

*Alma Mater Studiorum – Università di Bologna*

---

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

**Progetti n°1: Oncologia**

**XX Ciclo**

**Coordinatore: Chiar.mo Prof. Sandro Grilli**

**INIBIZIONE DI IGF1R: ANALISI COMPARATIVA DEL RUOLO  
TERAPEUTICO DELL'*INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1*  
*RECEPTOR* NEL SARCOMA DI EWING**

**TESI PRESENTATA DA:**

**Diana Zambelli**

**RELATORE CHIAR.MO PROF:**

**Mario Mercuri**

---

**Anno Accademico 2006-2007**

<b><u>INTRODUZIONE</u></b>	<b>3</b>
<b>FATTORI DI CRESCITA E CANCRO</b>	<b>3</b>
<b>IL SISTEMA IGF</b>	<b>4</b>
I RECETTORI	5
IGF-1R	5
InsR	6
IGF-1R e InsR a confronto	7
HYBRID-R	7
IGF-I, IGF-II E INSULINA	8
IGF-BPs	9
IGF-1R: CASCATA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE	9
Basi molecolari della specificità di IGF-1R vs InsR	13
IL SISTEMA IGF NEL CANCRO	14
Regolazione e ruolo prognostico del sistema IGF nel cancro	15
IGF-1R COME POSSIBILE BERSAGLIO TERAPEUTICO	19
Blocco del recettore attraverso anticorpi monoclonali	19
Inibizione della trasduzione del segnale mediante piccoli inibitori	20
Riduzione della funzione mediante l'utilizzo di dominanti negativi	21
Inibizione dell'espressione mediante RNA antisense	22
Inibizione dell'espressione mediante RNA interference	22
<b>IL SARCOMA DI EWING</b>	<b>24</b>
CARATTERISTICHE GENERALI	24
MARCATORI BIOLOGICI E MOLECOLARI	25
ASPETTI CLINICO-PATOLOGICI	26
TERAPIA E PROGnosi	27
<b>RUOLO DEL SISTEMA IGF NEL SARCOMA DI EWING</b>	<b>28</b>
<b><u>SCOPO DELLA TESI</u></b>	<b>31</b>
<b><u>MATERIALI E METODI</u></b>	<b>32</b>
<b><u>RISULTATI</u></b>	<b>49</b>
<b>ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI IGF-1R IN UNA SERIE DI CASI CLINICI</b>	<b>49</b>
<b>STUDIO DI UN INIBITORE TIROSIN-CHINASICO SPECIFICO PER IGF-1R</b>	<b>53</b>
ATTIVAZIONE BASALE DI IGF-1R IN VITRO	53
EFFETTO DI NVP-AEW541 SULLA CRESCITA IN VITRO	54
Crescita in monostrato	54

Crescita in assenza di ancoraggio	55
Analisi del ciclo cellulare	56
Apoptosi	56
EFFETTO DI NVP-AEW541 SULLE VIE DI SEGNALAZIONE MEDIATE DA IGF-1R	58
TRATTAMENTO COMBINATO DI NVP-AEW541 CON CHEMIOTERAPICI CONVENZIONALI IN VITRO	60
ANALISI DEGLI EFFETTI IN VIVO DI NVP-AEW541 SU CAPACITA' TUMORIGENICA	63
EFFETTO DI NVP-AEW541 SULLA MIGRAZIONE IN VITRO E SULLA CAPACITA' METASTATICA IN VIVO	65
ANALISI DEGLI EFFETTI TOSSICI IN VIVO DI NVP-AEW541	66
MODULAZIONE DELL'UP-TAKE DI GLUCOSIO IN VITRO DOPO TRATTAMENTO CON NVP-AEW541	67
ANALISI DEL SILENZIAMENTO GENICO DI IGF-1R MEDIANTE siRNA	69
SELEZIONE DEI CLONI	69
EFFETTI DEL SILENZIAMENTO DI IGF-1R SULLA CRESCITA IN VITRO	71
Crescita in monostrato	71
Crescita in assenza di ancoraggio	71
EFFETTO DEL SILENZIAMENTO DI IGF-1R SULLA CAPACITA' MIGRATORIA	73
VALUTAZIONE DELLE PRINCIPALI VIE DI SEGNALAZIONE ATTIVATE DA IGF- 1R	73
EFFETTO DEL SILENZIAMENTO DI IGF-1R SUL SISTEMA DELL'INSR	75
Espressione di InsR	75
Ruolo di IGF-I e insulina nella proliferazione cellulare	76
Espressione di recettori ibridi InsR/IGF-1R	77
Espressione genica di molecole coinvolte nel metabolismo del glucosio	79
Up-take del glucosio	80
<b><u>DISCUSSIONE</u></b>	<b>82</b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	<b>91</b>

# INTRODUZIONE

## FATTORI DI CRESCITA E CANCRO

Lo sviluppo di tumori maligni è il risultato di una serie di eventi genetici ed epigenetici (*loss of function* di geni oncosoppressori, attivazione di oncogeni, traslocazioni, ipermetilazione, etc) che colpiscono una singola cellula conferendole un vantaggio fenotipico. La selezione delle cellule tumorali nei confronti dei tessuti sani avviene, ad esempio, grazie ad una incrementata proliferazione, ad una ridotta apoptosi o ad inibizione del processo differenziativo. Le cellule dotate di queste caratteristiche e di una maggiore aggressività sono quindi in grado di colonizzare diversi siti anatomici portando alla formazione di una massa tumorale ed eventualmente di metastasi.

In condizioni fisiologiche, i processi di crescita, differenziamento, migrazione e apoptosi sono finemente regolati da diversi fattori di crescita che agiscono da modulatori positivi o negativi di tali fenomeni. Tali molecole si legano a specifici recettori di membrana innescando una cascata di trasduzione del segnale che in ultima analisi comporta l'attivazione o la repressione dell'espressione di una serie di geni bersaglio.

Molti fattori di crescita noti (EGF, FGFs, PDGFs e IGFs ad esempio) si legano a recettori di membrana dotati di un'intrinseca attività tirosin-chinasi. In seguito al legame del ligando, si ha un cambiamento conformazionale che permette l'attivazione del recettore e della sua via di segnalazione.

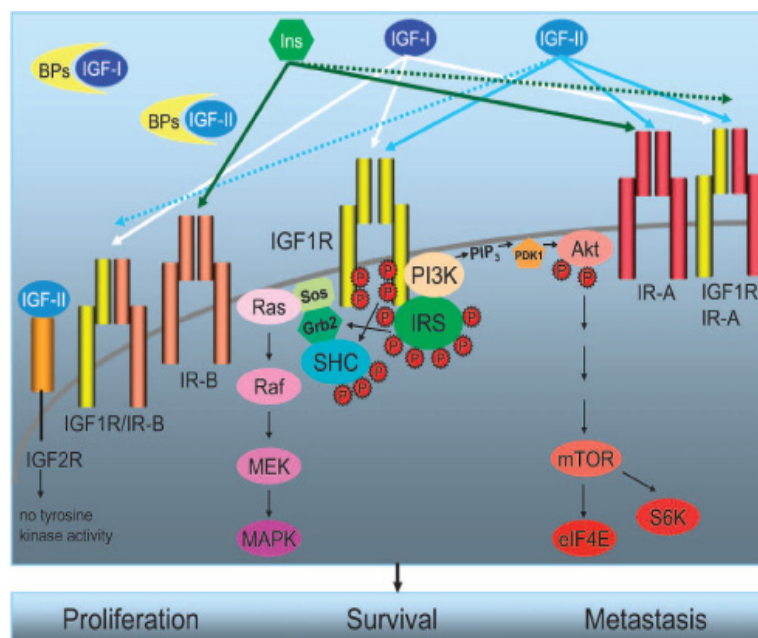
I recettori per i fattori di crescita nonché i fattori stessi e le relative vie di trasduzione del segnale possono essere frequentemente coinvolti nel meccanismo di trasformazione neoplastica. Molti oncogeni sono essi stessi recettori per fattori di crescita oppure sono molecole in grado di modularne l'attività in maniera diretta, legandosi ad essi modificandone lo stato fosforilativo, o in maniera indiretta, influenzandone la sintesi. Alternativamente possono intervenire mutazioni, attivatorie o inibitorie, a carico dei mediatori e dei regolatori del segnale (ad esempio Ras o PTEN).

