

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE**

Ciclo XXVIII

Settore Concorsuale di afferenza: 05/H1

Settore Scientifico disciplinare: BIO/16

**CAMBIAMENTI NELL'ESPRESSIONE GENICA IN UN SISTEMA DI CO-
COLTURA DI FIBROBLASTI UMANI E CELLULE DI OSTEOSARCOMA: IL
RUOLO DEL MICROAMBIENTE**

Presentazione della Dott.ssa Viviana Salvatore

Coordinatore Dottorato

Prof. Lucio Cocco

Relatore

Prof. Mirella Falconi

Esame finale anno 2016

SOMMARIO

INTRODUZIONE.....	3
1. RUOLO DEI “CANCER ASSOCIATED FIBROBLASTS” DURANTE LO SVILUPPO DEL TUMORE.....	4
2. CROSS-TALK TRA MICROAMBIENTE INFIAMMATOIO E TUMORE.....	7
2.1 LINK TRA TUMORE E INFIAMMAZIONE.....	7
2.1.1 Chitinase 3 like 1 (YKL-40).....	8
2.2 CITOCHINE COINVOLTE NELLO SVILUPPO TUMORALE.....	10
2.2.1 Tumor Necrosis Factor (TNF- α).....	10
2.2.2 Interleuchina 6 (IL-6).....	11
3. MICROAMBIENTE TUMORALE E SWITCH ANGIOGENETICO.....	14
3.1 VEGF.....	15
3.2 METALLOPROTEASI.....	17
4. SCOPO DELLA RICERCA.....	20
5. MATERIALI E METODI.....	21
5.1 COLTURA PRIMARIA DI FIBROBLASTI UMANI HF.....	21
5.2 COLTURA DELLA LINEA DI OSTEOSARCOMA UMANO MG-63.....	21
5.3 CO-COLTURE IN MONOSTRATO E ANALISI MORFOLOGICA AL MICROSCOPIO A CONTRASTO DI FASE.....	21
5.4 ANALISI ALL’ HIGH RESOLUTION SCANNING ELECTRON MICROSCOPY.....	21
5.5 TRASFEZIONE siRNA NELLE MG-63.....	22
5.6 CO-CULTURA DI HF E MG-63 IN TRANSWELL.....	22
5.7 ESTRAZIONE E RETROTRASCRIZIONE DELL’ RNA.....	22
5.8 REAL-TIME PCR.....	23
5.9 WESTERN BLOT E ANALISI DENSITOMETRICA.....	23
6. RISULTATI.....	25
6.1 ANALISI MORFOLOGICHE AL MICROSCOPIO OTTICO E ALL’ HR-SEM.....	25
6.2 REAL-TIME PCR.....	28
6.2.1 Espressione di TNF- α	28

6.2.2 Espressione di IL-6	28
6.2.3 Espressione di YKL-40.....	28
6.2.4 Espressione di VEGF.....	28
6.2.5 Espressione delle MMPs	28
6.3 ANALISI WESTERN BLOT.....	30
6.3.1 Espressione di TNF- α	30
6.3.2 Espressione di IL-6.....	30
6.3.3 Espressione di YKL-40.....	30
6.3.4 Espressione di VEGF.....	31
6.3.5 Espressione di MMP-1 e MMP-9	31
7. DISCUSSIONE.....	35
BIBLIOGRAFIA.....	40

INTRODUZIONE

Nel corso degli ultimi anni, sempre maggiori evidenze scientifiche hanno confermato il ruolo rilevante che gioca il microambiente durante lo sviluppo e la progressione tumorale. L'importanza del microambiente nella progressione metastatica iniziò a delinearsi sin dalla fine del XIX secolo attraverso la teoria del “seed and soil”, proposta dal chirurgo inglese Stephen Paget (1855-1926), secondo la quale determinati tumori sono in grado di formare metastasi in organi specifici, proprio come un seme trova il terreno giusto per poter attecchire. In termini molecolari, Paget intuì come la cellula tumorale potesse esprimere molecole riconosciute solo in determinati tessuti. Negli stessi anni, il patologo americano James Ewing (1866-1943) elaborò una teoria complementaria, la “anatomical-mechanical hypothesis”, suggerendo l'idea che i sistemi linfatico e vascolare svolgessero un ruolo preponderante nella diffusione passiva delle cellule verso un determinato sito anatomicamente accessibile. Nel 1982, Bissell delineò la teoria moderna secondo cui, alla base dello sviluppo del tumore, sia il microambiente sia le mutazioni genetiche svolgono un ruolo fondamentale. Negli ultimi decenni, infatti, accanto alla definizione di cancro come malattia genetica, si è delineata l'importanza fondamentale delle interrelazioni che intercorrono tra l'epitelio tumorale e il microambiente tissutale nel processo di tumorigenesi. Il tumore è da tempo considerato un tessuto complesso, le cui cellule mutate non agiscono da sole durante la progressione del cancro, ma reclutano le normali cellule circostanti come collaboratori attivi per instaurare un fenotipo neoplastico.

Se da un lato l'instabilità genomica dei tumori garantisce loro un vantaggio evolutivo continuo, permettendo a cellule sempre più resistenti e aggressive di sopravvivere alle terapie, dall'altro la loro natura malleabile ha evidenziato la necessità di attuare strategie multiple: molti studi pre-clinici e clinici hanno suggerito l'efficacia di terapie combinate che abbiano come target non solo le cellule tumorali, ma anche le componenti del microambiente e, in particolare, quelle dello stroma.

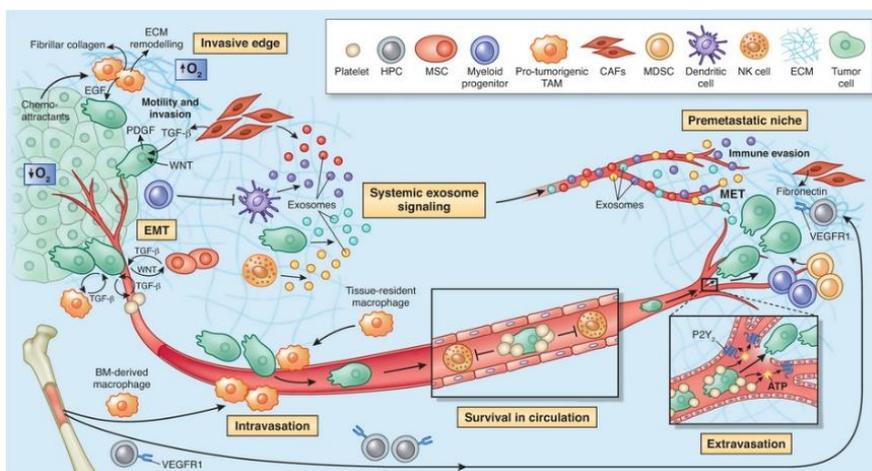


Fig. 1: Ruolo del microambiente nella progressione tumorale e nella disseminazione metastatica. (Daniela F Quail & Johanna A Joyce “Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis” *Nature Medicine* 19, 1423–1437 (2013) doi:10.1038/nm.3394)

1. RUOLO DEI “CANCER ASSOCIATED FIBROBLASTS” DURANTE LO SVILUPPO DEL TUMORE

I fibroblasti rappresentano una delle popolazioni cellulari più abbondanti presenti nel tessuto connettivo, contribuendo alla struttura e alla funzionalità di quest'ultimo attraverso la secrezione di importanti componenti della membrana extracellulare (ECM) come collagene, fibronectina, laminine, glicosaminoglicani, proteoglicani, proteine di matrice ed enzimi di rimodellamento. Durante il processo di guarigione delle ferite e in fase di fibrosi, condizioni entrambe necessarie per il rimodellamento tissutale, alcuni fibroblasti quiescenti si attivano diventando miofibroblasti (MFs), come descritto da Giulio Gabbiani nel 1971. Gli MFs acquisiscono fibre contrattili, esprimono *de novo* la proteina α -SMA e la variante ED-A della fibronectina e formano contatti cellula-cellula attraverso gap junctions. Subito dopo il completamento del processo di guarigione, i fibroblasti attivati vanno incontro ad un particolare programma di morte cellulare chiamato nemosi e sono rimossi tramite il tessuto granulare. È ben noto che il cancro presenta molte somiglianze con le lesioni croniche (“tumors are wounds that do not heal”, H.F. Dvorak, 1986), ed effettivamente i fibroblasti “cancer associated” (CAFs) dello stroma del microambiente presentano diverse similitudini con gli MFs, inclusa l'espressione di α -SMA e di fibronectina ED-A, anche se ne differiscono in quanto non sono rimossi dall'apoptosi e la loro attivazione non è reversibile. Due pathway strettamente interattivi si stabiliscono nel crosstalk tra cancro e cellule stromali: nella via efferente, le cellule tumorali scatenano una risposta reattiva nello stroma, e nella via afferente le cellule stromali modificate nel microambiente circostante influenzano la risposta delle cellule tumorali.

Il ruolo dei CAFs nella progressione tumorale è multifaccettato. Analogamente alle cellule del sistema immunitario che inizialmente reprimono la crescita tumorale, i CAFs inibiscono le fasi precoci della progressione del tumore, principalmente attraverso la formazione di gap junctions tra i fibroblasti attivati [1]. Successivamente, i CAFs attivati da diversi fattori secreti dal tumore ne promuovono la crescita e la progressione. I CAFs sono responsabili della deposizione di collagene e di vari componenti della ECM nel microambiente tumorale, dove stimolano la proliferazione e l'angiogenesi delle cellule tumorali. Hanno inoltre una cruciale ma sottostimata funzione immunitaria, in quanto producono numerose citochine e chemochine come osteopontina (OPN), CXCL1, CXCL2, IL-6, IL-1 β , CCL-5, lo stromal-derived factor-1 α (SDF-1 α), e CXCL13 [2, 3]: durante gli stadi precoci della tumorigenesi, i fibroblasti avvertono i cambiamenti nell'architettura tissutale causati dall'incremento della proliferazione delle cellule epiteliali vicine e rispondono a questi cambiamenti producendo mediatori pro-infiammatori.

Esistono diverse teorie riguardanti l'origine dei CAFs e ad oggi sono stati riportati differenti tipologie di cellule che potrebbero rappresentarne i predecessori, come i fibroblasti tissutali residenti, cellule

mesenchimali derivanti da tessuto osseo, cellule staminali ematopoietiche, cellule epiteliali e cellule endoteliali. [4].

Una teoria comune individua i fibroblasti tissutali residenti come progenitori dei CAFs. Studi recenti hanno dimostrato che le cellule tumorali riprogrammano i fibroblasti per convertirli in CAFs attraverso le azioni di alcuni miRNA (MiR-31, miR-214 e miR-155) La trans-differenziazione è accompagnata dall'espressione di geni CAF-specifici nei fibroblasti, come alpha-SMA, MMP1, MMP3 e collagene, attraverso un loop di signalling autocrino. Anche le specie reattive dell'ossigeno (ROS) promuovono la conversione dei fibroblasti in miofibroblasti con un'elevata capacità di migrazione attraverso l'accumulo del fattore di trascrizione ipossia-inducibile (HIF)-1 α e la chemochina CXCL12. Un'altra ipotesi spiega come le cellule staminali mesenchimali derivanti dal midollo osseo (BM-MSCs) possano essere in grado di convertire i fibroblasti normali in fibroblasti CAF-like tramite l'alterazione del fattore di crescita TGF- β 1. Pertanto, un'ipotesi plausibile è che alcune citochine secrete dalle cellule tumorali come VEGF, EGF, HGF, bFGF, PDGF e CCL2 promuovono la conversione dei fibroblasti residenti in CAFs.

Una terza fonte proposta di CAFs sono le cellule epiteliali che, attraverso il processo di EMT (epithelial-mesenchymal transition), acquisiscono caratteristiche mesenchimali e diventano fibroblasti Questa ipotesi deriva dall'evidenza che le cellule epiteliali esposte a stress ossidativo guidato dalle metalloproteasi (MMPs), subiscono ossidazione del DNA e mutazioni, andando così incontro ad una EMT specializzata in cui transdifferenziano in miofibroblasti attivati. E' stato anche dimostrato che le cellule tumorali stesse possano favorire la formazione di CAFs da fibroblasti normali attraverso un' "educazione in vivo" [5]. Le cellule tumorali, rilasciando interleuchine pro-infiammatorie come IL-1 β , sono in grado di indurre l'attività del fattore di trascrizione NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) nei fibroblasti, che a sua volta induce l'espressione di geni pro-infiammatori e pro-angiogenici che caratterizzano i CAFs. I CAFs, infatti, sono fenotipicamente e funzionalmente distinguibili dai fibroblasti normali per la loro aumentata capacità di proliferare e per la presenza di fattori diversi rilasciati nella matrice extracellulare a loro adiacente [6, 7], per la capacità di promuovere la crescita del tumore inducendo angiogenesi, reclutamento di cellule progenitrici del midollo e rimodellamento della matrice extracellulare [8-10] oltre che di mediare la resistenza alla terapia antiangiogenica [11]. E' stato visto, infatti, che i CAFs rispetto ai fibroblasti normali esprimono livelli più elevati di alcuni geni come le chemochine (IL-1 β e IL-6) in grado di attirare neutrofili e macrofagi [12], e alcuni geni pro-angiogenici (CVR61 e osteopontina) che favoriscono la migrazione e quindi la metastatizzazione [13] Il meccanismo attraverso il quale i CAFs possono indurre la neo-angiogenesi è duplice, sia tramite un effetto diretto attraverso la secrezione del VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) e di MMP-9 (Matrix Metallo Peptidase 9), sia mediante un

effetto indiretto attraverso il reclutamento dei macrofagi, che a loro volta sono in grado di sostenere il processo della neo-angiogenesi associata al tumore [14]. Per cui, i CAFs giocano un ruolo cruciale nel generare un microambiente infiammatorio e nel promuovere la neo-angiogenesi, favorendo la progressione maligna del tumore. Oltre al rilascio di chemochine e di fattori di crescita, i CAFs sono anche in grado di generare alterazioni a livello dell'ECM. Molti tumori solidi, infatti, presentano un profilo proteico differente rispetto alla controparte ECM normale, e molte di queste proteine interagiscono direttamente con le cellule del tumore attraverso integrine o recettori di superficie, influenzando così funzioni come la proliferazione, l'apoptosi e la migrazione [15]. Esempi di proteine costitutivamente up-regolate nell'ECM di tumori solidi, sono la TNC (Tenascin-C) e le MMPs. Tra gli enzimi proteolitici, le MMPs, svolgono un ruolo fondamentale nel rimodellamento dell'ECM durante la progressione del tumore [16], favorendo l'invasività del tumore e la metastatizzazione.

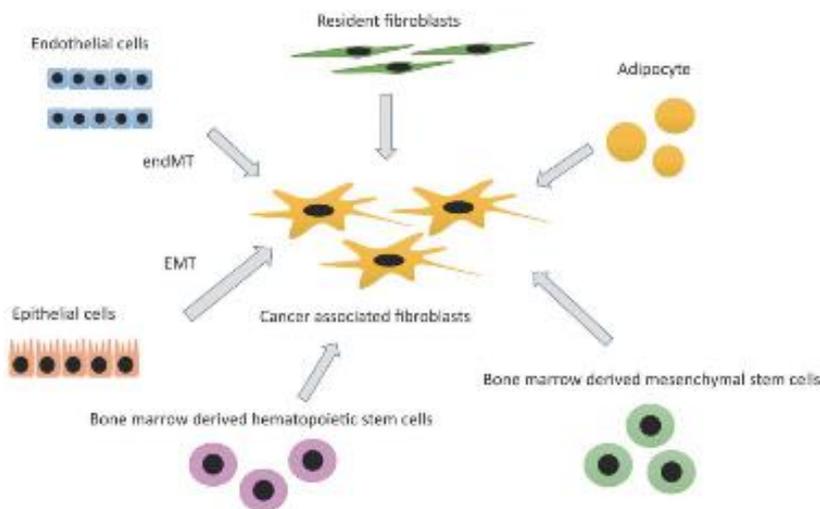


Fig. 2: Origini dei fibroblasti “cancer associated” (Kazuyoshi Shiga, Masayasu Hara, Takaya Nagasaki, Takafumi Sato, Hiroki Takahashi and Hiromitsu Takeyama “*Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth*” *Cancers* 2015, 7, 2443-2458

2. CROSS-TALK TRA MICROAMBIENTE INFIAMMATORIO E TUMORE

2.1 LINK TRA TUMORE E INFIAMMAZIONE

I processi infiammatori fanno parte dei molteplici meccanismi che l'organismo ha a disposizione per difendersi dalla varietà di agenti e situazioni che possono arrecare danno alle cellule e ai tessuti. Nel caso dei tumori, però, questa regola, come molte altre, trova ampie eccezioni: da un lato, la presenza di cellule tumorali scatena una risposta infiammatoria che rappresenta una difesa fisiologica da parte dell'organismo ospite. Dall'altro, il contesto infiammatorio getta benzina sul fuoco della malignità, alimentando e potenziando l'aggressività del tumore e la disseminazione delle metastasi. I patogeni tumorigenici stravolgono l'immunità dell'ospite e stabiliscono un'infezione persistente, associata ad un grado di infiammazione basso, ma cronico.

