tre anni fa. Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato con suggerimenti, critiche ed osservazioni: a loro va la mia gratitudine, anche se a me spetta la responsabilità per ogni eventuale errore contenuto in questo lavoro.

Un sentito ringraziamento va alla prof.ssa Cinzia Zucchini per l'infinita pazienza e la sua cortese attenzione, e alla prof.ssa Katia Scotlandi per la preziosa guida e il costante supporto.

Desidero ringraziare, inoltre, la dott.ssa Maria Cristina Manara che mi ha sempre sostenuto professionalmente e personalmente, insieme con tutto il gruppo del Laboratorio di Oncologia Sperimentale dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna e la dott.ssa Paola De Sanctis, colleghi ed amici.

Un ringraziamento particolare va alle associazioni "Il Pensatore: Matteo Amitrano" e "Liberi di Vivere Luca Righi" perchè hanno sostenuto anche questo progetto e mi hanno permesso di vedere "oltre la provetta".

Ringrazio di cuore i miei familiari che mi sono vicini ogni giorno, nonostante i chilometri che ci separano, e infine gli amici e le amiche, per l'incoraggiamento e tutti i momenti di svago che hanno saputo regalarmi.