L'analisi e la definizione di tali meccanismi è quindi fondamentale per meglio caratterizzare il processo di trasformazione neoplastica al fine di identificare molecole

su cui sviluppare terapie bersaglio specifiche da utilizzare in combinazione ai convenzionali trattamenti chemioterapici e radioterapici.

## IL SISTEMA IGF

La famiglia dell'Insulin-like Growth Factor (IGF) comprende tre ligandi (IGF-I, IGF-II e insulina), tre recettori di membrana (IGF-1R, IGF-2R e *Insulin Receptor* (InsR)) e sei diverse *IGF binding proteins* (IGF-BPs), che contribuiscono alla veicolazione e al mantenimento dell'equilibrio di IGFs nei vari tessuti bersaglio (Figura 1). Recentemente è stata poi evidenziata la presenza di un nuovo recettore ibrido formato da una subunità  $\alpha$ - $\beta$  di InsR e una subunità  $\alpha$ - $\beta$  di IGF-1R (HybridR), il cui ruolo biologico è tuttora poco conosciuto.



**Figura 1.** I componenti del sistema IGF. Insulina, IGF-I e IGF-II interagiscono con diversa affinità con i recettori InsR, IGF-1R e HybridRs attivandone la cascata di trasduzione del segnale. IGF-2R e le IGF-BPs regolano la disponibilità di IGF-I e IGF-II. (Sachdev & Yee, 2007)

La maggior parte degli studi sinora condotti attribuiscono ad IGF-1R un ruolo fondamentale nella crescita tissutale e nello sviluppo (Liu, Baker et al., 1993; Baker, Liu et al., 1993), mentre conferiscono all'attivazione di InsR da parte dell'insulina un ruolo nel controllo dell'omeostasi del glucosio. Dati ottenuti con tecniche di delezione gene specifica evidenziano come in realtà ci sia una parziale sovrapposizione tra le funzioni dei due recettori, con InsR capace di stimolare la proliferazione (Ludwig, Eggenschwiler et al., 1996) e IGF-1R in grado di regolare la risposta metabolica (Di

Cola, Cool et al., 1997). Tali studi mostrano inoltre come sia necessaria la corretta espressione di entrambi i recettori per poter avere un corretto sviluppo embrionale. Topi knock-out per IGF-1R nascono con dimensioni pari al 45% dei controlli e muoiono precocemente per problemi respiratori dati dal non corretto sviluppo muscolo scheletrico mentre la delezione del gene InsR porta a topi con dimensioni pari a circa il 90% dei controlli e problemi nel metabolismo del glucosio che muoiono precocemente dopo la nascita per chetoacidosi. La delezione di entrambi i recettori comporta poi l'ulteriore riduzione delle dimensioni al 30% dei controlli.

I due recettori non sono quindi in grado di sostituirsi reciprocamente e la loro contemporanea espressione è quindi necessaria per avere una corretta regolazione dei numerosi processi biologici controllati quali proliferazione, migrazione, apoptosi nonché metabolismo.

Alterazione a carico del sistema IGF sono infatti responsabili di diverse condizioni patologiche quali ad esempio diabete e acromegalia. Modificazioni importanti sono poi state osservate anche nei tumori, in cui l'alterazione dell'espressione delle diverse componenti e la modulazione dell'attività delle stesse è molto frequente (Samani, Yakar et al., 2007).

## **I RECETTORI**

La trasduzione del segnale del sistema IGF è affidata principalmente all'attivazione di tre recettori tirosin-chinasici: IGF-1R e InsR nonché HybridR, da essi derivato. Oltre a questi recettori è inoltre presente IGF-2R o recettore del Mannosio-6-fosfato, privo di attività di trasduzione del segnale, il cui ruolo principale sembra essere di tipo oncosoppressivo, sequestrando IGF-II e inibendone conseguentemente il legame agli altri recettori (LeRoith, Werner et al., 1995).

### **IGF-1R**

Il recettore per IGF-I è un recettore ad attività tirosin-chinasica espresso in maniera ubiquitaria nei diversi tessuti e coinvolto nella regolazione di diversi processi biologici quali sviluppo, proliferazione, apoptosi, migrazione e farmaco resistenza.

Il gene codificante IGF-1R si trova sul cromosoma 15q25-26 (Abbott, Bueno et al., 1992) su una regione di DNA genomico di dimensioni superiori a 100 kb e contenente 21 esoni. La regione che comprende gli esoni 1-3 codifica per il peptide segnale, per la regione N-terminale e per il dominio ricco in cisteina della subunità  $\alpha$ ; la restante parte della subunità  $\alpha$  è codificata dagli esoni 4-10; il sito di taglio che genera le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  a partire dal peptide precursore si trova nell'esone 11; la regione tra gli esoni 16 e 20 codifica per il dominio tirosin-chinasico presente nella regione  $\beta$ . Il cDNA di *IGFIR* è costituito da 4104 nucleotidi e origina un precursore proteico di 1367

aminoacidi. Dopo la rimozione del peptide segnale acido di 30aa, i restanti 1337aa sono ulteriormente processati da un'endopeptidasi sul sito Arg-Lys-Arg-Arg tra i residui 707 e 710. Il propeptide viene quindi glicosilato, dimerizzato e trasportato al Golgi dove viene ulteriormente tagliato dall'enzima furina in subunità  $\alpha$  e  $\beta$ . Attraverso la formazione di ponti disolfuro, tali subunità vanno quindi ad assemblarsi in un eterotetramero  $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$  che può quindi essere trasportato sulla membrana plasmatica. Tale processo è fortemente dipendente da N-glicosilazione (Samani, Yakar et al., 2007).