I mediatori e gli effettori cellulari dell'infiammazione sono costituenti importanti del contesto tumorale. I processi infiammatori non sono solo presenti prima del cambiamento neoplastico delle cellule, come in alcuni tipi di tumore, al contrario, negli ultimi anni è stato messo in evidenza che la componente infiammatoria è presente e costituisce una tappa essenziale nella formazione del microambiente maligno anche in tumori non primariamente riconducibili a processi infiammatori [17]. Indipendentemente dalla sua origine, l'intensa infiammazione che si verifica nel microambiente tumorale ha molti effetti promotori della malignità: aiuta la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali, promuove l'angiogenesi e le metastasi, sovverte le risposte immunitarie adattive e altera le risposte ad ormoni e agenti chemioterapici. Le vie molecolari dell'infiammazione correlata al cancro sono state da poco chiarite, con la conseguente identificazione di nuove molecole bersaglio che potrebbero portare ad un miglioramento delle diagnosi e nei trattamenti.

Il link tra cancro e infiammazione venne intuito nel XIX secolo da Rudolf Virchow, dopo aver osservato che i tumori spesso sorgevano in siti di infiammazione cronica e che nelle biopsie prelevate dai tumori era presente "infiltrato linforeticolare"[18]. L'idea che questi processi fossero collegati fu accantonata per più di un secolo, ma negli ultimi decenni ha suscitato nuovamente l'interesse dei ricercatori, ed è ormai generalmente riconosciuto che infiammazione e cancro sono strettamente correlati: studi epidemiologici hanno dimostrato che un'infiammazione cronica predispone gli individui a vari tipi di cancro e si stima che le risposte infiammatorie sono legate al 15-20 % di tutti i decessi per cancro nel mondo.

Sono state messe in evidenza due vie di attivazione che legano infiammazione e cancro: una via estrinseca, in cui condizioni infettive o infiammatorie aumentano il rischio di sviluppare tumori in determinate sedi anatomiche (come nelle malattie infiammatorie croniche intestinali), e una via intrinseca, in cui alterazioni genetiche causano infiammazione e neoplasia. La via intrinseca è attivata

da eventi genetici capaci di indurre processi neoplastici (l'attivazione di vari oncogeni tramite mutazioni, il riarrangiamento o l'amplificazione cromosomica e l'inattivazione di geni oncosoppressori.). I membri della famiglia RAS sono gli oncogeni maggiormente coinvolti nello sviluppo dei tumori umani e attivano la proliferazione attraverso le chinasi RAS-RAF. Le cellule che subiscono questo tipo di trasformazione producono mediatori dell'infiammazione, generando in tal modo un microambiente infiammatorio in tumori che di base non presentano condizioni di infiammazione (come nel cancro al seno). Altri oncogeni che svolgono una funzione simile sono la proteina tirosin-chinasi RET, coinvolta nello sviluppo del tumore alla tiroide e MYC, un fattore trascrizionale overespresso in molti tipi di tumori umani. La via estrinseca e quella intrinseca convergono causando nelle cellule tumorali l'attivazione di fattori di trascrizione, tra cui NF- κ B, STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) e HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha). Questi fattori di trascrizione coordinano la produzione di mediatori infiammatori, come la produzione di cicloossigenasi 2 COX2, che a sua volta provoca la produzione di prostaglandine. Questi fattori reclutano e attivano vari leucociti, in particolare quelli della linea mielomonocitica. Le citochine attivano gli stessi fattori trascrizionali chiave nelle cellule infiammatorie, nelle cellule stromali e nelle cellule tumorali, con conseguente produzione di più mediatori infiammatori e la generazione di un microambiente infiammatorio tumorale. L'infiammazione cancro-correlata ha molti effetti di promozione tumorale. Nella moltitudine di molecole coinvolte nell'infiammazione correlata al cancro, possono essere identificati fattori chiave endogeni. Questi includono mediatori infiammatori, come YKL-40, fattori di trascrizione quali NF- κ B e il trasduttore di segnale e attivatore di trascrizione 3 STAT3, e le principali citochine infiammatorie, come IL- 1 β , IL- 6 e TNF - α .

2.1.1 Chitinase 3 like 1 (YKL-40)

Durante la ricerca di nuove proteine ossee, Johansen e il suo gruppo più di 10 anni fa identificarono una proteina abbondantemente secreta *in vitro* dalla linea cellulare di osteosarcoma MG-63, chiamandola YKL-40 in base ai suoi tre amminoacidi NH₂-terminali tirosina (Y), lisina (K) e leucina (L) e il suo peso molecolare di 40 kDa. YKL-40 (nota anche come HC gp-39 e chitinase 3-like protein 1) è una glicoproteina altamente conservata, facente parte della famiglia delle glicosil 18 idrolasi, che comprende enzimi, proteine e chitinasi di varie specie, tra cui mammiferi, batteri, funghi, nematodi, insetti e piante. YKL-40 condivide una significativa omologia di sequenza amminoacidica con chitinasi batteriche e sei proteine "mammalian chitinase-like", come la proteina ovidotto-specifica, la chitotriosidasi, YKL-39, TSA 1902, la proteina-p58 chiamata anche chitinasi acidica, e la murina Ym1. Come per le altre chitinase-like umane finora identificate, il gene per YKL-40 (CHI3L1) si trova sul cromosoma 1q31-q32, è costituito da 10 esoni e si estende per circa 8 kb di DNA genomico. La struttura tridimensionale cristallografica di YKL-40 mostra due domini globulari, un grande

“core” che consiste di un dominio con struttura a barile (β/α)₈, e un piccolo dominio α/β , composto da cinque foglietti β antiparalleli e un’ α -elica, inseriti nel loop tra il foglietto β ₇ e l’elica α ₇; ciò conferisce al sito attivo di YKL-40 una caratteristica forma di solco. Sebbene si leghi alla chitina in maniera simile alle chitinasi della stessa famiglia, YKL-40 non possiede alcuna attività chitinasi. Gli amminoacidi essenziali per l’attività catalitica nelle chitinasi sono rappresentati da Asp, Glu, e Asp: i residui amminoacidici corrispondenti nella YKL-40 umana sono Asp115, Leu119, e Asp186. La mutazione di Glu in Leu in YKL-40 esclude il suo ruolo di enzima glicolitico. [19] YKL-40 è espressa da diversi tipi di tumori solidi (mammella, colon, polmone, rene, ovaio, prostata, tumori dell’utero, del pancreas, osteosarcoma, tiroide, oligodendroglioma, glioblastoma), è uno dei geni più sovraespressi nel glioblastoma multiforme, nel carcinoma papillare della tiroide, nel condrosarcoma mixoide extracellulare. YKL-40 è secreta *in vitro* dalle seguenti linee di cellule tumorali umane: osteosarcoma MG-63, glioblastoma U87, cancro del colon DLD- 1, SW1417, cancro ovarico SW626, cancro della prostata DV-145, e il melanoma maligno SK-MEL-28. YKL-40 è anche espressa da cellule umane non maligne, come mielociti e monociti stimolati con fattori di crescita e lipopolisaccaridi. E’ secreta dai macrofagi durante gli stadi tardivi del differenziamento, dai condrociti fetali, dalle cellule vascolari del tessuto muscolare liscio, e dalle cellule sinoviali fibroblast-like. *In vivo* l’mRNA e la proteina YKL-40 sono espressi da parte dei macrofagi nella membrane sinoviale infiammata, placche ateromatose, e dai condrociti durante l’artrosi.

La funzione biologica di YKL- 40 nel cancro non è ancora del tutto nota. Tuttavia, il suo pattern di espressione associato a diverse patologie indica un suo coinvolgimento nell’infiammazione e nel rimodellamento del tessuto connettivo. È stato suggerito che YKL-40 può giocare un ruolo nella proliferazione e differenziazione delle cellule maligne, protegge le cellule tumorali dall’apoptosi, stimola l’angiogenesi, ha un effetto sul rimodellamento tissutale extracellulare, e stimola i fibroblasti che circondano il tumore, anche se queste ipotesi sono ancora da dimostrare *in vivo*. YKL- 40 non è normalmente prodotta da fibroblasti, ma agisce su di essi come fattore di crescita, in sinergia con l’insulin-like growth factor -1, stimolando la crescita dei fibroblasti in un range di concentrazione simile a quello di insulin-like growth factor -1. YKL-40 avvia le cascate della MAP (mitogenactivated protein) chinasi e di PI-3K nei fibroblasti, fino alla fosforilazione della (ERK)-1/2 MAP chinasi e della protein chinasi B (AKT), che sono associate al controllo della mitogenesi e della sopravvivenza cellulare. Ciò è indicativo del ruolo di YKL-40 come proteina antiapoptotica. E’ stato anche suggerito che YKL-40 giochi un ruolo nel fenotipo maligno come fattore cellulare di sopravvivenza in un microambiente avverso, perché un’upregolazione di questa proteina è stata trovata in una linea cellulare di glioblastoma a seguito di stress genotossico e microambientale (ipossia, radiazioni ionizzanti, inibizione di p53, trattamenti antiossidanti, confluenza, assenza di

siero). La risposta di espressione di YKL-40 era tardiva, da 24 a 72 ore dopo lo stimolo, indicando che YKL-40 rappresenta una risposta secondaria a valle di altri meccanismi. E' stato inoltre recentemente dimostrato che astrociti umani immortalizzati trasfettati con YKL-40 incrementavano la loro resistenza alle radiazioni e aumentavano la capacità di invasione *in vitro*. Inoltre, YKL-40 modula la morfologia delle cellule vascolari endoteliali promuovendo la formazione di tubuli ramificati, indicando che YKL-40 potrebbe giocare un ruolo nell'angiogenesi stimolando la migrazione e la riorganizzazione delle cellule vascolari endoteliali. L'espressione di YKL-40 è regolata da vari ormoni e citochine come IL-6 and TNF- α . [20]

2.2 CITOCHINE COINVOLTE NELLO SVILUPPO TUMORALE

Le citochine sono proteine a basso peso molecolare che mediano le comunicazioni cellula-cellula. Sono sintetizzate da cellule immuni e cellule stromali, come fibroblasti e cellule endoteliali, e regolano la proliferazione, la sopravvivenza cellulare, la differenziazione, l'attivazione dell'immunità cellulare, la migrazione e la morte cellulare. Sotto lo stretto controllo del microambiente tumorale, le citochine possono modulare la risposta antitumorale, ma durante l'infiammazione cronica possono anche indurre la trasformazione maligna delle cellule, condizionando il bilancio pro-e anti infiammatorio, le relative concentrazioni, l'espressione dei propri recettori e lo stato di attivazione delle cellule circostanti.

2.2.1 Tumor Necrosis Factor (TNF- α)

Il tumor necrosis factor alpha (TNF- α) è un membro della superfamiglia di citochine TNF/TNFR. In comune con gli altri membri della famiglia, TNF- α è coinvolto nel mantenimento e nell'omeostasi del sistema immunitario, nell'infiammazione e nella difesa da parte dell'ospite. E' una citochina coinvolta nella fase acuta della risposta immunitaria, ma è anche coinvolta in processi patologici come le infiammazione croniche, l'autoimmunità e, in apparente contraddizione con il suo nome, le patologie maligne. E' riconosciuto da due recettori, il TNF- α receptor-1 (TNF- α R-1), espresso ubiquitariamente, e il TNF- α R-2, espresso soprattutto nelle cellule immuni. Dopo che il TNF- α si lega ai TNF- α -Rs, avviene una trimerizzazione che porta all'attivazione di almeno 4 vie di segnale: una via proapoptotica indotta dall'interazione della caspasi-8 con il dominio FADD (Fas-associated death domain); una via antiapoptotica attivata da cIAP-1, (cellular inhibitor of apoptosis protein-1) in interazione con TRAF2 (TNF- α R-associated factor 2); una via AP-1 mediata da TRAF2- e JNK; l'attivazione di NF- κ B indotta da RIP (receptor interacting protein). [21]

La produzione di TNF- α da parte delle cellule tumorali o delle cellule stromali è coinvolta nello sviluppo di gran parte dei tumori ed è parzialmente responsabile del network di citochine che si

instaura durante la progressione tumorale. Attraverso la via NF- κ B, TNF- α riveste anche un ruolo centrale nelle interazioni tra cellule tumorali e macrofagi, causando non solo l'incremento della capacità invasiva da parte delle cellule maligne, ma anche lo switch in un fenotipo alternativo che promuove il tumore stesso. Il ruolo di TNF- α nei tumori è controverso; alte concentrazioni di questa citochina possono indurre una risposta antitumorale in modelli di sarcoma murini [22] Trials chimici hanno dimostrato come somministrazioni locali di TNF- α coniugati a peptidi target o a frammenti di anticorpi a catena singola possono avere effetti benefici e variabili su diversi pazienti. Al contrario, una bassa ma sostenuta produzione di TNF- α può indurre un fenotipo tumorale. [23]. Un aumento delle concentrazioni sieriche di TNF- α è presente in diversi tipi di cancro, nonostante le cellule maligne costitutivamente producano solo una piccola quantità di TNF- α : il TNF- α prodotto cronicamente e a livelli di picogrammi nel microambiente tumorale, sia dalle cellule tumorali o da quelle stromali o da entrambi i tipi, può generare specie reattive di ossigeno (ROS) e nitrogeno (RNS), che possono causare un danno diretto al DNA. Inoltre, TNF- α può avere attività mitogenica o antiapoptotica, mediare le interazioni tumore/stroma, e indurre una serie di citochine, chemochine e MMPs che promuovono lo sviluppo tumorale e che contribuiscono a mantenere un microambiente pro-infiammatorio. L'infiammazione mediata da TNF- α è dunque strettamente connessa al cancro: l'incremento dei livelli di TNF- α in lesioni preneoplastiche è stato riscontrato in lesioni gastriche positive a *H. pylori*, attraverso la proteina Tip α (*H. pylori*-secreted TNF- α -inducing protein). Kwong et al. [24] hanno studiato la tumorigenesi associata a TNF- α in cellule epiteliali di ovaio umano esposte ad una dose prolungata di TNF- α . Il modello mostrò la generazione di un fenotipo precanceroso con cambiamenti strutturali e funzionali, come disorganizzazione tissutale, perdita di polarità epiteliale, invasione cellulare, e overespressione di marker tumorali. In accordo con questi studi, è stato dimostrato che la risposta pro- o antitumorale di TNF- α nell'ambito del microambiente tumorale dipende non solo dalla concentrazione locale, ma anche dal suo sito di espressione nel tumore. Pazienti con elevati livelli di TNF- α in zone di carcinoma non microcitico, mostravano un tasso di guarigione più alto rispetto a pazienti con un aumento del TNF- α a livello stromale. E' inoltre stato dimostrato come l'esposizione a TNF- α può incrementare il fenotipo delle cellule staminali tumorali nelle cellule del carcinoma squamoso orale, aumentando la loro abilità di formare sferoidi, l'espressione di fattori di trascrizione staminali e la tumorigenicità. [25]

2.2.2 Interleuchina 6 (IL-6)

Un'altra citochina pro-infiammatoria dai tipici effetti tumorigenici è l'interleuchina IL-6. Scoperta nel 1986, questa molecola possiede un ampio range di attività e ha diversi nomi a seconda dell'interesse che per la ricerca ha rivestito ("B cell stimulatory factor-2", "hybridoma plasmacytoma growth factor", "hepatocyte stimulating factor", "macrophage granulocyte inducer type 2"). IL-6 è

una glicoproteina pleiotropica che influenza la risposta immune antigene-specifica e la reazione infiammatoria [26], essendo il principale induttore della proteina C reattiva, del fibrinogeno, della proteina amiloide A del siero e di altri fattori. Elevati livelli di IL-6 sono stati rilevati nel siero di pazienti affetti da tumori sistemici, rispetto a pazienti sani o con patologie benigne: per questo motivo, IL-6 è stata proposta come marker tumorale, con una sensibilità e specificità rispettivamente di circa 60–70% e 58–90%. Tuttavia, gli studi che potrebbero essere utilizzati per definire i valori di cut-off per l'utilizzo diagnostico di IL-6 sono ancora limitati.

IL-6 è coinvolta nell'aumento della proliferazione cellulare e nell'inibizione dell'apoptosi, attraverso il legame con il suo recettore IL-6R α e il co-recettore gp130 (glicoproteina 130), attivando così la via di segnale JAK/STAT delle chinasi JAK e dei trasduttori di segnale e attivatori della trascrizione STATs, STAT1 and STAT3. Gli STATs appartengono ad una famiglia di fattori di trascrizione strettamente associata ai processi tumorigenici. Diversi studi hanno messo in luce gli effetti della via di segnale IL-6/JAK/STAT sull'inizio e la progressione tumorale. IL-6 può indurre tumorigenesi attraverso l'ipermetilazione dei geni oncosoppressori, così come tramite l'ipometilazione di LINE-1 (retrotransposon long interspersed nuclear element-1), frequente in vari tipi di tumore. Inoltre, è stato dimostrato come IL-6 sia prodotto principalmente dai fibroblasti stromali in modelli murini di cancro intestinale. IL-6 è anche implicato nello sviluppo del mieloma multiplo, come dimostrato dalla sua capacità di indurre apoptosi bloccando in vitro la via IL-6R/STAT3.

Come il TNF- α , IL-6 facilita lo sviluppo tumorale promuovendo la conversione di cellule non cancerose in cellule tumorali: in particolare, la secrezione di IL-6 da parte delle cellule non tumorali in condizioni di coltura "low-attachment", upregola l'espressione genica di Oct4 attivando la via di segnale IL-6R/JAK/STAT3. Queste evidenze hanno spinto i ricercatori a proporre IL-6 come target terapeutico. Diversi clinical trials in fase I/II stanno attualmente valutando l'utilizzo di anticorpi anti-IL-6 o IL-6R come alternative terapeutiche. Il siltuximab (CNTO 328), un anticorpo molecolare anti-IL-6, ha mostrato promettenti risultati per il carcinoma polmonare, il cancro all'ovaio, alla prostata, per i mieloma multiplo e altri tipi di cancro. [27- 30].

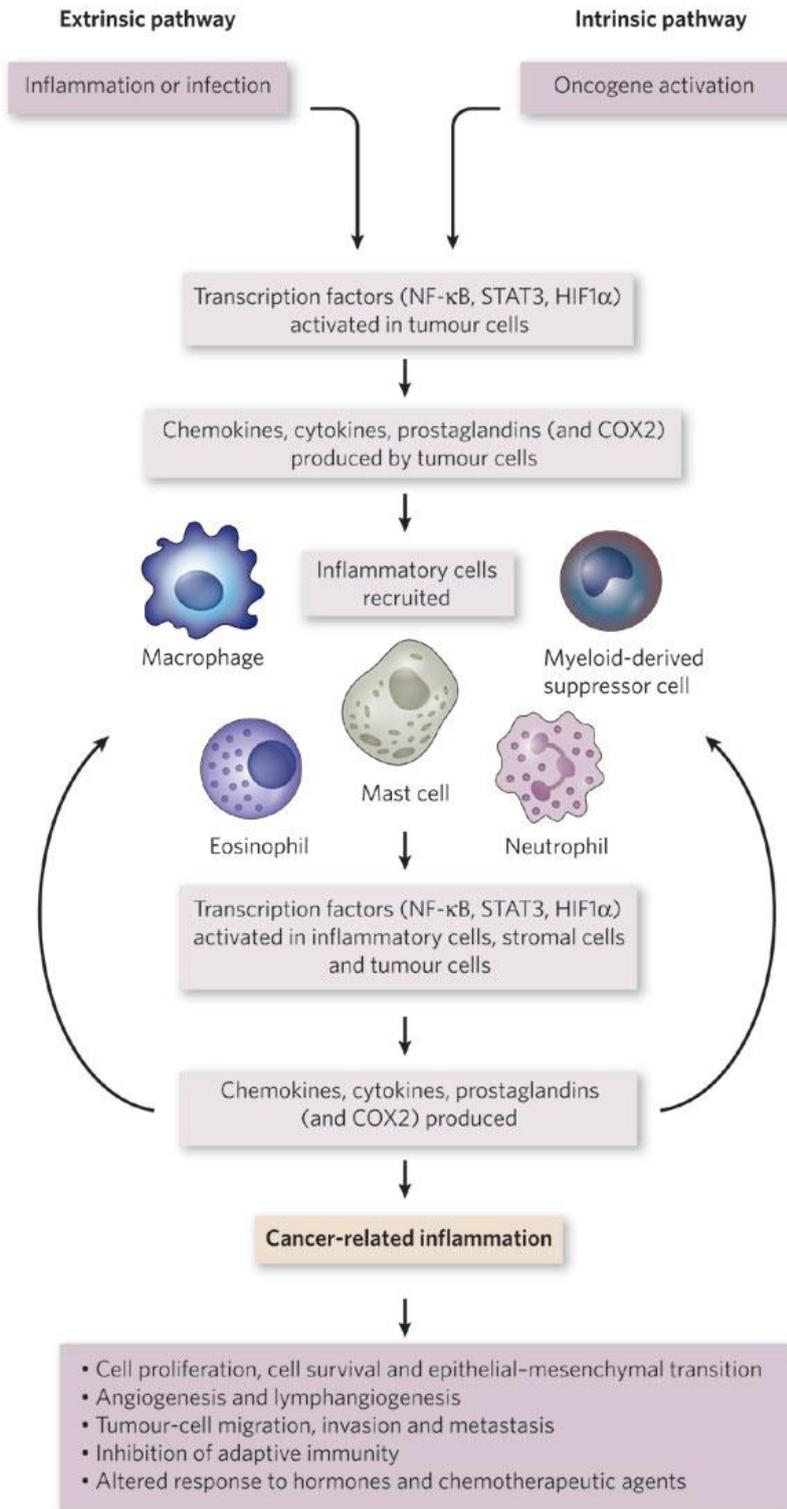


Fig. 3: Pathways di connessione tra infiammazione e cancro (Alberto Mantovani, Paola Allavena, Antonio Sica & Frances Balkwill “**Cancer-related inflammation**” *Nature* 454, 436-444(24 July 2008))

3. MICROAMBIENTE TUMORALE E SWITCH ANGIOGENETICO

Le prime fasi di formazione di un tumore si basano su una combinazione di alterazioni genetiche ed epigenetiche che attivano oncogeni e/o inibiscono geni oncosoppressori. Di conseguenza, il tasso di proliferazione delle cellule incrementa, mentre diminuisce l'apoptosi, processi concomitanti a cui segue una precoce crescita iperplastica. Quando la massa tumorale raggiunge una dimensione critica, le cellule tumorali che si trovano distanti da vasi sanguigni, mancando di un adeguato apporto di ossigeno e sostanze nutritive, vanno incontro a necrosi, compromettendo quindi un'ulteriore crescita del tumore. Tuttavia, le cellule tumorali possono superare questo stato di inibizione della crescita inducendo la formazione di nuovi vasi sanguigni, un processo noto come angiogenesi tumorale. Questo processo, a più fasi e ben caratterizzato, contribuisce alla progressione del tumore non solo apportando ossigeno e sostanze nutritive, ma procurando alle cellule tumorali la via per diffondersi attraverso il flusso sanguigno verso organi distanti, con conseguente formazione di metastasi.

La transizione dall'iperplasia pre-vascolare al tumore altamente vascolarizzato viene denominata "switch angiogenico"[31] e venne scoperta più di 30 anni fa da Judah Folkman. Numerose osservazioni sulla crescita di tumori sperimentali espianati portarono infatti Folkman a formulare l'ipotesi che la progressione del tumore dipendesse dal reclutamento attivo dei vasi sanguigni nel letto tumorale in risposta alla secrezione di specifici fattori angiogenetici. Fu lo stesso Folkman che favorì la scoperta dei primi fattori angiogenici e che per primo dimostrò sperimentalmente il verificarsi dell'induzione dell'angiogenesi. Lo switch angiogenico è di solito attivato da un'alterazione dell'equilibrio tra fattori pro e anti- angiogenici a causa di diversi stimoli, come lo stress metabolico (ipossia, basso pH o ipoglicemia), stress meccanici (pressione generata da cellule in proliferazione) risposte infiammatorie e immunitarie (infiltrazione delle cellule nei tessuti), mutazioni geniche di geni codificano per le molecole regolatrici [32]

E' ben noto che le cellule stromali del microambiente tumorale esercitano un ruolo importante durante lo switch angiogenico. Oltre che dalle cellule tumorali, fattori pro- angiogenici sono secreti dai periciti, dai CAFs, e dalle cellule del sistema immunitario. Queste componenti cellulari sono infatti in grado di rilasciare VEGF, bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), PDGF, e chemochine che diffondono nei tessuti vicini e si legano ai recettori delle cellule endoteliali (EC) dei vasi sanguigni preesistenti, portando alla loro attivazione e proliferazione. Tre meccanismi possono contribuire allo "switch angiogenico". Nel primo, molti tumori approfittano della vascolarizzazione già esistente e il loro accrescimento attorno ai vasi sanguigni è seguito da apoptosi delle cellule endoteliali, dalla perdita dell'integrità dei vasi, mediata dalla regolazione positiva dell'angiopoietina 2 (Ang2) e dall'induzione della formazione di germogli neovascolari dai vasi confinanti [33]. Questo processo è generalmente guidato da varie proteine pro-angiogeniche (come VEGF, bFGF, PDGF e Ang2),

rilasciate dalle cellule tumorali e che agiscono sulle cellule endoteliali locali. Nel secondo meccanismo, precursori ematopoietici circolanti possono contribuire alla regolazione dell'angiogenesi nei tumori. I recettori del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGFR-1 e VEGFR-2), infatti, sono espressi sia in cellule staminali ematopoietiche, sia in cellule progenitrici endoteliali. Questi rari sottotipi cellulari sono mobilizzati da citochine e chemochine come VEGF e SDF-1 α , rilasciate dai tumori nella circolazione, e possono essere reclutati nel letto vascolare di certi tipi di tumore o localizzarsi in posizione perivascolare [34]. Il terzo meccanismo è rappresentato da una sorta di comunicazione con il midollo osseo stabilita dai tumori, attraverso la secrezione di chemochine, capaci di attrarre cellule ematopoietiche differenziate tra cui i mastociti e varie popolazioni mieloidi. Queste cellule, poi, possono promuovere l'angiogenesi rilasciando molecole pro-angiogeniche o metalloproteasi che permettono di aumentare la mobilità delle cellule endoteliali [35]. L'organizzazione della rete vascolare tumorale è alquanto caotica e fragile, comparata a quella normale, e questa anormale funzionalità è un fattore limitante per il trasporto di farmaci verso le cellule target. Agenti antiangiogenici possono normalizzare la vascolarizzazione tumorale, incrementando al contempo il trasporto di ossigeno e di farmaci nel microambiente tumorale. Anticorpi VEGF-A-specifici come il bevacizumab, il sorafenib, il sunitinib, e il pazopanib, sono stati approvati dalla FDA a scopo terapeutico [36].

Tuttavia, i benefici clinici associati a questi farmaci sono limitati a pochi mesi, e gran parte dei pazienti trattati hanno subito una successiva progressione della patologia. Non è ancora chiaro se lo scarso impatto sulla sopravvivenza "overall" (OS) dei pazienti e/o su quella "progression-free" (PFS) sia causato da un piccolo beneficio clinico in ogni paziente o da un grande beneficio in una piccola sub-popolazione di pazienti [37].

3.1 VEGF

Le principali azioni biologiche e cliniche da parte delle attuali generazioni di farmaci anti-angiogenici hanno come target il VEGF (vascular endothelial growth factor) e il suo pathway relativo [38].

Nel 1983, Senger et al. identificarono, nel medium condizionato di una linea tumorale di cavie, una proteina in grado di indurre una perdita vascolare nella pelle. Questa proteina venne chiamata "tumor vascular permeability factor" (VPF) [39]. Gli autori proposero il VPF come mediatore dell'alta permeabilità dei vasi sanguigni tumorali, e nel 1990, Senger et al. ne purificarono e sequenziarono gli amminoacidi NH₂-terminali. Nel 1989, Napoleone Ferrara et al. isolarono tre isoforme di un mitogeno endoteliale (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ and VEGF₁₈₉), a cui diedero il nome di VEGF, che codificava per una proteina identica al clone umano di VPF: questa evidenza sottolineò che si trattava della stessa molecola, responsabile dunque sia di attività mitogene che di aumento della permeabilità vascolare.

Tramite cristallografia ai raggi X di un suo frammento, è stato possibile valutare la struttura e classificare il VEGF fra le proteine appartenenti alla superfamiglia dei fattori di crescita cisteinici. Dal punto di vista strutturale, il VEGF è una molecola omodimerica, con peso molecolare variabile tra i 34 ed i 46 kDa. I monomeri da cui è costituita sono legati da un ponte disolfuro che si stabilisce fra due residui cisteinici. La mutagenesi sito-specifica identifica 3 residui acidi sul terzo esone e 3 basici sul quarto, fondamentali per il legame del VEGF con il VEGFR-1 ed il VEGFR-2, rispettivamente. Tre anse molto flessibili si sviluppano attorno ad ogni polo della molecola sull'interfaccia del dimero. La seconda ansa, sulla quale si trova il determinante per il legame con il VEGFR-1, si trova in stretto contatto con la terza ansa del monomero opposto e su questa, a sua volta, è localizzato il determinante per il VEGFR-2. Tale particolare conformazione facilita la dimerizzazione del recettore, essenziale per la trans-fosforilazione e la trasmissione del segnale [40]. Numerosi meccanismi si rendono responsabili della regolazione genica del VEGF, che oltre ad essere l'unico mediatore angiogenico ipossia-dipendente [40] è regolato anche da numerosi fattori di crescita che determinano una up-regulation del suo mRNA o, in alternativa, ne inducono il rilascio. Oltre all'azione del TGF- α , TGF- β , Keratinocyte Growth Factor, IGF-1, FGF e PDGF, anche IL-1 α e IL-6 sembrano indurre, negli stati infiammatori, l'espressione del VEGF in svariate popolazioni cellulari, per esempio nei fibroblasti sinoviali, in accordo con l'ipotesi che il VEGF abbia un ruolo fondamentale anche nella mediazione dei fenomeni flogistici [41]. Molte cellule tumorali umane esprimono VEGF-A, e il suo principale recettore (VEGFR-2) è altamente espresso dalle cellule endoteliali reclutate nell'angiogenesi tumorale [42] così come dalle cellule dello stroma tumorale come fibroblasti, monociti e piastrine. Oltre alla sua funzione di mediatore paracrino, VEGFA può anche in alcune circostanze agire come segnale autocrino promotore di sopravvivenza tumorale e invasività. L'espressione del VEGF è stata ampiamente correlata alla presenza di metastasi. VEGF e 54 VEGF-C sono stati utilizzati come marker di coinvolgimento linfonodale nel corso di carcinoma polmonare non a piccole cellule [43] e attraverso l'utilizzo, in vitro ed in vivo, di molecole ad azione inibitoria. La somministrazione intra-peritoneale di anticorpi anti-VEGF in topi portatori di sarcoma o glioblastoma, ha condotto ad una significativa diminuzione della densità vasale e della crescita tumorale. Nelle cavie, le cellule staminali embrionali private del gene del VEGF perdono, rispetto a cellule staminali controllo, parte della loro capacità di sviluppare teratocarcinoma. In modelli biologici sul topo, la terapia con DC101 (Anticorpo anti VEGFR-2) ha indotto l'inibizione della crescita delle metastasi epatiche in corso di carcinoma colon-rettale. Bruns e collaboratori hanno dimostrato che l'utilizzo di quest'anticorpo, oltre ad inibire il meccanismo angiogenico, è responsabile della morte delle cellule endoteliali presenti nella lesione tumorale. Questo risultato testimonia la capacità del VEGF di promuovere, attraverso l'attivazione del VEGFR-2, sia lo

sviluppo, sia la sopravvivenza delle cellule endoteliali nelle metastasi epatiche del carcinoma del colon.