Il recettore di membrana maturo consiste di 2 catene  $\alpha$  extracellulari di 130/135 kDa e 2 catene  $\beta$  transmembrana di 90-95 kDa, unite da diversi ponti disolfuro  $\alpha$ - $\alpha$  e  $\alpha$ - $\beta$ . La subunità  $\alpha$ , costituita da 706aa, contiene una regione ricca in cisteine (aa 148-302) e rappresenta il sito di legame per i diversi ligandi. IGF-1R è infatti in grado di legare sia IGF-I che IGF-II, con un'affinità che è circa 3-4 volte superiore nel caso di IGF-I ( $EC_{50} = 0.2 \pm 0.3$  nM e  $0.6 \pm 1$  nM rispettivamente) (Pandini, Frasca et al., 2002). La subunità  $\beta$ , 627aa, permette la trasduzione del segnale in seguito a legame del fattore e conseguente attivazione del recettore. E' costituita da una regione extracellulare di 196aa in cui sono contenuti i 5 potenziali siti di glicosilazione, una porzione idrofobica transmembrana (aa 906-929) e una porzione intracellulare in cui si trovano i domini coinvolti nella trasmissione del segnale tra cui il dominio juxtamembrana, il dominio tirosin-chinasico (TK), contenente il sito di legame per l'ATP, e la porzione C-terminale.

I diversi domini svolgono un ruolo specifico nei processi di segnalazione intracellulare con regolazione di mitogenesi e migrazione affidata al dominio TK e capacità trasformante, nonché regolazione dell'attività metastatica, affidata al dominio C-terminale (Samani, Yakar et al., 2007; Blakesley, Kalebic et al., 1996).

## **InsR**

L'InsR è codificato da un gene presente sul cromosoma 19p13.3-13.2 (Abbott, Bueno et al., 1992) costituito da 22 esoni. La subunità  $\alpha$  è codificata da 11 esoni dispersi su una regione di DNA genomico superiore a 90 kb mentre gli 11 esoni codificanti la catena  $\beta$  sono contenuti in soli 30 kb di DNA genomico. Il cDNA di *InsR* è costituito da 4149 nucleotidi che generano un precursore proteico di 1382 aminoacidi tra cui 27aa codificanti il peptide segnale. La processazione del pre-propeptide e la maturazione a recettore maturo è analoga a quella di IGF-1R con glicosilazione e passaggio attraverso il Golgi.

E' importante evidenziare come l'esone 11 del gene *InsR* sia soggetto a splicing alternativo generando due diverse isoforme di InsR: l'isoforma B (InsR-B) e l'isoforma A (InsR-A), priva dei 12aa codificati dall'esone 11. Queste due isoforme sono caratterizzate da un diverso pattern d'espressione e da un parziale diverso ruolo

funzionale. InsR-B è espresso principalmente in fegato, muscoli e tessuto adiposo, svolgendo un ruolo nel metabolismo del glucosio. L'espressione di InsR-A è invece ristretta ai tessuti fetali in cui svolge prevalentemente un ruolo mitogenico. Studi recenti hanno però evidenziato una up-regolazione della espressione di InsR-A in diverse patologie neoplastiche, quali ad esempio tumore al seno, al colon, ai polmoni, alle ovaie e alla tiroide (Belfiore, 2007).

Le due isoforme presentano inoltre diversa affinità per i ligandi in grado di spiegare parzialmente il loro distinto ruolo biologico. Si ha infatti che sia InsR-A che InsR-B legano insulina con elevata affinità ( $EC_{50} = 0.2 \pm 0.2$  nM e  $0.3 \pm 0.4$  nM rispettivamente) mentre non sono in grado di legare IGF-I ( $EC_{50} > 30$  nM). La principale differenza tra i due recettori è data dal legame ad IGF-II. Tale molecola è in grado di legarsi a InsR-A con un'affinità analoga a quella dimostrata da IGF-1R ( $EC_{50} = 0.9 \pm 0.4$  nM) mentre lega solo debolmente InsR-B ( $EC_{50} = 11.0 \pm 5.0$  nM) (Pandini, Frasca et al., 2002). Il legame del ligando a InsR-A induce l'attivazione di una cascata di trasduzione del segnale che porta quindi a regolazione dell'omeostasi del glucosio, nel caso di insulina, o a segnali mitogenici, nel caso di IGF-II (Belfiore 2007; Morrione, Valentinis et al., 1997).

### **IGF-1R e InsR a confronto**

Nonostante il diverso ruolo biologico e la diversa localizzazione cromosomica di IGF-1R e InsR, i due recettori presentano un'omologia di sequenza aminoacidica superiore al 60%, facendo ipotizzare la presenza di un gene ancestrale comune tra le due molecole (Ullrich, Gray et al., 1986). Il livello di omologia aumenta ulteriormente se si considerano il dominio TK e il sito di legame per l'ATP che presentano rispettivamente omologia del 84% e del 100%. La maggiore divergenza si osserva invece nel dominio extracellulare ricco in cisteine (48%), coinvolto nel riconoscimento del ligando, nella porzione C-terminale della subunità  $\alpha$  (47%) e nella porzione N-terminale della subunità  $\beta$  (41%).

### **HYBRID-R**

Data l'elevata omologia tra i due recettori, la formazione di recettori ibridi costituiti da una subunità  $\alpha$ - $\beta$  di IGF-1R e una subunità  $\alpha$ - $\beta$  di InsR è altamente favorita. Gli HybridRs sono stati scoperti solo recentemente e ulteriori studi sono necessari al fine di caratterizzarne il ruolo biologico. I dati ad ora disponibili evidenziano come sia InsR-A che InsR-B possano assemblarsi in tali recettori ibridi generando HR-A e HR-B. La formazione di un tipo o dell'altro dipende dall'equilibrio tra le quantità delle diverse forme espresse (Pandini, Frasca et al., 2002).



Il comportamento biologico di tali recettori è assimilabile a quello di IGF-1R. Il principale ligando di entrambi gli HybridR è infatti IGF-I ( $EC_{50} = 0.3 \pm 0.2$  nM per HR-A e  $2.5 \pm 0.5$  nM per HR-B). Insulina e IGF-II sono in grado di legare con media e alta affinità solo HR-A ( $EC_{50} = 3.7 \pm 0.9$  nM e  $EC_{50} = 0.6 \pm 0.1$  nM, rispettivamente) mentre non interagiscono con HR-B ( $EC_{50} > 100$  nM e  $EC_{50} = 15.0 \pm 0.9$  nM, rispettivamente) (Pandini, Frasca et al., 2002). L'espressione di HybridRs modifica inoltre il ruolo funzionale dell'insulina. E' stato infatti dimostrato che il legame di insulina a HR-A, ma non HR-B, è in grado di indurre la fosforilazione della subunità  $\beta$  di IGF-1R, portando alla fosforilazione di Crk-II, un substrato specifico della cascata di trasduzione del segnale di IGF-1R, annullando quindi l'azione dell'insulina nel controllo del metabolismo del glucosio. Va inoltre sottolineato come, qualora siano presenti sia HR-A che IGF-1R, l'azione mitogenica di IGF-I si esplica attraverso il legame al recettore più espresso (Belfiore, 2007).

## **IGF-I, IGF-II e Insulina**

IGF-I è un peptide di 70aa con un peso molecolare di 7.5 kDa sia con caratteristiche di ormone circolante sia di fattore di crescita. Nonostante la fonte principale di IGF-I circolante sia il fegato, questo fattore di crescita può essere sintetizzato dalla maggior parte dei tessuti (Rosen & Pollak 1999). La regolazione dell'espressione epatica di IGF-I è molto complessa. Si ha infatti che il *Growth Hormone* (GH) è in grado di indurre l'espressione. Tale fattore è prodotto a livello della ghiandola pituitaria e la sua espressione è finemente regolata da molecole prodotte dall'ipotalamo quali somatostina e *Growth Hormone-Releasing Hormone* (Jones & Clemmons 1995). L'IGF-I circolante è poi in grado di agire con un meccanismo di *feedback* negativo su ipotalamo e ghiandola pituitaria riducendo il rilascio di GH.

L'espressione di IGF-I aumenta dalla nascita alla pubertà per poi progressivamente diminuire a partire dall'adolescenza, svolgendo un ruolo importante soprattutto nella regolazione della crescita dei tessuti mesenchimali, compreso osso e cartilagine.

IGF-II, analogamente ad IGF-I, è un peptide a singola catena di 74 kDa che presenta il 62% di omologia con IGF-I. E' prodotto da numerosi tessuti ma non subisce controllo ormonale. Nell'uomo, la sua espressione è però soggetta ad *imprinting* genomico, caratterizzata dall'espressione del solo allele paterno. L'espressione di IGF-II è costante durante il corso della vita e in fase adulta i suoi livelli sierici risultano essere da 3 a 7 volte superiori rispetto a quelli di IGF-I (Krassas, Pontikides et al., 2003).

Nella sua forma attiva l'insulina è una molecola costituita da 2 catene aminoacidiche, A (21aa) e B (30aa) legate da 2 ponti disolfuro. Il precursore presenta

un'omologia del 40% con IGFs (Furstenberger & Senn 2002). L'insulina è prodotta dalle cellule  $\beta$  delle isole di Langerhans del pancreas come proinsulina, in risposta ad aumento dei livelli ematici di glucosio, portando ad aumento dell'up-take di glucosio che può quindi essere direttamente convertito in energia o conservato come glicogeno o grassi.

## **IGF-BPs**

Le IGF-BPs sono molecole circolanti in grado di legare e veicolare IGFs all'interno dell'organismo. Gli studi finora condotti ne hanno identificate 6 con diversa affinità per IGF-I e IGF-II.

Queste molecole legano IGFs e li trasportano in diversi siti anatomici (IGF-BP 1, 2 e 4) oppure li sequestrano (IGF-BP3) incrementandone la stabilità. In seguito a taglio proteolitico da parte di proteasi specifiche per IGF-BPs o metallo proteasi si ha poi il rilascio dei fattori IGF che possono quindi legarsi ai recettori disponibili. Nei fluidi extracellulari le IGF-BPs modulano le interazioni tra ligandi e recettori di superficie con un effetto che va ad aumentare o ridurre la segnalazione di IGFs in relazione al contesto cellulare. Oltre a funzioni IGFs dipendenti, le IGF-BPs svolgono anche azioni IGFs indipendenti. Un esempio è dato da IGF-BP3 e IGF-BP5 che hanno dimostrato un effetto inibitorio su proliferazione e migrazione associato ad un'aumentata sensibilità all'apoptosi, indipendentemente dal legame con IGF-I (Baxter, 2000; Firth & Baxter, 2002; Jones & Clemmons, 1995).

IGF-BP3 risulta essere la forma predominante nel siero dove agisce come trasportatore e riserva, modulando i livelli sierici e locali di IGF-I. La sua espressione è inoltre a sua volta positivamente regolata da IGF-I (Bale & Conover 1992) e insulina (Mounier & Posner 2006).

## **IGF-1R: CASCATA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE**

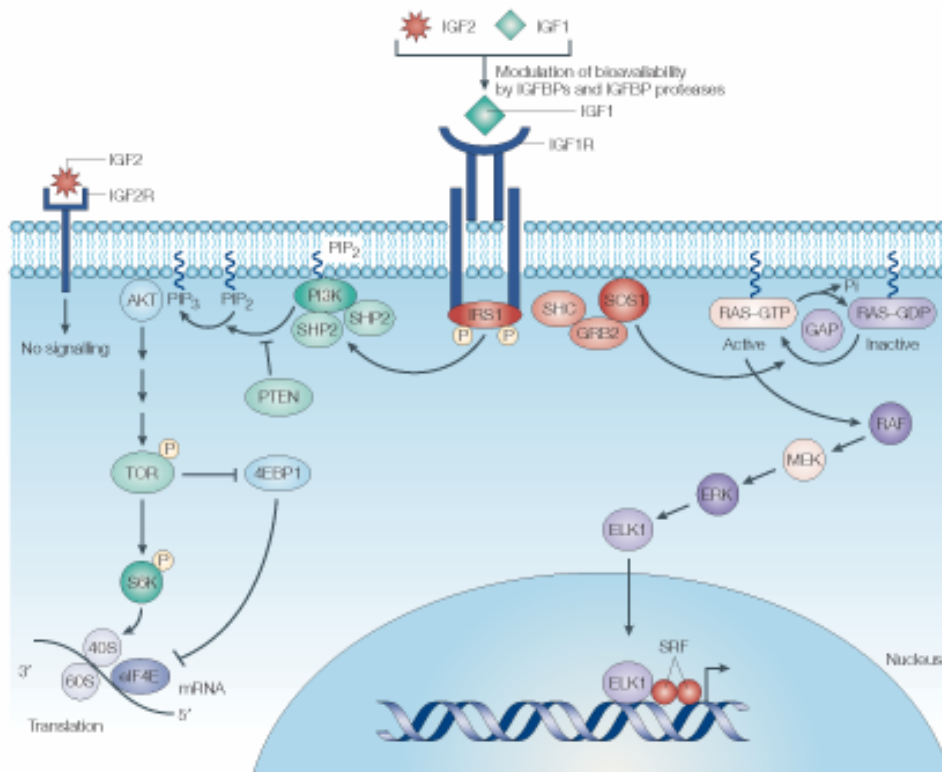
L'attivazione di IGF-1R induce la modulazione di numerosi processi biologici importanti sia a livello fisiologico che patologico. Si ha infatti che in seguito al legame del suo ligando, IGF-1R è in grado di stimolare proliferazione e crescita cellulare, proteggere le cellule dal processo apoptotico nonché indurre la trasformazione neoplastica. L'effetto proliferativo di IGF-I risulta più evidente se si analizza la crescita in condizioni di indipendenza da ancoraggio, caratteristica tipica delle cellule tumorali. IGF-I agisce inoltre stimolando la produzione di fattori pro-angiogenetici, ad esempio VEGF-A, aumentando la migrazione cellulare, inducendo differenziamento terminale e proteggendo le cellule dall'azione di farmaci chemioterapici.