3.2 METALLOPROTEASI

Le metalloproteinasi di matrice (MMPs) costituiscono una famiglia di enzimi zinco- e calcio-dipendenti prodotti da numerosi tessuti e coinvolti nella degradazione dei componenti dell' ECM e della membrana basale (MB) per permetterne il turn-over, necessario a seguito dell'invecchiamento dei vari componenti, svolgendo così un fondamentale ruolo strutturale. Questi enzimi proteolitici, suddivisibili in sotto-famiglie a seconda della loro specificità di substrato (collagenasi, gelatinasi, stromalisine, e matrilisine), sono attivi in tutti i processi di rimodellamento tissutale, durante l'embriogenesi, la riparazione delle ferite e l'angiogenesi fisiologica. Sono prodotte da diversi tipi di cellule, incluso quelle endoteliali, i leucociti, i macrofagi, i fibroblasti e le cellule tumorali [44]. Normalmente questi enzimi sono presenti nella matrice in forma inattiva in quanto legati ai TIMP (inibitori delle metalloproteasi). Con il distacco di questi fattori, le MMPs entrano in azione passando dallo stato inattivo a quello attivo. Questo meccanismo è di importanza cruciale, poichè permette di avere un pool di enzimi già pronti all'uso che devono solo essere attivati e che non devono quindi essere sintetizzati ex-novo ogni volta che sono necessari. Ogni alterazione di questo equilibrio può avere conseguenze a livello tissutale e sistemico. Le MMPs attivate possono digerire proteoliticamente decorina, elastina, fibrillina, laminina, gelatina (collagene denaturato) e collagene di tipo IV, V, XI e XVI e, infine, attivare specifici fattori di crescita. Terminato il proprio lavoro le MMPs tornano a legarsi ai TIMP e stazionano nuovamente in uno stato di inattività, cosa che non avviene nelle cellule tumorali. L'espressione genica delle MMPs è controllata da diversi fattori stimolatori e soppressori. Possono subire up- o down- regolazione ad opera degli esteri del forbolo, di proteine dell'ECM, secondariamente a stress cellulari, a variazioni della forma cellulare ed alle interazioni cellula-matrice e cellula-cellula. L'espressione delle MMPs è inoltre regolata da numerose citochine e fattori di crescita fra cui interleuchine, interferoni, il Fattore di Crescita Epiteliale (EGF - Epithelial Growth Factor), VEGF, TNF- α e - β (Tumor Necrosis Factor- α e - β), Induttore 48 Extracellulare delle MMPs (Extracellular Matrix β Metalloproteinase Inducer) e TGF- β (Trasforming growth factor- β). A livello post-trascrizionale le MMPs possono essere regolate da vari meccanismi. Le copie di mRNA che codificano per le MMPs 1 e 3 sono stabilizzate dall'EGF, mentre le copie della MMPs-13 sono stabilizzate dal PDGF e dai glicocorticoidi e destabilizzate dal TGF- β . Le MMPs sono inoltre controllate anche a livello secretorio: MMP- 8 e MMP-9 sono sintetizzate nel midollo dai granulociti, immagazzinate nei granuli dei neutrofili circolanti ed infine rilasciate secondariamente all'attivazione di queste cellule da parte dei mediatori dell'infiammazione [45].

Le MMPs sono coinvolte in meccanismi patologici quali artrite reumatoide, sclerosi multipla e diffusione neoplastica [46]. Ad oggi, grazie a ricerche che hanno evidenziato ed in parte chiarito, il legame fra MMPs e diversi substrati quali, fattori di crescita, chemochine, molecole d'adesione e recettori di membrana, il ruolo delle MMPs sembra destinato ad un'importante rivalutazione. Alla luce del loro complesso ruolo le MMPs non sono più considerate come semplici degradatori della membrana extracellulare, ma sono riconosciute come parte fondamentale dell'elegante sistema di comunicazione con il quale cellule epiteliali e neoplastiche interagiscono con lo stroma [47].

Le MMPs sono state a lungo associate alle metastasi, e non c'è dubbio che siano i maggiori attori del processo metastatico. Originariamente, la natura del loro contributo venne individuata nel facilitare la rottura delle barriere fisiche tra un tumore primario e i distanti siti metastatici. Recenti evidenze suggeriscono che le MMPs abbiano un'enorme importanza sia negli step che precedono la distruzione delle apparenti barriere fisiche durante il processo di metastasi, che negli step successivi. Le MMPs e i loro inibitori appaiono infatti importanti regolatori della crescita del tumore contribuendo nelle fasi iniziali di crescita sia nei siti primari che in quelli secondari e agendo da regolatori dell'angiogenesi [48].

Recenti studi hanno evidenziato la capacità delle MMPs di promuovere la crescita tumorale anche attraverso il clivaggio o la bio-attivazione di substrati non di matrice (fattori di crescita latenti, molecole pro ed anti-angiogeniche, recettori cellulari, molecole d'adesione). Sono questi substrati alternativi, MMPs mediati, ad indurre nelle cellule dell'ospite le risposte necessarie a consentire la crescita neoplastica. Tra le MMPs, la MMP1, la 2, e la 9 sono quelle ritenute più attive. La MMP1 è la collagenasi interstiziale maggiormente espressa in grado di degradare le fibrille di collagene, i maggiori costituenti della matrice extracellulare. *MMP1* è up-regolato in un'ampia varietà di tumori, suggerendone l'associazione con l'invasione e la metastasi [49] e in ambito clinico oncologico è stata riscontrata una significativa correlazione negativa tra la sua espressione e le probabilità di sopravvivenza [50]. Anche MMP-2 e MMP-9 sono ormai considerati biomarkers altamente specifici. [51]: l'elevata espressione delle due gelatinasi correla con la capacità di diverse neoplasie epiteliali di invadere i tessuti circostanti.

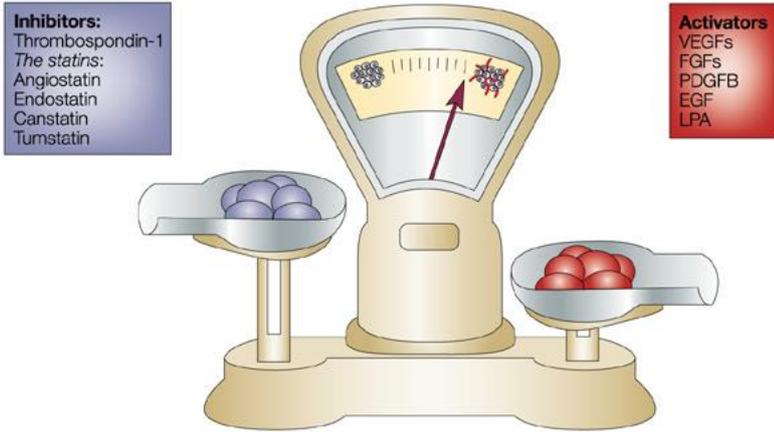


Fig. 4: Bilancio angiogenico (Gabriele Bergers & Laura E. Benjamin “*Tumorigenesis and the angiogenic switch*” *Nature Reviews Cancer* 3, 401-410 (June 2003))

Nature Reviews | Cancer

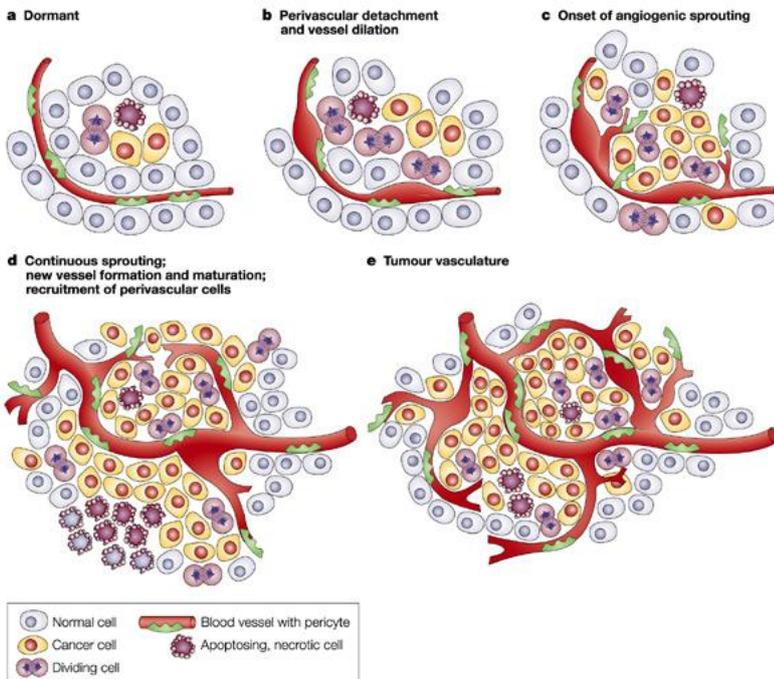


Fig. 5: Switch angiogenico (Gabriele Bergers & Laura E. Benjamin “*Tumorigenesis and the angiogenic switch*” *Nature Reviews Cancer* 3, 401-410 (June 2003))

Nature Reviews | Cancer

4. SCOPO DELLA RICERCA

Una simulazione del microambiente durante gli stadi precoci di una progressione tumorale è stata effettuata *in vitro* attraverso la coesistenza tra la linea cellulare di osteosarcoma umano MG-63 e una linea di fibroblasti umani sani HFs, in un sistema di co-coltura in transwell.

Dopo essersi inizialmente concentrati sull'osservazione di eventuali cambiamenti morfologici provocati dall'interazione diretta dei due gruppi cellulari tramite microscopia ottica ed elettronica, si è proceduto all'identificazione della proteina YKL-40 come marker principale per verificare l'influenza delle cellule tumorali sulle cellule sane. La proteina è stata successivamente silenziata nella linea di MG-63 per confermarne sia il ruolo patologico che l'influenza sul pattern di espressione di altri tipici markers tumorali da parte delle cellule sane e delle stesse cellule tumorali. E' stata infatti focalizzata l'attenzione su alcuni fattori chiave coinvolti nell'induzione tumorale e sul loro ruolo nell'angiogenesi, nell'invasione e nella metastatizzazione, quali TNF- α , IL-6, MMP-1, MMP- 9 e VEGF. Su entrambi i gruppi di cellule e in condizioni di presenza o assenza di silenziamento, sono state effettuate analisi molecolari tramite Real Time PCR e analisi proteiche tramite western blotting.

5. MATERIALI E METODI

5.1 COLTURA PRIMARIA DI FIBROBLASTI UMANI HFS

Tessuti gengivali umani sono stati raccolti dalle radici di denti molari estratti per ragioni ortodontiche, sotto consenso informato dei pazienti. Dopo diversi lavaggi in PBS, i tessuti sono stati sminuzzati e posti in piastre petri con l'aggiunta di 1 mL di DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplementato con il 10% (v/v) di FBS (fetal bovine serum), penicillina (100 mg/mL) e streptomina (10 mg/mL). Il medium è stato cambiato due volte a settimana e, una volta raggiunta la subconfluenza, le HFs sono state rimosse dalla petri tramite tripsina/ EDTA allo 0.05% (Gibco, Grand Island, NE), lavate e trasferite in fiasche T75 (Nunc, USA). Le cellule sono state cresciute in coltura a 37°C in atmosfera umidificata e in presenza di CO₂ al 5% e utilizzate per i successivi esperimenti.

5.2 COLTURA DELLA LINEA DI OSTEOSARCOMA UMANO MG-63

La linea cellulare delle MG-63 è stata acquistata dall' ATCC® CRL-1427™ (USA) e mantenuta in coltura in DMEM contenente 10% FBS, penicillina (100 mg/mL) e streptomina (10 mg/mL), in accordo con le indicazioni del datasheet del fornitore. Le cellule sono state tenute in coltura in fiasche T25 in incubatore umidificato a 37°C in presenza di CO₂ al 5%, staccate al momento della subconfluenza con tripsina/ EDTA allo 0.05% e ripiastrate per l'espansione.

5.3 CO-COLTURE IN MONOSTRATO E ANALISI MORFOLOGICA AL MICROSCOPIO A CONTRASTO DI FASE

Sono state seminate 10×10^3 cellule/ml di ciascuna linea cellulare su vetrini posti in multiwell e tenuti in co-coltura per 4 e 7 giorni. I campioni sono stati osservati tramite un microscopio a contrasto di fase a Motic AE21. Le immagini sono state acquisite mediante Visicam 3.0 e analizzate tramite il software VisiCam Image Analyzer, versione 6.1.3.3.

5.4 ANALISI ALL' HIGH RESOLUTION SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (HR-SEM)

Le due linee cellulari sono state seminate ad una densità di 10×10^3 cellule/ml su silici sterili e poste in condizioni di co-coltura per 24, 48, 72 e 96 ore in piastre petri, condividendo lo stesso medium. A ciascun tempo sperimentale, i silici sono stati lavati in tampone sodio cacodilato 0.15 M, fissati con una soluzione di glutaraldeide al 2.5% in tampone cacodilato 0.1 M (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) per 2 ore a 4°C e successivamente fissati con osmio OsO₄ all'1% (Società Italiana

Chimici, Roma, Italia) in tampone cacodilato 0.1 M per un'ora a RT (room temperature). Dopo diversi lavaggi in tampone cacodilato 0.15 M, i campioni sono stati disidratati in una serie ascendente di alcool e processati al CPD (critical point dried 030, Bal-Tec, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). I campioni sono quindi stati metallizzati con un sottile strato di carbon platino (Bal-Tec, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) e osservati all'HR-SEM (JSM 890, Jeol Company, Tokio, Japan) con voltaggio accelerato di 10 kV and 1×10^{-11} mA.

5.5 TRASFEZIONE siRNA NELLE MG-63

Le MG-63 sono state trasfettate con il siRNA Silencer Select Pre-designed *YKL-40* (ID s2998), acquistato dall'Ambion (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) insieme al Silencer Negative Control. Il giorno precedente alla trasfezione, le cellule sono state piastrate ad una densità di 2.5×10^5 cells/mL su supporti transwell 6-well permeabili (membrana in poliestere, pori di 0.4 μ m) in MEM serum-free (Gibco). Per ogni trasfezione, il siRNA *YKL-40* (75 pmol) è stato mixato a 7.5 μ L di Lipofectamine RNAiMax Reagent (Life Technologies) in MEM, incubato per 5 minuti RT, e aggiunto quindi alle cellule. Dopo 3 giorni, è stata verificata la vitalità delle cellule trasfettate, risultata ottimale rispetto alle cellule di controllo. L'efficienza di knockdown di *YKL-40* risultava essere dell'87% circa, raggiungendo l'88% tra 48 e 72 ore.

5.6 CO-CULTURA DI HF E MG-63 IN TRANSWELL

Sono stati allestiti due tipi di co-cultura, una in condizioni normali e l'altra in condizioni silenziate. Le HFs sono state seminate alla stessa densità delle MG-63 (2.5×10^5 cells/mL) in piastre 6-well, sulle quali, una volta effettuato il silenziamento, sono stati applicati gli inserti su cui erano state piastrate le MG-63 e le MG-63 silenziate. Le co-culture sono state quindi mantenute in DMEM supplementato con FBS al 10%, penicillina (100 mg/mL), e streptomina (10 mg/mL) per 24, 48, 72, e 96 ore. Le HFs, le MG-63 e le MG-63 silenziate sono state raccolte e analizzate per ciascun tempo sperimentale.