Nella cascata di trasduzione del segnale mediata da IGF-1R, alcuni residui aminoacidici rivestono un ruolo fondamentale, come dimostrato dai diversi studi di mutazione sito specifica condotti nel corso degli anni. Tra questi le Tyr 1131, 1135, 1136, presenti nel dominio TK, svolgono un ruolo fondamentale nell'attività di IGF-1R: la loro sostituzione porta infatti ad un recettore quasi completamente inattivo. Un altro aminoacido importante presente nel sito di legame per l'ATP è la Lys1003: la sua sostituzione porta ad un *dead receptor*. Un residuo molto importante nel dominio juxtamembrana è la Tyr950, sito di legame per diverse molecole tra cui IRS-1, il principale mediatore della cascata di trasduzione del segnale di IGF-1R. Mutazioni a carico di tale aminoacido riducono l'azione del recettore senza però eliminarne l'attività mitogenica in risposta ad IGF-I (Baserga, 2000). Mutazioni del sito di legame per ATP, del cluster di tirosine o della Tyr950 aboliscono sia proliferazione che trasformazione (Gronborg, Wulff et al., 1993; Coppola, Ferber et al., 1994; Li, Ferber et al., 1994). Per quel che riguarda la porzione C-terminale, mutazioni delle Tyr 1250-1251 o di Phe1310 non alterano lo stato fosforilativo di IGF-1R e dei suoi principali mediatori IRS-1 e Shc. Il dominio C-terminale non è quindi coinvolto nella modulazione di MAPK e PI3K (Esposito, Blakesley et al., 1997). In contrapposizione però, l'espressione di un recettore troncato al residuo 1229 inibisce il processo di trasformazione di fibroblasti R2, senza però alterare la risposta mitogenica ad IGF-I (Surmacz, Sell et al., 1995). Per quel che riguarda la protezione dall'apoptosi, i principali residui coinvolti sembrano essere Tyr 1250-1251, His1293, Lys1294 e Ser 1280-1283 (O'Connor, Kauffmann-Zeh et al., 1997; Peruzzi, Prisco et al., 1999).

Il legame di IGF-I al suo recettore dà inizio ad una cascata di eventi che comincia con l'autofosforilazione delle tre tirosine del dominio TK di IGF-1R (Figura 2). La loro fosforilazione attiva il dominio tirosin-chinasico inducendo la fosforilazione di alcuni residui di IGF-1R nonché di diversi substrati coinvolti nella trasduzione del segnale. La Tyr950 fosforilata viene riconosciuta dal dominio *Phosphotyrosine Binding* (PTB) della famiglia di proteine *Insulin Receptor Substrate* (IRS) e dalle proteine Shc (Butler, Yakar et al., 1998; Samani & Brodt, 2001; Baserga, Hongo et al., 1997). Le proteine IRS (1-4) contengono a loro volta diversi siti di fosforilazione che vengono riconosciuti da proteine dotate di domini SH2 (*Src-homology-2*) tra cui ad esempio *Phosphatidylinositol-3 kinase* (PI3K), *Growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) e la *GTPase Activating Protein* (GAP) di Ras (Samani, Yakar et al., 2007).

PI3K è costituita da una subunità regolatoria (p85) e da una subunità catalitica (p110). p85 si lega ad IRS-1 tramite il suo dominio SH2; ciò favorisce la traslocazione di p110 sulla membrana plasmatica dove fosforila il fospatidilinositolo-(4,5)-bisfosfato (PIP2) a fospatidilinositolo-(3,4,5)-trisfosfato (PIP3). PIP3 è quindi in

grado di reclutare sulla membrana e attivare Akt tramite fosforilazione dei residui Ser473 e Thr308 da parte di PDK1.



**Figura 2.** La cascata di trasduzione del segnale di IGF-1R. In seguito a legame del ligando IGF-I o IGF-II si ha l'attivazione di 2 vie di segnalazione principali: MAPK e PI3K. (Pollak, Schernhammer et al., 2004)

Akt regola l'attività di diverse proteine tra cui l'enzima *glycogen synthase kinase 3* (GSK3), alcuni regolatori dell'apoptosi quali Bad e Caspasi 9, e molecole coinvolte nella regolazione della sintesi proteica quali la chinasi p70S6 e l'*Elongation Factor 4E binding proteins* (4EBP), tramite l'attivazione di *mammalian target of rapamycin* (mTOR). Akt è inoltre in grado di regolare l'espressione di vari geni, tra cui alcune proteine anti apoptotiche quali Bcl-2 e Bcl-X (Brazil, Yang et al., 2004), attraverso ad esempio l'attivazione dei fattori di trascrizione della famiglia FOXO. Akt agisce quindi direttamente e indirettamente su diverse molecole coinvolte nel processo apoptotico, attivando proteine anti-apoptotiche e inibendo quelle pro-apoptotiche, favorendo quindi la sopravvivenza cellulare. Tale fenomeno è responsabile della ridotta sensibilità ai farmaci osservata *in vitro* e *in vivo*, che può essere però ripristinata dall'inibizione di IGF-1R e quindi di Akt.

La seconda via di segnalazione attivata da IGF-I coinvolge Ras, una proteina dotata di attività GTPasica che oscilla tra la forma attiva, legante GTP, e quella inattiva, legante GDP. Ras viene attivato dal complesso Grb2/SOS (*Ras guanine nucleotide*

*exchange factor*). L'attivazione di Grb2 avviene attraverso l'interazione con IRS-1 o Shc fosforilati. Una volta attivato, Ras recluta in membrana e attiva la serina/treonina chinasi Raf la quale scatena una cascata di attivazione di proteine tirosin-chinasiche appartenenti alla famiglia delle *Mitogen Activate Protein Kinase* (MAPK) tra cui MEK. Il bersaglio ultimo è la proteina *Extracellular signal-regulated kinase* (Erk1/2), attivata per fosforilazione in treonine e tirosine, che regola l'attività trascrizionale attraverso FOS e ELK1 inducendo la proliferazione cellulare. Tra i geni bersaglio di Erk1/2 si ha ad esempio la ciclina D1, fondamentale per la transizione G<sub>1</sub>-S del ciclo cellulare (Lavoie, L'Allemain et al., 1996).

La ciclina D1 rappresenta un esempio di integrazione tra le vie di segnalazione di PI3K e di MAPK. Oltre all'aumentata espressione indotta da Erk1/2, si ha un aumento della stabilità del suo mRNA attraverso un meccanismo dipendente da PI3K/Akt (Hamelers, van Schaik et al., 2002). L'espressione di ciclina D1 è ulteriormente regolata da PI3K/Akt attraverso la modulazione positiva di mTOR e negativa di GSK3. Col primo fenomeno viene incrementata la traduzione di ciclina D1, col secondo ne viene impedita la fosforilazione e quindi la degradazione (Hamelers, van Schaik et al., 2002; Diehl, Cheng et al., 1998; Muise-Helmericks, Grimes et al., 1998).

Le vie di segnalazione PI3K e MAPK presentano quindi mediatori e bersagli comuni. Oltre ai meccanismi sopra citati, in alcuni modelli cellulari esistono altri sistemi di integrazione. Si ha infatti che livelli elevati di IGF-I portano ad attivazione persistente di Akt che catalizza la fosforilazione di Raf-1 su residui di serina inibitori con conseguente inibizione della sua attività e dell'attivazione di Erk1/2 (Moelling, Schad et al., 2002).

In funzione del contesto cellulare, IGF-1R è inoltre in grado di attivare *stress activated protein kinases* (SAPK) e *Janus kinases* (JAK). Le SAPK, che includono p38 e *Jun N terminal kinase* (JNK), costituiscono una via di segnalazione associata alla regolazione della risposta al danno del DNA (Heron-Milhavet, Karas et al., 2001) e alla sopravvivenza cellulare (Krause, Lyons et al., 2001). JAK-1 e -2 sono coinvolte nella trasmissione del segnale mediata da citochine (Gual, Baron et al., 1998). La fosforilazione di JAK porta alla fosforilazione/attivazione delle proteine STAT (*signal transducers and activator of transcription*). In particolare, STAT3 sembra essere essenziale per l'attività trasformante di IGF-1R (Zong, Chan et al., 2000; Zong, Zeng et al., 1998).

Il controllo negativo della cascata di trasduzione del segnale è affidata sia a molecole che agiscono sui mediatori sia ad un'azione diretta contro il complesso attivato ligando-recettore. L'attività di PI3K/Akt è ad esempio negativamente regolata da PTEN, una fosfatasi che agisce defosforilando PIP3. Il complesso IGF-I/IGF-1R

subisce invece defosforilazione e endocitosi del recettore che porta a dissociazione del complesso e degradazione del ligando con conseguente attenuazione della risposta.

La defosforilazione di IGF-1R è operata da diverse fosfatasi tra cui *Src homology 2 domain tyrosine phosphatase* (SHP-2) e *protein tyrosine phosphatase 1B* (PTP-1B). SHP-2, grazie al reclutamento da parte di *Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1* (SHPS-1), si lega ad IGF-1R modulandone l'attività sia positivamente che negativamente (Maile & Clemmons, 2002). La defosforilazione di IGF-1R da parte di SHP-2 attenua il segnale intracellulare trasmesso da PI3K, fenomeno osservato anche nel caso di InsR (Myers, Mendez et al., 1998). In contrasto però, la trasduzione del segnale via MAPK sembra essere incrementata dalla fosforilazione di SHPS-1 e reclutamento di SHP-2 attraverso l'azione di Shc/Grb2 (Maile, Badley et al., 2003; Ling, Maile et al., 2005). PTP-1B è una tirosin fosfatasi di membrana, presente soprattutto nel reticolo endoplasmatico (Frangioni, Beahm et al., 1992), in grado di defosforilare IGF-1R (Buckley, Cheng et al., 2002) e IRS-1 (Goldstein, Bittner-Kowalczyk et al., 2000).

Nel processo di internalizzazione e ubiquitinazione di IGF-1R sono invece coinvolte due ligasi E3: Nedd4 e *mouse double minute 2* (MDM2) che agiscono in collaborazione con proteine accessorie rappresentate da Grb10, nel caso di Nedd4 (Vecchione, Marchese et al., 2003), e da  $\beta$ -arrestina, nel caso di MDM2 (Girnita, Shenoy et al., 2005).

### **Basi molecolari della specificità di IGF-1R vs InsR**

Nonostante InsR e IGF-1R agiscano sulle stesse vie di trasduzione del segnale, in particolare MAPK e PI3K, attraverso mediatori comuni, IRS e Shc ad esempio, piccole differenze esistono nelle *docking proteins* e nei mediatori intracellulari coinvolti.

Diversi studi sono stati condotti su cellule NIH-3T3 inducendo l'espressione forzata di livelli comparabili dei due recettori (approssimativamente  $10^6$  recettori/cellula). L'effetto sull'attività di MAPK, sulla stimolazione della fosforilazione di Shc e sulla sintesi di DNA è paragonabile tra i due recettori mentre IRS-1 sembra essere leggermente più sensibile all'insulina rispetto ad IGF-I (Mastick, Kato et al., 1994). Nel caso di fibroblasti Rat1 forzati ad esprimere livelli inferiori di recettore (circa  $1.3 \times 10^5$  recettori/cellula) si ha invece un maggiore effetto mitogenico di IGF-I associato ad un maggior effetto attivatorio su MAPK (Sasaoka, Ishiki et al., 1996). Il numero di molecole espresse sulla membrana plasmatica condiziona quindi il comportamento biologico di tali recettori.

Alcuni substrati sembrano interagire preferenzialmente con uno dei due recettori: IRS-2, Grb10 e la proteina di membrana pp120, coinvolta nella down-

regolazione del recettore, agiscono principalmente su InsR (Rother, Imai et al., 1998; Laviola, Giorgino et al., 1997; Soni, Lakkis et al., 2000) mentre IRS-1, Crk-II, una proteina *adaptor* della via di Ras, e 14-3-3 agiscono maggiormente attraverso IGF-1R (Rother, Imai et al., 1998; Beitner-Johnson & LeRoith, 1995; Furlanetto, Dei et al., 1995).

Entrambi i recettori attivano la via JAK/STAT. Nel caso di InsR si ha fosforilazione e attivazione di STAT5B mentre IGF-1R agisce, come evidenziato sopra, tramite JAK-1/2 e STAT3 (Emanuelli, Peraldi et al., 2000; Zong, Chan et al., 2000).

Queste differenze di mediatori portano ad effetti biologici diversi a partire dall'attivazione della stessa via di segnalazione cellulare. Ad esempio, l'attivazione di PI3K è fondamentale nella regolazione del metabolismo del glucosio in risposta all'insulina mentre regola l'apoptosi in risposta ad IGF-I.

## **IL SISTEMA IGF NEL CANCRO**

Il grande ruolo di IGF-1R nello sviluppo e nella progressione neoplastica, dalla trasformazione alla crescita tumorale fino all'insorgenza di metastasi, è dettato dalla grande varietà di processi biologici attivati dal legame di IGF-I al suo recettore e dalla sua espressione ubiquitaria. Ogni molecola che agisce a monte o a valle della formazione del complesso IGF-I/IGF-1R, ad esempio IGF-BPs e PI3K rispettivamente, può essere mutata e partecipare al processo di trasformazione neoplastica. Alterazioni a carico dei diversi componenti del sistema IGF sono state evidenziate in numerose neoplasie tra cui tumore al seno, tumore della prostata, melanoma, mieloma multiplo, mesotelioma, glioblastoma e neoplasie pediatriche, quali ad esempio il sarcoma di Ewing (Sachdev & Yee, 2007).

Diversi studi sono stati condotti *in vitro* e *in vivo* al fine di valutare il ruolo di tali molecole. I dati ottenuti indicano come l'azione di IGF-1R sia fortemente dipendente dal tessuto in cui viene espresso, che condiziona anche i mediatori coinvolti.

Le prime evidenze sperimentali riguardanti il ruolo di IGF-1R nel processo di trasformazione neoplastica risalgono a studi condotti su fibroblasti murini ottenuti da embrioni di topi *knock-out* per il gene codificante IGF-1R. I fibroblasti murini embrionali, tra cui le cellule 3T3, sono cellule con una spontanea tendenza alla trasformazione; l'assenza di IGF-1R rende però queste cellule resistenti alla trasformazione da parte di diversi oncogeni virali e cellulari quali SV40 T antigen (Sell, Rubini et al., 1993), l'oncogene virale v-src (Valentinis, Morrione et al., 1997), la proteina E5 del papilloma virus bovino (Morrione, De Angelis et al., 1995), la proteina E7 del papilloma virus umano (Steller, Zou et al., 1996), Ras attivato (Sell, Dumenil et al., 1994), il prodotto di fusione del sarcoma di Ewing EWS-FLI1 (Toretsky, Kalebic et al., 1997) nonché all'overespressione di recettori e molecole quali EGF-R (Coppola,

Ferber et al., 1994), InsR (Miura, Surmacz et al., 1995), PDGF-R $\beta$  (DeAngelis, Ferber et al., 1995) e IRS-1 (D'Ambrosio, Keller et al., 1995). Il ripristino dell'espressione di IGF-1R ristabilisce il processo di trasformazione spontanea dei fibroblasti murini. Si può quindi affermare che l'espressione di IGF-1R è condizione necessaria ma non sufficiente per il processo di trasformazione neoplastica, che richiede però l'innescò da parte di agenti chimici, virali o genetici (Baserga, 1999).