5.7 ESTRAZIONE E RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA

Per isolare l'RNA totale è stato utilizzato il kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Dueren, Germany) e per la quantificazione il NanoDrop ND-1000 UV-vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Per la retrotrascrizione è stato utilizzato il kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Life Technologies, Monza, Italy).

5.8 REAL-TIME PCR

L'analisi dell'espressione genica è stata effettuata utilizzando piastre TaqMan® 96-well pre-designed, (codice numero 4413266, formato 8, Life Technologies), caricando 10 ng di cDNA per ciascuna well di reazione contenente saggi TaqMan® Gene Expression per, *TNF- α* , *IL-6*, *YKL- 40*, *VEGF*, *MMP-1*, *MMP-9*, e un controllo endogeno (*GAPDH*). Le piastre sono state analizzate tramite la 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Life Technologies, Monza, Italy). Tutte le reazioni sono state eseguite in un volume di 25 μ L e in triplicato. Per valutare l'espressione dell'mRNA è stato utilizzato il metodo comparativo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$, considerando come reference l'espressione basale dell'mRNA delle HF e delle MG-63 cresciute indipendentemente e utilizzate come controllo. I dati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti e mostrati come una media di triplicati \pm SD. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software GRAPH PAD PRISM 5.0 software (San Diego, CA, USA) e applicando i test di comparazione multipla ANOVA e Dunnett's. Le differenze sono state considerate significative a $P < 0.05$.

5.9 WESTERN BLOT E ANALISI DENSITOMETRICA

Per ciascun tempo sperimentale, i pellet cellulari sono stati lisati per 30 minuti tramite il buffer di estrazione RIPA (Invitrogen, Life Technologies, Monza Italy) con l'aggiunta di un cocktail di inibitori di proteasi (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA), 1 mM di PMSF e 0.15% di β -mercaptoetanololo (Fluka, Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA). I campioni sono stati centrifugati a 14000 rpm per 10 minuti a 4°C, e il contenuto totale di proteine è stato misurato effettuando il saggio Bradford (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

I campioni sono stati fatti correre su gel pre-cast SDS-PAGE Bolt® Bis-Tris Plus MES (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), e successivamente le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (GE Healthcare Europe GmbH, Milan, Italy), è stato effettuato un blocco con del latte no fat dry (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) per 30 min a RT, e sono state incubate con anticorpi primari per ciascuna proteina di interesse (*TNF- α* , *IL-6*, *YKL- 40*, *VEGF*, *MMP-1*, *MMP-9*, e la β tubulina come controllo endogeno), con le rispettive diluizioni, in TBS pH 7.5, overnight a 4°C. Le bande sono state visualizzate usando il kit di rilevazione ECL Advanced TM Western Blotting Detection (GE Healthcare Europe GmbH, Milan, Italy) e le immagini sono state acquisite con la Kodak Digital Image Station (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA). E' stata effettuata un'analisi densitometrica utilizzando il software Image J (National Institutes of Health). Le intensità delle bande di ciascuna proteina sono state normalizzate con quelle delle equivalenti per la β -tubulina, scelta come controllo endogeno, ed espresse come quantificazione relativa all'intensità del campione di controllo. I dati densitometrici sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti ed espressi

come media \pm SD. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software GRAPH PAD PRISM 5.0 software (San Diego, CA, USA) e applicando i test di comparazione multipla ANOVA e Dunnett's. Le differenze sono state considerate significative a $P < 0.05$.

6. RISULTATI

6.1 ANALISI MORFOLOGICHE AL MICROSCOPIO OTTICO E ALL' HR-SEM

Le prime analisi del network fisico e paracrino che si instaura tra cellule sane e cellule tumorali durante la trasformazione maligna, si sono concentrate sulle osservazioni a livello morfologico delle due popolazioni cellulari cresciute a contatto. Dopo 4 giorni di co-coltura, le MG-63 e le HFs iniziavano ad organizzarsi in strutture “cord-like”, che diventavano sempre più inspessite fino al giorno 7, quando le HFs apparivano quasi completamente coperte dalle MG-63. Al contrario, i campioni di controllo delle MG-63s e delle HFs, cresciute separatamente in monolayer distinti, mostravano ciascuna le proprie caratteristiche morfologiche cellulari: le MG-63 mostravano dopo 24 ore una morfologia poligonale, e le HFs una tipica morfologia fibroblastica con corpi cellulari allungati. Al termine dei 7 giorni di coltura, sia le HFs che le MG-63s avevano raggiunto la confluenza (Figura 6).

Le immagini in time-laps all'HR-SEM hanno evidenziato come, a differenza dei controlli in cui era visibile una morfologia caratteristica riconducibile a ciascuno dei due tipi cellulari (Figura 7, 1a e 1b), nei punti sperimentali di osservazione dalle 48 ore circa in poi, le HFs perdevano il loro orientamento spaziale ordinato per assumerne uno più confuso e frastagliato, mentre le MG-63, raggiunta precocemente la confluenza rispetto alle HFs, avanzavano velocemente verso le cellule sane invadendone lo spazio e sovrapponendosi ad esse a 96 ore (Figura 7, 6a e 6b).

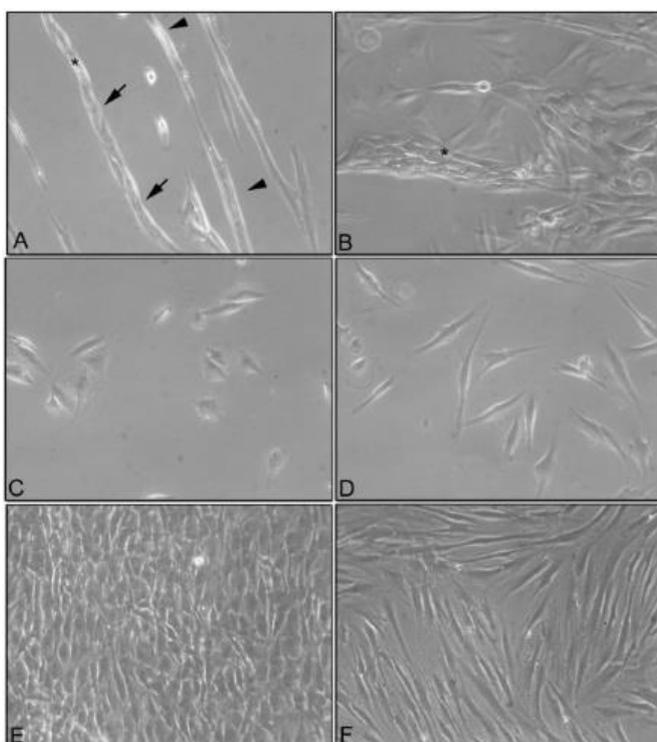


Fig. 6: Microscopia ottica a contrasto di fase: (A) MG-63 e HFs dopo 4 giorni di co-coltura. Strutture “cord-like” (*). MG-63 (freccie) adese alle strutture. HFs singole (punte). (B) MG-63 e HFs dopo 7 giorni di co-coltura. Strutture “cord-like” inspessite (*). (C) MG-63 cresciute separatamente in monostrato dopo 24 ore (D) HFs cresciute separatamente in monostrato per 24 h. (E) MG-63 cresciute separatamente in monostrato dopo 7 giorni (F) HFs cresciute separatamente in monostrato dopo 7 giorni. Ingrandimento 100X. Numero di apertura 0.25.

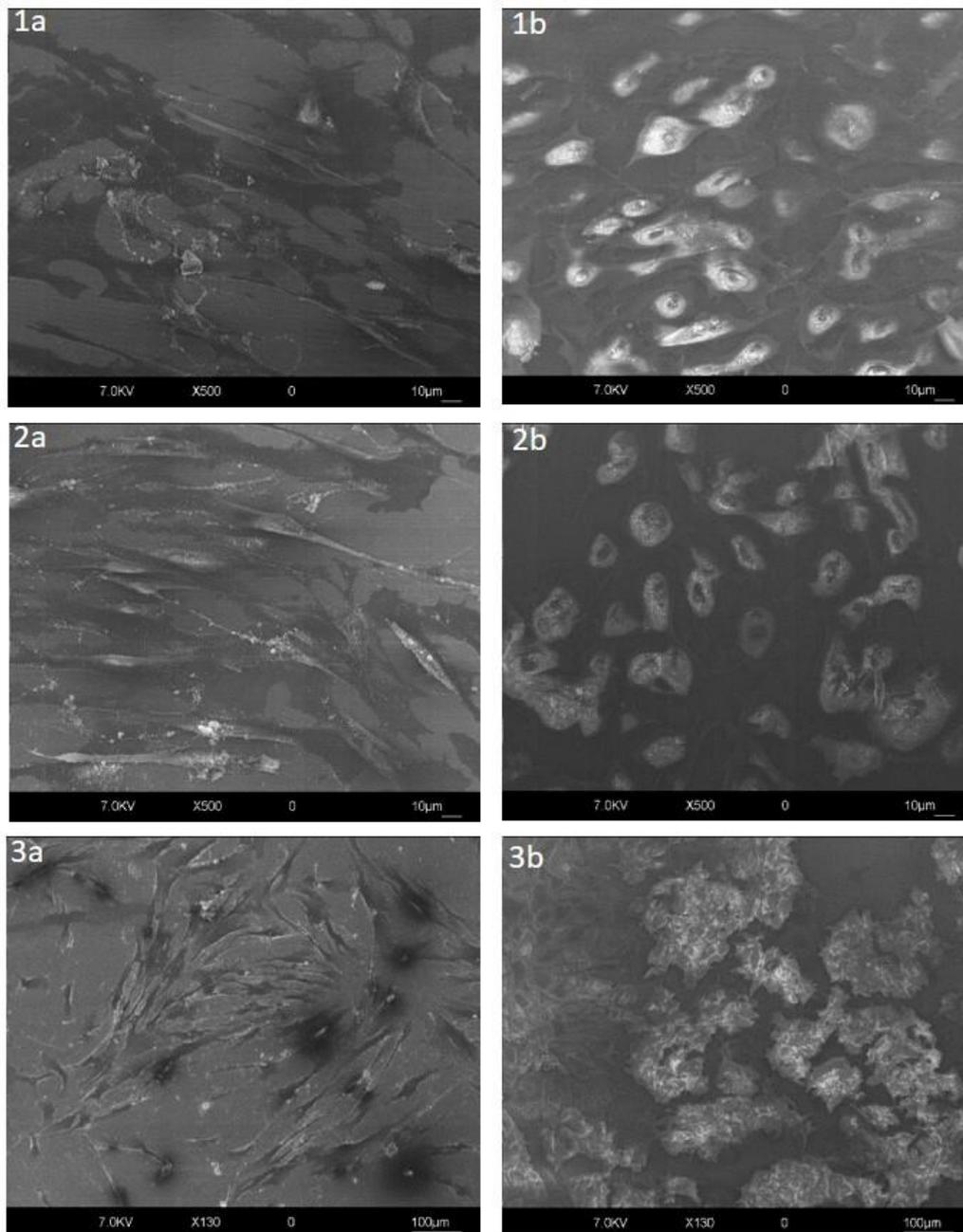


Fig. 7: Microscopia elettronica a scansione HR-SEM: (1a e 1b) HF_s (sx) e MG-63 (dx), controlli. Riconoscibili le caratteristiche morfologiche dei due tipi cellulari, tipicamente allungate per le HF_s e poligonali per le MG-63. (2a e 2b): HF_s e MG-63 dopo 24 ore di co-coltura. (3a e 3b): HF_s e MG-63 dopo 48 ore di co-coltura: progressiva perdita nelle HF_s dell'orientamento spaziale. Sub-confluenza delle MG-63.

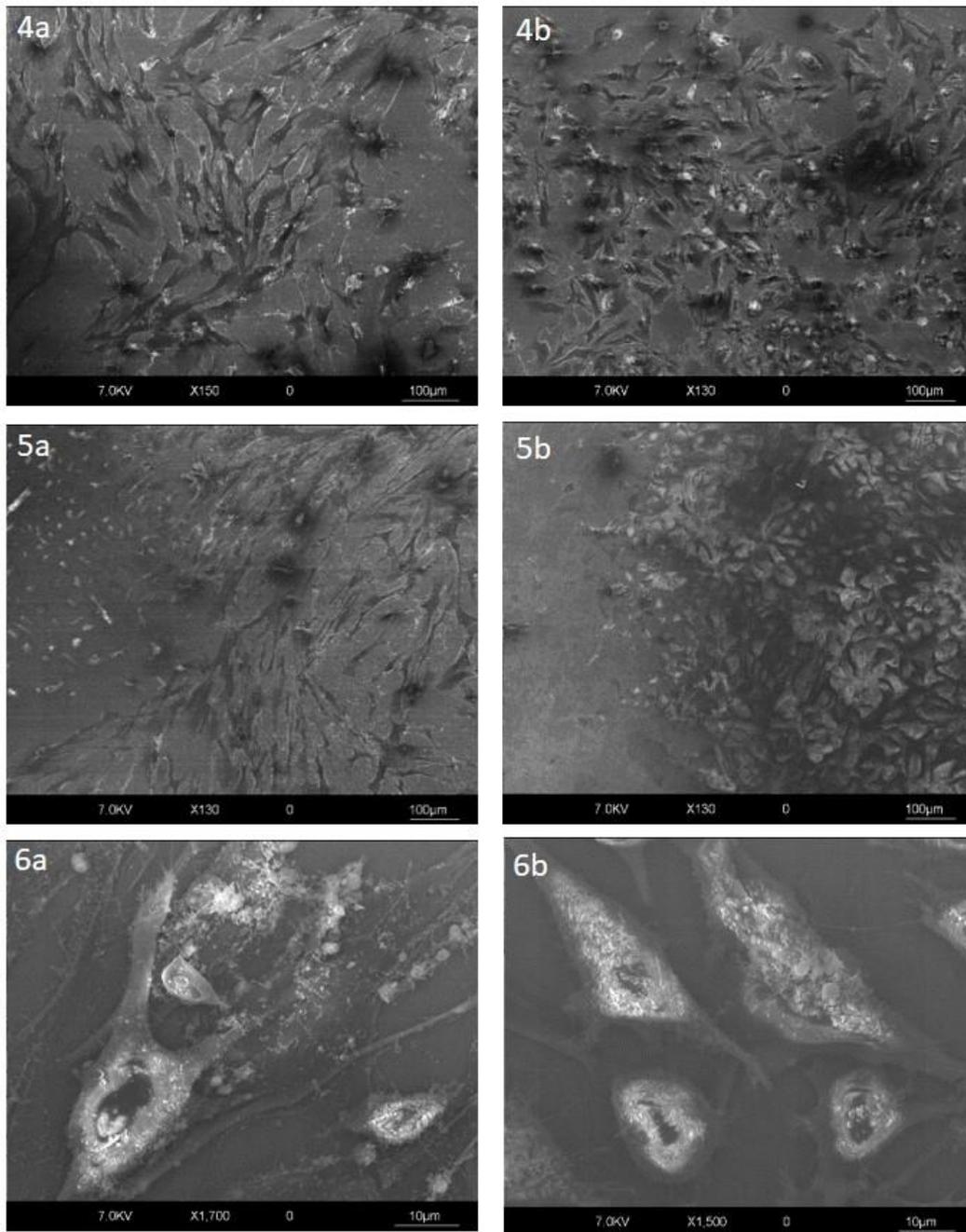


Fig. 8: Microscopia elettronica a scansione HR-SEM: (4a e 4b) HF e MG-63 dopo 72 ore di co-cultura. Organizzazione spaziale delle HF confusa e frastagliata. MG-63 in grande attività proliferativa. (5a e 5b): HF e MG-63 dopo 96 ore di co-cultura: invasione dello spazio cellulare occupato dalle HF da parte delle MG-63, giunte velocemente a confluenza. (6a e 6b, dettagli cellulari di 5a e 5b): sovrapposizione delle MG-63 sulle HF. Le MG-63 dell'immagine 6a sono state identificate come tali dopo un confronto morfologico con l'immagine 6b.