Contrariamente a quanto osservato per i recettori della famiglia EGF-R, l'overespressione di IGF-1R non è sufficiente ad attivare la cascata di trasduzione del segnale da esso dipendente: l'unica via di attivazione è il legame col suo ligando (Kaleko, Rutter et al., 1990). La presenza di IGF-I o IGF-II nel mezzo extracellulare è quindi un fattore limitante come dimostrato da studi condotti su cellule tumorali esprimenti IGF-1R, il cui comportamento biologico è dipendente dai livelli di IGF-I circolante (Wu, Yakar et al., 2002). In contrasto, alcuni sistemi tumorali possono avvalersi di una stimolazione autocrina/paracrina da parte di IGF-I che rende inefficace qualsiasi strategia terapeutica atta a limitare la quantità di ligando disponibile nel siero. Un'ipotesi recente prevede che durante le fasi iniziali della progressione tumorale, le cellule dipendano dall'ospite per il ligando mentre in fasi successive sviluppino un meccanismo autocrino di sostentamento, associabile ad una maggiore aggressività (Pollak, Schernhammer et al., 2004). Tale ipotesi è parzialmente confermata da studi condotti su ratti trattati per 1 anno con testosterone. La totalità degli animali ha sviluppato iperplasia prostatica e nella maggior parte dei casi è stato possibile osservare un'ulteriore progressione a displasia e a carcinoma *in situ*. L'analisi immunohistochimica delle relative ghiandole prostatiche ha evidenziato come la costante esposizione a ormoni sia in grado di stimolare la produzione di IGF-I da parte delle cellule stromali. Il fattore agisce quindi in maniera paracrina sulle cellule epiteliali adiacenti stimolandone la proliferazione. In parallelo con la progressione del fenotipo maligno e l'acquisizione di una maggiore aggressività, le cellule epiteliali sviluppano la capacità di produrre IGF-I diventando indipendenti dal microambiente cellulare circostante (Wang & Wong, 1998).

### **Regolazione e ruolo prognostico del sistema IGF nel cancro**

L'amplificazione genica è un meccanismo di regolazione dell'espressione fortemente sfruttato da proto-oncogeni durante il processo di trasformazione neoplastica. La duplicazione del gene IGF-1R è invece un fenomeno raro osservato solo nel melanoma (Zhang, Trent et al., 1993), nell'adenocarcinoma pancreatico (Armengol, Knuutila et al., 2000) e nei tumori della mammella, dove è però presente con una frequenza inferiore al 2% (Almeida, Muleris et al., 1994; Berns, Klijn et al., 1992).



Mutazioni attivatorie del recettore non sono invece state finora identificate (Hartog, Wesseling et al., 2007).

L'espressione di IGF-1R è invece finemente regolata da oncogeni e oncosoppressori. Diversi studi evidenziano infatti come fattori quali l'oncoproteina del virus dell'epatite B (HBx) reclutino e attivino la via di segnalazione di IGF-1R mentre la perdita di oncosoppressori quali p53, BRCA1 o WT1 risulti in una maggiore espressione di IGF-1R, in seguito a perdita del controllo trascrizionale (Werner, Shalita-Chesner et al., 2000). Il fattore di trascrizione nucleare p53, attivato in seguito a danno genotossico o stress, agisce infatti modulando negativamente non solo l'espressione di IGF-1R (Werner, Karnieli et al., 1996) ma anche di altri componenti del sistema IGF quali InsR (Webster, Resnik et al., 1996), IGF-II (Lee, Lee et al., 2000; Zhang, Kashanchi et al., 1996; Zhang, Zhan et al., 1998) e IRS-3 (Sciacchitano, Orecchio et al., 2002). p53 è inoltre in grado di regolare positivamente l'espressione di IGF-BP3 (Buckbinder, Talbott et al., 1995) riducendo quindi la biodisponibilità di IGF-I. Questa regolazione negativa del sistema IGF da parte di p53 è però spesso assente data l'elevata frequenza di mutazioni di p53 osservata in più del 50% dei tumori. La perdita della sua azione repressiva risulta quindi in una up-regolazione di diversi componenti del sistema IGF favorendo così la progressione neoplastica. L'integrazione tra le attività di p53 e IGF-1R si esplica inoltre attraverso MDM2, proteina coinvolta nel processo di ubiquitinazione di entrambe le molecole. L'attivazione di IGF-1R induce una modulazione positiva dell'espressione di MDM2, favorendo la degradazione di p53 (Heron-Milhavet & LeRoith, 2002).

Un'altra molecola coinvolta nella trasduzione del segnale che risulta essere spesso mutata nei tumori è la fosfatasi PTEN, coinvolta nella regolazione negativa della risposta ad IGF-I. Mutazioni a carico di PTEN portano ad una maggiore attività di PI3K, ad una maggiore espressione di IGF-1R e/o dei suoi ligandi e ad una minore espressione di IGF-BP3 in una serie di linee cellulari tumorali tra cui tumore gastrico, della prostata e del polmone (Zhang & Brodt 2003; Yi, Kim et al., 2005; Zhao, Dupont et al., 2004; Hwang, Kim et al., 2005).

Tra gli oncosoppressori spesso mutati in neoplasie e collegati al sistema IGF si ha un membro della famiglia dei recettori per IGF: IGF-2R. Tale recettore, specifico per IGF-II, non è dotato di un dominio catalitico e la sua azione principale sembra essere la modulazione della disponibilità di IGF-II al legame con IGF-1R e InsR. L'espressione forzata di IGF-2R *in vitro* è in grado di ridurre la capacità proliferativa di una linea cellulare tumorale prostatica (Schaffer, Lin et al., 2003) e di inibire la formazione di tumori da parte di cellule di tumore mammario murino *in vivo* (Li & Sahagian, 2004). Mutazioni, perdita di eterozigosi (LOI) o instabilità dei microsatelliti a carico del gene IGF-2R sono state riportate in diverse neoplasie tra cui carcinoma del colon-retto,

carcinoma epatico e tumore di Wilms (Souza, Wang et al., 1999; Wang, Souza et al., 1997; Yamada, De Souza et al., 1997; Xu, Grundy et al., 1997).

La biodisponibilità dei ligandi è quindi una caratteristica fondamentale nello sviluppo tumorale. Numerosi studi sono stati condotti al fine di determinare i livelli di IGF-I, IGF-II e IGF-BPs con lo scopo di valutare un fattore di rischio ma anche un valore prognostico per queste molecole. E' però necessario considerare che la variabilità endogena tra singoli individui è molto elevata e che le tecniche utilizzate possono inficiare notevolmente i risultati ottenuti. Inoltre, i livelli di IGF-I sono fortemente condizionati dai livelli ormonali e dalla nutrizione. La cachessia, associabile a situazioni patologiche, riduce notevolmente i livelli misurati che risultano quindi essere condizionati dallo stato di salute del soggetto analizzato (Pollak, Schernhammer et al., 2004).