6.2 REAL-TIME PCR

6.2.1 Espressione di *TNF- α*

Come verificato tramite Real-Time PCR, la concentrazione dell'mRNA di *TNF- α* aumentava significativamente nelle HFs dopo che queste venivano fatte crescere in co-coltura, mentre nelle cellule tumorali la concentrazione dello stesso mRNA rimaneva bassa e costante. Un trend simile si è osservato nei campioni di HFs raccolti dalle co-culture con le MG-63 silenziate per *YKL-40*: un incremento nell'espressione dell' mRNA di *TNF- α* nelle HFs e una concentrazione bassa e costante nelle MG-63 (Figura 9).

6.2.2 Espressione di *IL-6*

L'espressione di *IL-6* nelle HFs in co-coltura aumentava nel tempo, raggiungendo il picco più alto a 72 ore. Nelle coculture silenziate per *YKL-40*, si è osservata un'espressione più bassa, ma costante nelle HFs, al contrario delle MG-63, che esprimevano livelli molto bassi di *IL-6*, sia nelle co-culture normali che in quelle silenziate. (Figura 10).

6.2.3 Espressione di *YKL-40*

Il knockdown tramite siRNA di *YKL-40* raggiungeva la massima efficienza a 72 ore nelle MG-63 cells; il dato è stato raffrontato all'espressione di *YKL-40* nelle MG-63 raccolte dalla co-coltura normale, in cui era fortemente espressa. Nella co-coltura normale, i fibroblasti incrementavano il livello di *YKL-40*, raggiungendo il picco massimo a 96 ore. *YKL-40* manteneva basse concentrazioni nei fibroblasti in co-coltura con le MG-63 silenziate. (Figura 11).

6.2.4 Espressione di *VEGF*

VEGF mostrava un andamento di espressione simile nelle HFs e nelle MG-63 cresciute in co-coltura, evidenziando un picco massimo di espressione a 96 ore. Sia nelle HFs che nelle MG-63 cresciute nella co-coltura silenziate, l'espressione risultava essere debole (Figura 12).

6.2.5 Espressione delle *MMPs*

Il rilascio di *MMP-1* è stato osservato precocemente nelle HFs, dopo 24 ore di co-coltura con le MG-63, raggiungendo la massima espressione dopo 96 ore. Nelle HFs in co-coltura con le MG-63 silenziate, l'espressione di *MMP-1* era significativamente bassa. Sia nelle MG-63 cells in co-coltura normale che in quelle provenienti dalla co-coltura silenziate, l'espressione di *MMP-1* era molto bassa (Figure 13). L'espressione di *MMP-9* diminuiva, dalle 24 alle 96 ore, nelle HFs in co-coltura normale,

e sembrava mantenersi costante fino a 72 ore nelle HF della co-cultura silenziata. L'espressione di *MMP-9* nelle MG-63 in entrambe le condizioni di co-cultura si mostrava debole. (Figura 14).

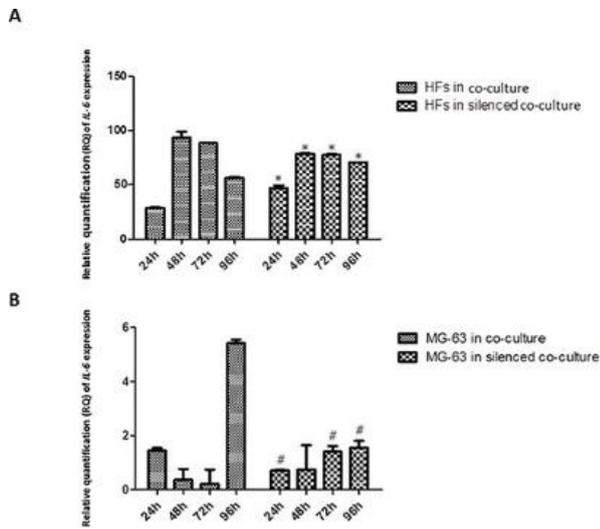


Fig. 9: Espressione di *TNF-α*

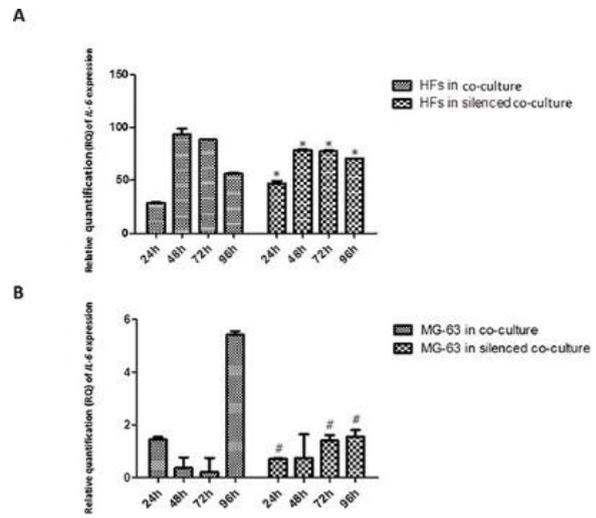


Fig. 10: Espressione di *IL-6*

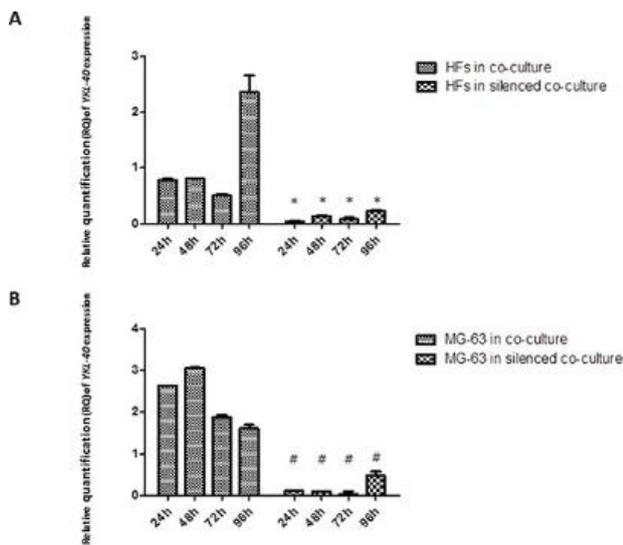


Fig. 11: Espressione di *YKL-40*

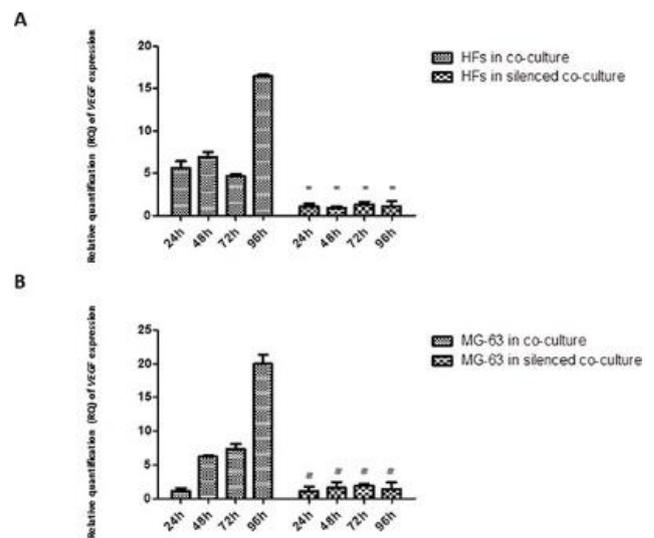


Fig. 12: Espressione di *VEGF*

Fig. 13: Espressione di *MMP-1*

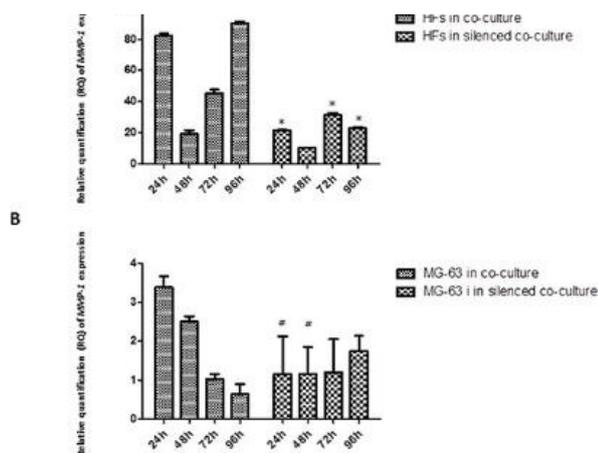
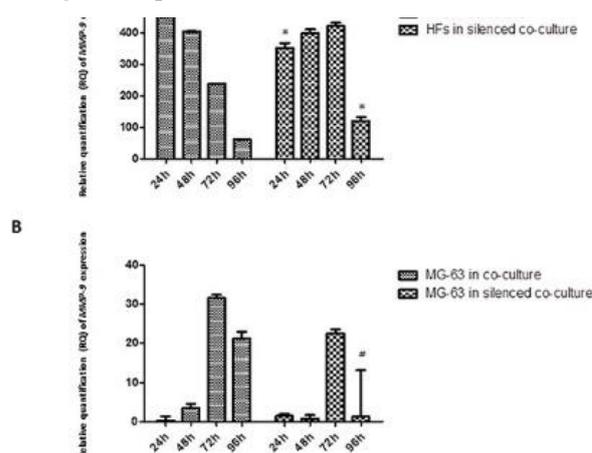


Fig. 14: Espressione di *MMP-9*



6.3 ANALISI WESTERN BLOT

6.3.1 Espressione di $TNF-\alpha$

In generale, l'espressione proteica del $TNF-\alpha$ si è mostrata piuttosto debole in entrambe le condizioni di co-cultura. Per ciò che riguarda sia le HF's che le MG-63s l'analisi densitometrica ha evidenziato come nella condizione di normale co-cultura, l'espressione del $TNF-\alpha$ mostrava un lieve aumento nel tempo, raggiungendo un picco a 96 ore in entrambi i gruppi cellulari. Nella condizione silenziata, l'espressione nelle HF's in co-cultura normale era meno marcata rispetto ai corrispettivi campioni della co-cultura silenziata, e abbastanza costante durante tutti e quattro i tempi sperimentali nelle MG-63 (Figura 15).

6.3.2 Espressione di IL-6

Anche l'espressione di IL-6 era piuttosto debole in entrambe le condizioni di co-cultura e per entrambi i gruppi cellulari: le HF's in co-cultura normale mostravano un lieve aumento di espressione a 48 ore, che rimaneva costante fino a 96 ore, mentre nella condizione silenziata si evidenziava un andamento gaussiano con un picco a 72 ore. Nelle MG-63s l'espressione di IL-6 era leggermente più bassa rispetto a quella delle HF's, in entrambe le condizioni di co-cultura, decrescendo nella condizione normale e mantenendosi piuttosto costante in quella silenziata (Figura 16).

6.3.3 Espressione di YKL-40

E' stato possibile apprezzare l'espressione di YKL-40 soltanto nella condizione di co-cultura normale: in particolare, si verificava un aumento di espressione nelle MG-63 a 96 ore, mentre nelle

HF, che fino a 48 ore non sembravano esprimere la proteina, comparivano due bande di segnale negli ultimi due tempi sperimentali (Figura 17).

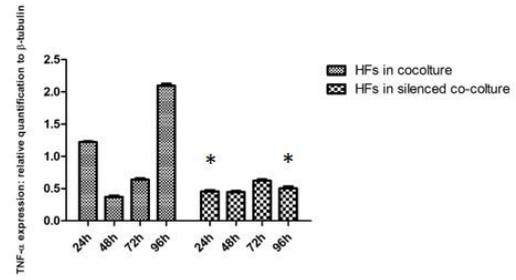
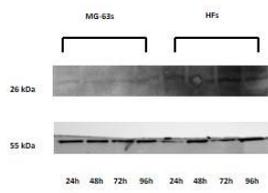
6.3.4 Espressione di VEGF

Il VEGF mostrava un graduale aumento nella sua espressione da parte delle HF cresciute in co-coltura, raggiungendo un picco massimo a 72 ore. Nelle stesse cellule analizzate nella condizione silenziata invece, il VEGF decresceva fino a raggiungere il livello minimo a 96 ore. Nelle MG-63 l'espressione del VEGF era tendenzialmente più alta rispetto alle HF, aumentando a 72 e a 96 ore, mentre nella condizione silenziata i livelli della proteina apparivano dimezzati (Figura 18).

6.3.5 Espressione delle metalloproteasi MMP-1 e MMP-9

L'analisi densitometrica evidenziava, in entrambi i tipi cellulari, elevati livelli di MMP-1 dopo sole 24 ore di co-coltura, che aumentavano ulteriormente fino alle 96 ore. Nella condizione silenziata, le MG-63s mostravano un graduale decremento di espressione fino a 72 ore e un successivo aumento a 96 ore che riportava i livelli della proteina a quelli iniziali. Un trend simile si riscontrava nelle HF, dove tuttavia i livelli di espressione erano generalmente più bassi e a 96 ore non raggiungevano i livelli delle 24 ore (Figura 19). L'espressione della MMP-9 sembrava subire, nelle HF, la condizione di silenziamento, in quanto decresceva sensibilmente rispetto alle stesse cellule mantenute in condizioni di normale co-coltura, che mostravano invece elevati livelli della proteina fino a 48 ore e livelli inferiori a 72 e a 96 ore. Le MG-63 esprimevano MMP-9 a livelli più bassi rispetto a quelli delle HF, altalenanti nella condizione di normale co-coltura e abbastanza costanti nella co-coltura silenziata (Figura 20).

TNF- α expression of MG-63s and HFs in co-culture



TNF- α expression of MG-63s and HFs in silenced co-culture

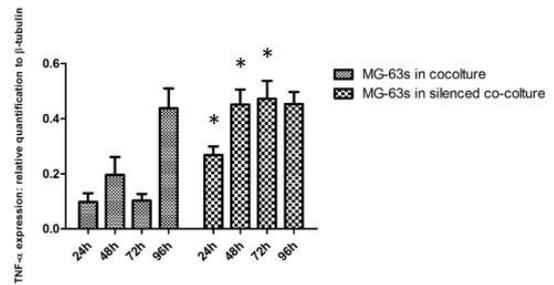
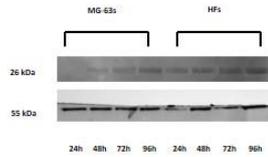
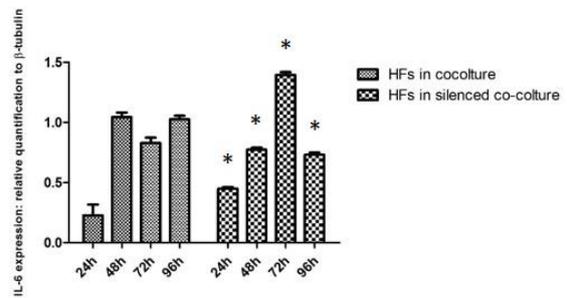
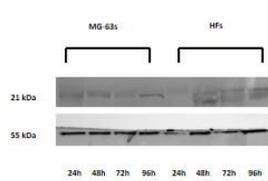


Fig. 15: Espressione di TNF- α

IL-6 expression of MG-63s and HFs in co-culture



IL-6 expression of MG-63s and HFs in silenced co-culture

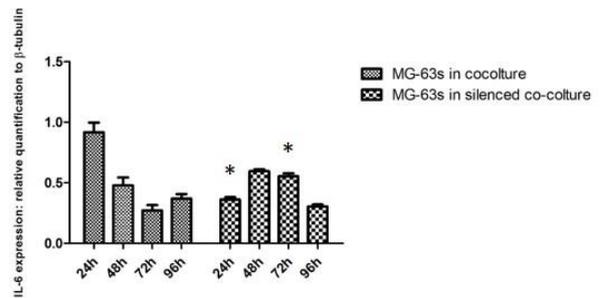
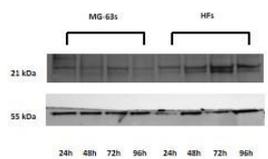
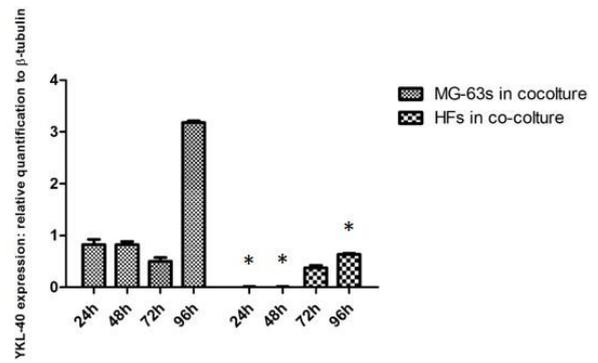
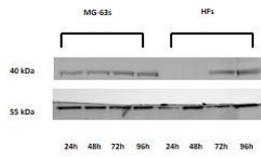


Fig. 16: Espressione di IL-6

YKL-40 expression of MG-63s and HFs in co-culture



YKL-40 expression of MG-63s and HFs in silenced co-culture

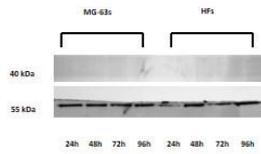
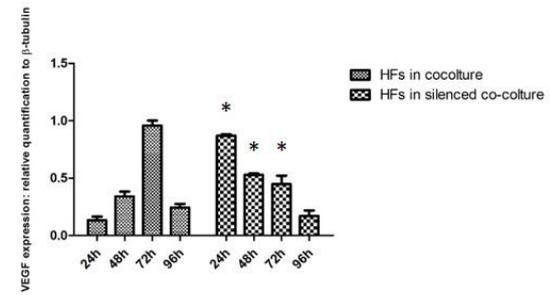
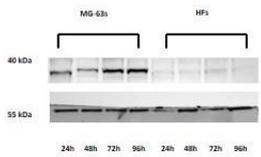


Fig. 17: Espressione di YKL-40

VEGF expression of MG-63s and HFs in co-culture



VEGF expression of MG-63s and HFs in silenced co-culture

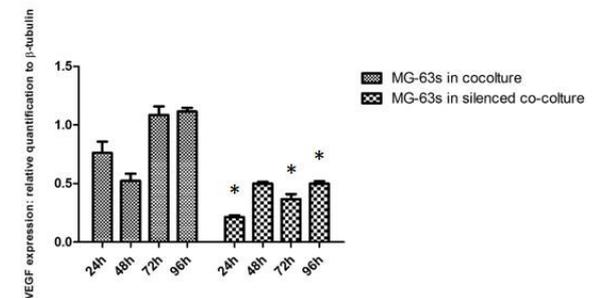
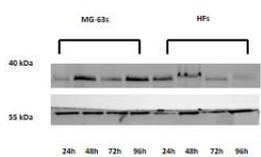


Fig. 18: Espressione di VEGF

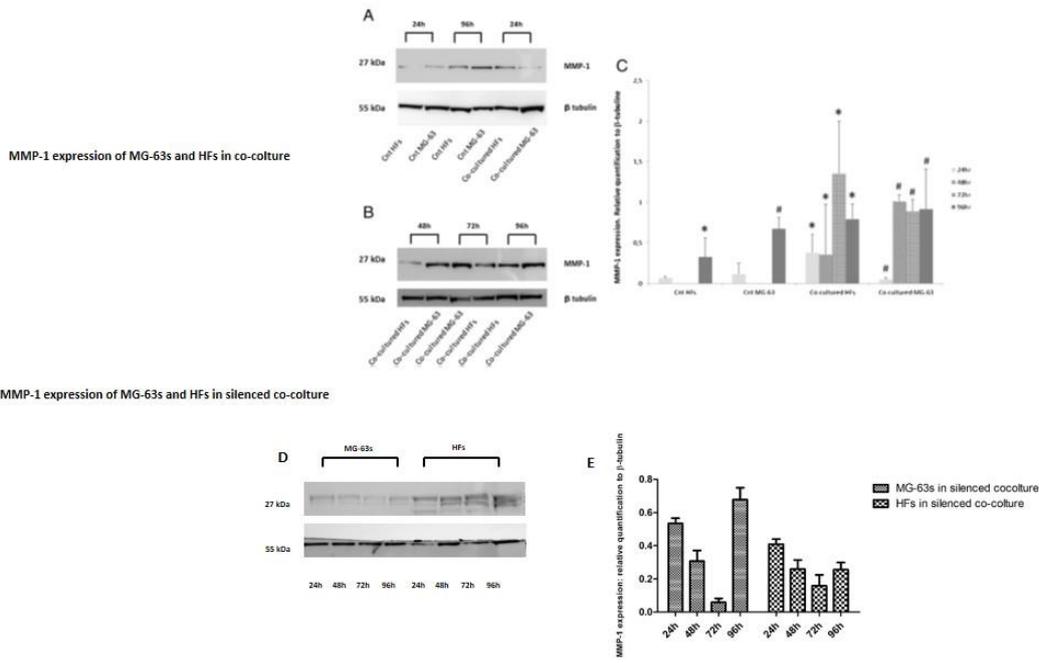


Fig. 19: Espressione di MMP-1

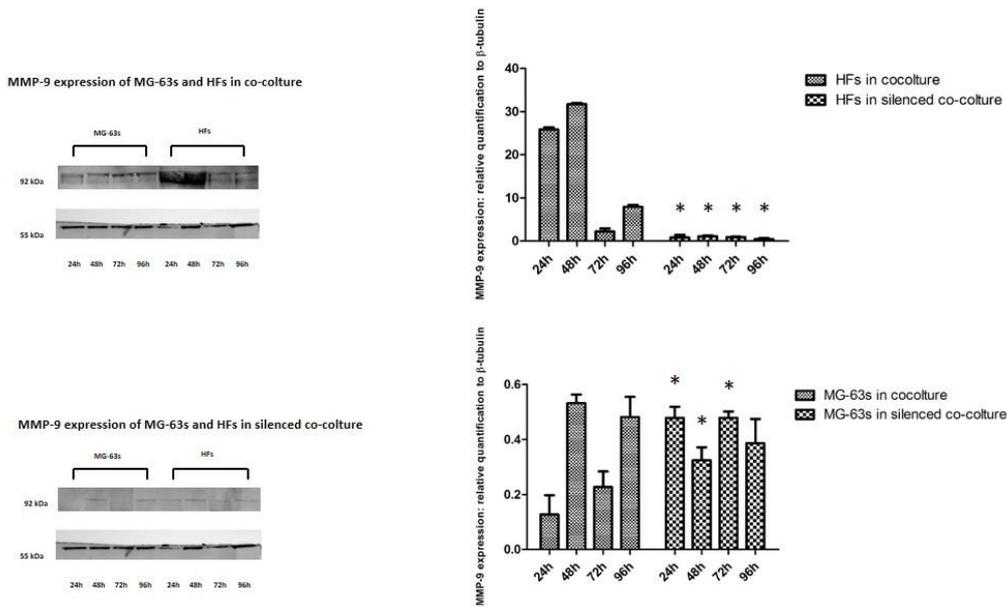


Fig. 20: Espressione di MMP-9

7. DISCUSSIONE

Il paradigma per spiegare l'inizio e la progressione del cancro si basa sulle rivoluzionarie scoperte degli oncogeni e degli oncosoppressori, che molto hanno rivelato circa il ruolo delle alterazioni genetiche nelle vie di segnale, le quali deviano le normali funzioni cellulari verso la progressione tumorale. Tuttavia, è chiaro che singole teorie geniche o sequenziali acquisizioni di mutazioni sottostimano la natura dei cambiamenti genetici ed epigenetici nei tumori, e non tengono conto dell'osservazione che molti geni predisposti alla tumorigenicità (come BRCA1, APC) mostrano un'elevata specificità tissutale in associazione alla loro trasformazione neoplastica. Pertanto, il contesto cellulare e tissutale deve conferire informazioni addizionali e cruciali necessarie ai geni mutati per esercitare la loro influenza. E' ormai noto che le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare sono elementi essenziali che aiutano a definire la natura del contesto tissutale e che giocano un ruolo cruciale nella regolazione dell'omeostasi e della specificità tissutale. In che modo questo contesto determini un'integrità funzionale, e come la perdita di quest'ultima possa portare ad uno stato di malignità, ha molto a che fare con l'importanza del ruolo del microambiente nella progressione tumorale [52].

Il microambiente tumorale contribuisce allo sviluppo del cancro, influenzando le complesse interazioni e i cambiamenti genetici ed epigenetici che riguardano le cellule. Recenti studi hanno evidenziato come, accanto a segnali biochimici, anche segnali fisici possono profondamente alterare il contesto cellulare. I nuovi sistemi *in vitro* di simulazione del microambiente tumorale stanno diventando sempre più sofisticati, specializzandosi nell'analisi di distinti parametri fisici, come la misurazione dei pori di membrana, l'allineamento delle fibre, la proliferazione cellulare e il potenziale metastatico, e di parametri molecolari, chiarendo i differenti ruoli che rivestono ciascuna di queste componenti nel guidare il processo della progressione tumorale [53]. Durante la trasformazione maligna, le cellule sane e quelle tumorali sono descritte come un network crescente di segnali fisici e paracrini; con questo approccio, in questo studio si è scelto di analizzare aspetti morfologici e molecolari conseguenti alla coesistenza tra le cellule tumorali MG-63 e i fibroblasti sani HFs, allo scopo di stabilire un modello *in vitro* che potesse simulare un microambiente tumorale.

L'influenza del contatto diretto tra cellule tumorali e cellule non maligne è stata analizzata morfologicamente su monostrati di cellule in co-coltura. A differenza dei rispettivi gruppi cellulari di controllo, i quali mantenevano una morfologia differente e ben definita durante tutti i tempi sperimentali, le cellule seminate in co-coltura mostravano, dopo quattro giorni, strutture "cord-like" che andavano inspessendosi fino al settimo giorno, suggerendo per i fibroblasti un ruolo di supporto su cui le MG-63 aderivano e proliferavano. L'assenza di questo tipo di strutture nelle MG-63 e nelle

HF cresciute separatamente, ha suggerito un possibile riarrangiamento morfologico evidenziato anche da Fauquette e colleghi [54], i quali dimostrarono che la morfogenesi delle strutture “cord-like” fosse supportata da cambiamenti dei recettori cellulari di superficie dopo il contatto tra cellule sane e cellule tumorali, che, insieme all’elevata espressione di molecole di adesione, guidavano la riorganizzazione dei contatti cellula-cellula e cellula-matrice. Le immagini in time-laps all’HR-SEM hanno evidenziato come, nei punti sperimentali di osservazione dalle 48 ore circa in poi, i fibroblasti perdevano il loro ordinato orientamento spaziale per assumerne uno più confuso e frastagliato, mentre le MG-63, raggiunta precocemente la confluenza rispetto alle HFs, avanzavano velocemente verso le cellule sane, invadendone lo spazio e sovrapponendosi ad esse a 96 ore. Per confermare l’influenza del microambiente sulle interazioni tra cellule sane e cellule tumorali, si è scelto quindi di stabilire un modello *in vitro* di co-culture in transwell, allo scopo di analizzare l’espressione di alcuni dei maggiori marker coinvolti durante la progressione verso una condizione maligna. Johansen et al. [55] nel 1992 identificarono la proteina YKL-40, secreta *in vitro* in diversi tipi di tumori solidi ed espressa in maniera significativa delle MG-63. Poiché non ci sono dati riguardanti l’espressione *in vitro* di YKL-40 da parte dei fibroblasti [56], la proteina è stata scelta in questo studio come marker principale per verificare l’influenza delle MG-63 sui fibroblasti e per confermare il ruolo patologico di YKL-40 durante gli stadi precoci della progressione tumorale. Sono stati quindi allestiti due gruppi di co-cultura paralleli, per 24, 48, 72 e 96 ore: uno prevedeva la coesistenza in transwell delle MG-63 e delle HFs in condizioni normali, e l’altro in cui le MG-63 erano state silenziate per *YKL-40*, allo scopo di verificare se il knockdown della proteina influenzasse l’espressione degli altri marker che si era scelto di analizzare. E’ stata quindi validata l’espressione di TNF- α e IL-6, molecole responsabili dell’infiammazione e della regolazione di YKL-40, del fattore angiogenico VEGF, e delle metalloproteasi MMP-1 e MMP-9, coinvolte nella degradazione della matrice durante condizioni patologiche. L’analisi dell’espressione dell’*mRNA* ha evidenziato un interessante trend dei livelli *in vitro* di TNF- α . TNF- α è coinvolto nel network infiammatorio al quale contribuisce a tutti gli stadi dei processi maligni [57]. Diverse linee tumorali producono *in vitro* pochi picogrammi di TNF- α in assenza di stimoli infiammatori, e questa cronica produzione a bassi livelli nel microambiente tumorale può causare danni al DNA, mediare le interazioni tumore/cellule stromali, e indurre una serie di MMPs e citochine a promuovere lo sviluppo tumorale. [58]. I nostri risultati, sia in Real Time PCR che in Western Blot, dimostrano che in entrambe le condizioni di co-cultura, i livelli di TNF- α nelle MG-63 erano generalmente più bassi rispetto a quelli espressi dai due gruppi delle HFs, raggiungendo un picco più alto intorno alle 96 ore nella condizione di co-cultura normale, e un andamento più costante in quella silenziata. Dopo circa 48 ore in co-cultura con le cellule tumorali, nella condizione normale le HFs mostravano un aumento sia della concentrazione dell’*mRNA* di

TNF- α che del segnale della sua proteina. Nella co-coltura silenziata, nonostante l'aumento a livello dell'mRNA di *TNF- α* , il segnale della proteina si manteneva invece più basso e costante fino a 96 ore, suggerendo che *YKL-40* non influenzava l'espressione genica di *TNF- α* in nessuno dei due gruppi di esperimenti, ma che sembrava giocare un ruolo nella modulazione post-trascrizionale del *TNF- α* , probabilmente interferendo con la via di segnale NF- κ B, come suggerito da Chen et al. [59].

L'espressione di *TNF- α* induce, nei tessuti affetti da infiammazione, una rapida attivazione di *IL-6* [60], cosa che spiega il significativo aumento di espressione di *IL-6* nei fibroblasti, in entrambe le condizioni di co-coltura. Nelle MG-63 il trend di espressione di *IL-6* era simile a quello di *TNF- α* : più basso rispetto all'espressione da parte delle HFs, con un picco a circa 96 ore nella condizione normale, più costante invece nella condizione silenziata. Questa volta, il knockdown di *YKL-40* sembrava non influire particolarmente né sull'espressione genica di *IL-6*, né su quella proteica. Nielsen *et al.* [61] hanno dimostrato che, *in vitro*, l'incremento della concentrazione di *IL-6* ad un livello più alto del *TNF- α* , stimola il rilascio di *YKL-40*, suggerendo un link tra l'infiammazione e l'incremento della produzione di *YKL-40*. Nel nostro studio, durante la co-coltura con le cellule tumorali, le HFs iniziavano ad esprimere *YKL-40*, comportamento non rilevato di norma *in vitro*, e confermato anche dall'espressione proteica rilevata tramite Western Blot, avvalorando l'ipotesi del ruolo patologico di *YKL-40* durante diversi tipi di tumore. Inoltre, l'aumento di espressione di *YKL-40* soprattutto nelle MG-63 si accompagnava a quello del *VEGF*, suggerendo per *YKL-40* il ruolo di fattore angiogenetico nelle cellule tumorali, ben riportato in letteratura [62]. Ci aspettavamo dunque che il silenziamento di *YKL-40* avesse una diretta influenza sull'espressione del *VEGF*: effettivamente, nel nostro studio, i livelli dell'mRNA del *VEGF* aumentavano progressivamente nelle HFs e nelle MG-63 cresciute in condizioni normali di co-coltura, mentre erano notevolmente abbattuti nei due gruppi cellulari coesistenti nella condizione di co-coltura silenziata. Le analisi densitometriche delle bande ottenute tramite Western Blot hanno confermato come i livelli del *VEGF* fossero più elevati nelle cellule cresciute in condizioni normali rispetto ai valori dimezzati della condizione silenziata. Infine, i nostri risultati riguardanti le metalloproteasi hanno suggerito che, in una simulazione di microambiente tumorale, i fibroblasti rappresentano la principale sorgente di MMPs, espresse a livelli significativi. Le MMPs sono essenziali per la crescita tumorale, l'invasione e la formazione di metastasi [63], originando non solo dal compartimento tumorale maligno, ma soprattutto da cellule benigne come i fibroblasti, specialmente quelli che si trovano nei tessuti circostanti il tumore, che, trasformandosi in fibroblasti "cancer-associated", sono in grado di stimolare la motilità delle cellule tumorali e la loro invasione [64]. Nel nostro studio, l'incremento di *YKL-40* nei fibroblasti sembrava responsabile più dell'aumento dell'espressione di *MMP-1*, che di quella di *MMP-9*. Nei fibroblasti in co-coltura con le MG-63 silenziate per *YKL-40*, l'espressione di

MMP-1 era più bassa, non solo comparata all'espressione osservata nei fibroblasti della co-coltura normale, ma anche rispetto ai livelli di *MMP-9*, fortemente espressa ad alti livelli da parte dei fibroblasti di entrambe le condizioni di co-coltura. A livello proteico, l'espressione di *MMP-1* era generalmente più alta nei fibroblasti rispetto alle MG-63, in entrambe le condizioni di co-coltura, livelli che si abbassavano per entrambi i gruppi nella condizione silenziata. Le MG-63 mostravano livelli molto scarsi di espressione di *MMP-9* in entrambe le condizioni di co-coltura, mentre nelle HF, dopo un'iniziale overespressione a 24 e a 48 ore, si verificava una drastica diminuzione nelle ore successive, assestandosi a livelli simili a quelli rilevati nella condizione silenziata. Alcuni autori hanno dimostrato che *YKL-40* si lega ad importanti componenti dell'ECM come proteoglicani e collagene (i principali target di *MMP-1*) influenzandone la produzione e l'assemblamento [65]. Si può dunque ipotizzare che, durante una condizione di infiammazione cronica, IL-6 stimola l'espressione di *YKL-40*, che agisce da fattore regolatore nei processi catabolici, mostrando un'influenza diretta sull'espressione di *MMP-1* e *VEGF*. Nel 2006, Lee SO et al.[66] hanno evidenziato come l'espressione di *MMP-9* sia regolata da diverse citochine e fattori di crescita, tra cui le interleuchine, interferoni, EGF (Epidermal Growth Factor), NGF (Nerve Growth Factor), FGF basica (Fibroblast Growth Factor), VEGF, PDGF (Platelet Derived Growth Factor), e TNF. I nostri dati, discostandosi da quelli relativi alla *MMP-1*, possono correlarsi a questa valutazione, spingendoci ad ipotizzare che sia TNF- α a regolare i livelli di *MMP-9*, e non *YKL-40* [67, 68]. Ngrnyuang et al. hanno recentemente sottolineato [69] che gli effetti di *YKL-40* sono cellula-dipendenti, probabilmente dovuti alle differenti composizioni biochimiche che si verificano tra le varie linee cellulari. I fibroblasti umani e le MG-63 rappresentano due tipi cellulari biologicamente differenti coinvolti in ruoli paralleli durante la progressione tumorale. La nostra ipotesi è che *YKL-40* abbia ruoli sinergici: sulle HF, agisce similmente al fattore di crescita insulin-like growth factor-1, sostenendo la condizione infiammatoria e promuovendo una up-regolazione nell'espressione di *MMP-1*, allo scopo di rimodellare la matrice extracellulare. Inoltre, i livelli di espressione di *YKL-40* nelle MG-63, correlando con quelli del VEGF, confermano il ruolo di *YKL-40* come fattore pro-angiogenico, ben noto in letteratura.

I dati di questo studio enfatizzano la necessità di chiarire ulteriormente il complesso network molecolare e il continuo crosstalk tra le differenti componenti del microambiente tumorale. La conoscenza dei meccanismi coinvolti durante la progressione tumorale, l'invasività e il processo di metastatizzazione è essenziale per migliorare l'efficacia delle terapie correnti, rappresentando un significativo impatto clinico.

Terapie combinate, che abbiano come target non solo le cellule tumorali, ma anche lo stroma e i processi "wound-healing" associati ad esso, locali e sistemici, sono ormai considerate la chiave per

riuscire a trattare con successo il cancro. Considerare il cancro da una prospettiva tissutale e prendere in considerazione tutte le componenti, sia locali che quelle reclutate da siti più distanti, rappresenta il futuro nell'ambito delle terapie anti-tumorali e nella comprensione di come le cellule tumorali rispetto ad esse rispondono, si adattano, ed evolvono.

BIBLIOGRAFIA

1. Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res.* 2011;1(4):482-97.
2. Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, Sood R, West RB, Montgomery K, Chi JT, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS Biol.* 2004 Feb;2(2):E7.
3. Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell.* 2010 Feb 17;17(2):135-47. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.041.
4. Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers (Basel).* 2015 Dec 11;7(4):2443-58. doi: 10.3390/cancers7040902.
5. Cammarota F, Laukkanen MO. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Stromal Evolution and Cancer Progression. *Stem Cells Int.* 2016;2016:4824573. doi: 10.1155/2016/4824573
6. Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, Washington MK, Neilson EG, Moses HL. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science.* 2004 Feb 6;303(5659):848-51
7. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 May;6(5):392-401.
8. Allinen M, Beroukhim R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 2004 Jun 6, 17–32.
9. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* 1999 Oct 1;59(19):5002-11.
10. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas

promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005 May 6;121(3):335-48.

11. Crawford Y, Kasman I, Yu L, Zhong C, Wu X, Modrusan Z, Kaminker J, Ferrara N. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell*. 2009 Jan 6;15(1):21-34. doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.004.

12. Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, Nebelsiek T, Lundgren-May T, Canli O, Schwitalla S, Matthews V, Schmid RM, Kirchner T, Arkan MC, Ernst M, Greten FR. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2009 Feb 3;15(2):91-102. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.002.

13. Anderberg C, Li H, Fredriksson L, Andrae J, Betsholtz C, Li X, Eriksson U, Pietras K. Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res*. 2009 Jan 1;69(1):369-78. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2724.

14. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 2006 Jan 27;124(2):263-6.

15. Nelson CM, Bissell MJ. Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Semin Cancer Biol*. 2005 Oct;15(5):342-52.

16. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Mar;2(3):161-74.

17. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436-44. doi: 10.1038/nature07205

18. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001 Feb 17;357(9255):539-45.

19. Fusetti F, Pijning T, Kalk KH, Bos E, Dijkstra BW. Crystal structure and carbohydrate-binding properties of the human cartilage glycoprotein-39. *J Biol Chem.* 2003 Sep 26;278(39):37753-60.
20. Libreros S, Garcia-Areas R, Iragavarapu-Charyulu V. CHI3L1 plays a role in cancer through enhanced production of pro-inflammatory/pro-tumorigenic and angiogenic factors. *Immunol Res.* 2013 Dec;57(1-3):99-105. doi: 10.1007/s12026-013-8459-y.
21. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science.* 2002 May 31;296(5573):1634-5.
22. Havell EA, Fiers W, North RJ. The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF), I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity. *J Exp Med.* 1988 Mar 1;167(3):1067-85.
23. Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2006 Sep;25(3):409-16.
24. Kwong J, Chan FL, Wong KK, Birrer MJ, Archibald KM, Balkwill FR, Berkowitz RS, Mok SC. Inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha confers precancerous phenotype in an organoid model of normal human ovarian surface epithelial cells. *Neoplasia.* 2009 Jun;11(6):529-41
25. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2014;2014:149185. doi: 10.1155/2014/149185.
26. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther.* 2006;8 Suppl 2:S2.
27. Song L, Rawal B, Nemeth JA, Haura EB. JAK1 activates STAT3 activity in non-small-cell lung cancer cells and IL-6 neutralizing antibodies can suppress JAK1-STAT3 signaling. *Mol Cancer Ther.* 2011 Mar;10(3):481-94. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0502
28. Coward J, Kulbe H, Chakravarty P, Leader D, Vassileva V, Leinster DA, Thompson R, Schioppa T, Nemeth J, Vermeulen J, Singh N, Avril N, Cummings J, Rexhepaj E, Jirstrom K, Gallagher WM,

Brennan DJ, McNeish IA, Balkwill FR. Interleukin-6 as a therapeutic target in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2011 Sep 15;17(18):6083-96. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0945.

29. Kurzrock R, Voorhees PM, Casper C, Furman RR, Fayad L, Lonial S, Borghaei H, Jagannath S, Sokol L, Usmani SZ, van de Velde H, Qin X, Puchalski TA, Hall B, Reddy M, Qi M, van Rhee F. A phase I, open-label study of siltuximab, an anti-IL-6 monoclonal antibody, in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma, multiple myeloma, or Castleman disease. *Clin Cancer Res.* 2013 Jul 1;19(13):3659-70. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3349.

30. Rossi JF, Négrier S, James ND, Kocak I, Hawkins R, Davis H, Prabhakar U, Qin X, Mulders P, Berns B. A phase I/II study of siltuximab (CNTO 328), an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, in metastatic renal cell cancer. *Br J Cancer.* 2010 Oct 12;103(8):1154-62. doi: 10.1038/sj.bjc.6605872.

31. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun;3(6):401-10.

32. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000 Sep 14;407(6801):249-57.

33. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene.* 1999 Sep 20;18(38):5356-62.

34. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 2001 Nov;7(11):1194-201.

35. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2000 Oct;2(10):737-44.

36. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature.* 2005 Dec 15;438(7070):967-74.

- 37.** Albini A, Bertolini F, Bassani B, Bruno A, Gallo C, Caraffi SG, Maramotti S, Noonan DM. Biomarkers of cancer angioprevention for clinical studies. *Ecancermedalscience*. 2015 Nov 24;9:600. doi: 10.3332/ecancer.2015.600. eCollection 2015.
- 38.** Arjaans M, Schröder CP, Oosting SF, Dafni U, Kleibeuker JE, de Vries EG. VEGF pathway targeting agents, vessel normalization and tumor drug uptake: from bench to bedside. *Oncotarget*. 2016 Jan 14. doi: 10.18632/oncotarget.6918.
- 39.** Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw*. 2009 Dec;20(4):158-63. doi: 10.1684/ecn.2009.0170.
- 40.** Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*. 2001 Mar;114(Pt 5):853-65.
- 41.** Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997 Feb;18(1):4-25.
- 42.** Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005 Dec15;438(7070):967-74.
- 43.** Shirahama S, Aritomi T, Takeo S, Ando K, Wakamatsu S, Kumagawa M, Ichinose I, Tamura K. [Pilot study-previously treated advanced non-small cell lung cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2004 Dec;31(13):2133-7.
- 44.** Alizadeh AM, Shiri S, Farsinejad S. Metastasis review: from bench to bedside. *Tumour Biol*. 2014 Sep;35(9):8483-523. doi: 10.1007/s13277-014-2421-z.
- 45.** Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463-516.
- 46.** Lindberg RL, De Groot CJ, Montagne L, Freitag P, van der Valk P, Kappos L, Leppert D. The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis. *Brain*. 2001 Sep;124(Pt 9):1743-53.
- 47.** Hamacher S, Matern S, Roeb E. [Extracellular matrix -- from basic research to clinical significance. An overview with special consideration of matrix metalloproteinases]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2004 Sep 17;129(38):1976-80.

- 48.** Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Sep 3;89(17):1260-70.
- 49.** Georgescu EF, Mogoantă SȘ, Costache A, Pârvănescu V, Totolici BD, Pătrașcu Ș, Stănescu C. The assessment of matrix metalloproteinase-9 expression and angiogenesis in colorectal cancer. *Rom J Morphol Embryol.* 2015;56(3):1137-44.
- 50.** Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat Med.* 1996 Apr;2(4):461-2.
- 51.** Tabouret E, Bertucci F, Pierga JY, Petit T, Levy C, Ferrero JM, Campone M, Gligorov J, Lerebours F, Roché H, Bachelot T, van Laere S, Ueno NT, Toiron Y, Finetti P, Birnbaum D, Borg JP, Viens P, Chinot O, Gonçalves A. MMP2 and MMP9 serum levels are associated with favorable outcome in patients with inflammatory breast cancer treated with bevacizumab-based neoadjuvant chemotherapy in the BEVERLY-2 study. *Oncotarget.* 2016 Feb 23. doi: 10.18632/oncotarget.7612.
- 52.** Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation.* 2002 Dec;70(9-10):537-46.
- 53.** Spill F, Reynolds DS, Kamm RD, Zaman MH. Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Curr Opin Biotechnol.* 2016 Feb 29;40:41-48. doi: 10.1016/j.copbio.2016.02.007.
- 54.** Fauquette W, Dong-Le Bourhis X, Delannoy-Courdent A, Boilly B, Desbiens X. Characterization of morphogenetic and invasive abilities of human mammary epithelial cells: correlation with variations of urokinase-type plasminogen activator activity and type-1 plasminogen activator inhibitor level. *Biol Cell.* 1997 Oct;89(7):453-65.
- 55.** Johansen JS, Williamson MK, Rice JS, Price PA. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J Bone Miner Res.* 1992 May;7(5):501-12.
- 56.** Johansen JS, Jensen BV, Roslind A, Nielsen D, Price PA. Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Feb;15(2):194-202.

- 57.** Balkwill F, Joffroy C. TNF: a tumor-suppressing factor or a tumor-promoting factor? *Future Oncol.* 2010 Dec;6(12):1833-6. doi: 10.2217/fon.10.155.
- 58.** Li B, Vincent A, Cates J, Brantley-Sieders DM, Polk DB, Young PP. Low levels of tumor necrosis factor alpha increase tumor growth by inducing an endothelial phenotype of monocytes recruited to the tumor site. *Cancer Res.* 2009 Jan 1;69(1):338-48. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1565.
- 59.** Chen CC, Llado V, Eurich K, Tran HT, Mizoguchi E. Carbohydrate-binding motif in chitinase 3-like 1 (CHI3L1/YKL-40) specifically activates Akt signaling pathway in colonic epithelial cells. *Clin Immunol.* 2011 Sep;140(3):268-75. doi: 10.1016/j.clim.2011.04.007.
- 60.** Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol.* 2013 May;14(6):e218-28. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70582-X.
- 61.** Nielsen AR, Plomgaard P, Krabbe KS, Johansen JS, Pedersen BK. IL-6, but not TNF- α , increases plasma YKL-40 in human subjects. *Cytokine.* 2011 Jul;55(1):152-5. doi: 10.1016/j.cyto.2011.03.014.
- 62.** Shao R, Hamel K, Petersen L, Cao QJ, Arenas RB, Bigelow C, Bentley B, Yan W. YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. *Oncogene.* 2009 Dec 17;28(50):4456-68. doi: 10.1038/onc.2009.292.
- 63.** Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trümper L, Balkwill FR, Binder C. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis.* 2004 Aug;25(8):1543-9.
- 64.** Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B.* 2015 Sep;5(5):402-18. doi: 10.1016/j.apsb.2015.07.005. Epub 2015 Sep 8.
- 65.** Väänänen T, Koskinen A, Paukkeri EL, Hämäläinen M, Moilanen T, Moilanen E, Vuolteenaho K. YKL-40 as a novel factor associated with inflammation and catabolic mechanisms in osteoarthritic joints. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:215140. doi: 10.1155/2014/215140.

- 66.** Lee SO, Jeong YJ, Yu MH, Lee JW, Hwangbo MH, Kim CH, Lee IS. Wogonin suppresses TNF-alpha-induced MMP-9 expression by blocking the NF-kappaB activation via MAPK signaling pathways in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Dec 8;351(1):118-25.
- 67.** Salvatore V, Teti G, Bolzani S, Focaroli S, Durante S, Mazzotti MC, Falconi M. Simulating tumor microenvironment: changes in protein expression in an in vitro co-culture system. *Cancer Cell Int.* 2014 May 13;14:40. doi: 10.1186/1475-2867-14-40.
- 68.** Salvatore V, Focaroli S, Teti G, Mazzotti A, Falconi M. Changes in the gene expression of co-cultured human fibroblast cells and osteosarcoma cells: the role of microenvironment. *Oncotarget.* 2015 Oct 6;6(30):28988-98. doi: 10.18632/oncotarget.4902.
- 69.** Ngernyuang N, Francescone RA, Jearanaikoon P, Daduang J, Supoken A, Yan W, Shao R, Limpaboon T. Chitinase 3 like 1 is associated with tumor angiogenesis in cervical cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014 Jun;51:45-52. doi: 10.1016/j.biocel.2014.03.021.