Alcuni geni coinvolti nell'attività del sistema IGF, in grado di modulare la disponibilità di IGF-I, presentano variazioni polimorfiche che in alcuni studi (Le Marchand et al., 2002; Wang, Habuchi et al., 2003), ma non in tutti (Schernhammer, Hankinson et al., 2003), sembrano essere associate ad un maggiore rischio di sviluppare tumore o ad una peggiore prognosi. Studi epidemiologici recenti hanno invece valutato la correlazione tra livelli sierici di IGF-I, IGF-II e/o IGF-BPs e insorgenza di tumore; alti livelli di IGFs o bassi livelli di IGF-BPs sono associati ad un maggiore rischio di sviluppare carcinoma al seno premenopausa, carcinoma della prostata, tumore al polmone, carcinoma del colon-retto, tumore dell'endometrio e della vescica, evidenziando un ruolo paracrino per IGF. E' stata inoltre evidenziata una correlazione prognostica tra i livelli di IGFs e la progressione tumorale in diverse neoplasie tra cui il carcinoma del colon-retto, del fegato e del pancreas, fenomeno non osservato nel caso del tumore al seno. Risultati controversi sono invece stati ottenuti nel caso di glioma (Samani, Yakar et al., 2007). Recentemente la perdita di eterozigosi del gene codificante IGF-II, fenomeno diffuso nella mucosa di pazienti affetti dal carcinoma del colon-retto, è stata associata ad un maggiore rischio di sviluppare il carcinoma. La stessa alterazione genetica è stata inoltre osservata nei linfociti degli stessi pazienti (Cui, Cruz-Correa et al., 2003).

Nonostante sia universalmente riconosciuto l'azione svolta da IGF-1R nel processo di trasformazione neoplastica, il suo ruolo prognostico è tuttora controverso. In particolare, diversi studi sono stati condotti con lo scopo di valutare l'espressione di IGF-1R in biopsie di pazienti affetti da carcinoma della mammella. Lo studio più ampio condotto su 210 tumori primitivi (Shimizu, Hasegawa et al., 2004) ha mostrato una overespressione di IGF-1R nel 43.8% dei campioni senza però trovare correlazioni con prognosi, dimensione del tumore, grado istologico, stato dei recettore ormonali e stato di EGF2. In contrapposizione, studi minori hanno evidenziato una correlazione tra

espressione di IGF-1R, prognosi e espressione del recettore per estrogeni (Peyrat, Bonnetterre et al., 1988; Railo, von Smitten et al., 1994; Ueda, Tsuda et al., 2006).

Risultati analogamente controversi sono stati ottenuti da analisi di carcinoma prostatico. Tre studi si contrappongono evidenziando assenza di correlazione (Figuerola, De Raad et al., 2001), correlazione positiva (Hellawell, Turner et al., 2002) e correlazione negativa (Tennant, Thrasher et al., 1996) tra l'espressione di IGF-1R e lo stadio tumorale.

Oltre a IGF-1R e IGF-2R, il sistema IGF comprende anche InsR. Questo recettore è da sempre considerato un recettore coinvolto principalmente nei processi metabolici del glucosio. Studi recenti ne evidenziamo però un ruolo potenziale nella tumorigenesi. Elevati livelli d'espressione di InsR-A sono stati infatti osservati in diverse neoplasie tra cui miosarcoma, carcinoma del colon, del seno, del polmone, dell'ovaio e della tiroide (Belfiore, 2007). L'espressione di InsR, in quest'ultimo tumore, risulta essere inversamente proporzionale al grado di differenziamento suggerendo un ruolo di InsR nella progressione tumorale (Vella, Pandini et al., 2002). Conclusione analoga può essere tratta dall'analisi della sopravvivenza di pazienti affetti da carcinoma al seno: l'espressione di elevati livelli di InsR rispetto a livelli moderati o bassi riduce significativamente il disease free survival (DFS), attribuendo a InsR il ruolo di fattore prognostico nel tumore della mammella (Mathieu, Clark et al., 1997).

Contrariamente a quanto osservato nel caso di IGF-1R, l'espressione di InsR in fibroblasti murini non è in grado di favorire il processo di trasformazione spontanea (Rubini, Hongo et al., 1997). InsR agisce quindi attraverso la sua cascata di trasduzione del segnale attivata dal legame di insulina ma soprattutto di IGF-II, conferendo un vantaggio proliferativo alle cellule tumorali che lo esprimono. Studi condotti su linee cellulari derivate da carcinoma al seno hanno evidenziato come l'InsR espresso dalle cellule tumorali sia più sensibile all'azione dell'insulina rispetto alla controparte normale nonostante un'affinità di legame InsR/Insulina comparabile tra i 2 modelli (Frittitta, Vigneri et al., 1993). L'attivazione di InsR da parte di insulina o IGF-II svolge inoltre un'azione mitogenica (Milazzo, Giorgino et al., 1992) e pro-migratoria in diversi modelli (Benoliel, Kahn-Perles et al., 1997; Sciacca, Mineo et al., 2002). L'azione tumorigenica di InsR è possibile inoltre grazie alla formazione di ibridi HR-A, la cui espressione è stata osservata in una serie di casi clinici di carcinoma al seno. L'espressione di HR-A risulta essere superiore a quella di IGF-1R in circa il 75% dei casi analizzati evidenziando il ruolo di HybridR nella tumorigenesi (Pandini, Vigneri et al., 1999). Tali recettori agiscono incrementando la cascata di trasduzione del segnale di IGF-I e IGF-II, conferendo quindi un vantaggio proliferativo.

Altri meccanismi di alterazione del sistema IGF sono stati identificati in diverse neoplasie. L'attivazione costitutiva di IRS-1 è stata osservata in tumore al seno, tumore

di Wilms, leiomioma, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma, carcinoma adrenocorticale (Chang, Li et al., 2002). Recentemente, mutazioni attivatorie puntiformi della subunità catalitica di PI3K, p110 $\alpha$ , sono state osservate in glioma, tumore al colon, alle ovaie, al fegato, al polmone, allo stomaco e al seno. Il gene codificante p110 $\alpha$  risulta inoltre essere amplificato in tumori di collo e testa, tumori cervicali, gastrici e dei polmoni (Bader, Kang et al., 2005; Engelman, Luo et al., 2006)

## **IGF-1R COME POSSIBILE BERSAGLIO TERAPEUTICO**

Visto il ruolo fondamentale svolto da IGF-1R nel processo di trasformazione neoplastica, l'inibizione della sua cascata di trasduzione del segnale rappresenta un buon approccio terapeutico per lo sviluppo di terapie bersaglio specifiche da utilizzare in combinazione ai normali chemioterapici. Diverse tecniche sono state utilizzate nel corso degli anni al fine di inibire IGF-1R e/o la sua via di segnalazione.

L'azione di IGF-1R richiede la formazione di un complesso col suo ligando. La biodisponibilità di tali fattori di crescita risulta quindi essere un fattore limitante l'azione di IGF-1R, come precedentemente illustrato. In passato è stata quindi valutata la possibilità di inibire IGF-I/IGF-II attraverso IGF-BPs o anticorpi neutralizzanti. Questi approcci presentano però una valenza clinica limitata dalla continua produzione fisiologica di tali fattori ma soprattutto dallo sviluppo di meccanismi autocrini da parte delle cellule tumorali che riescono quindi a sfuggire o compensare a tale inibizione.

Gli approcci più promettenti risultano quindi essere quelli diretti a inibire IGF-1R e la sua cascata di trasduzione del segnale. Visto il ruolo emergente di InsR e HR-A nel processo di tumorigenesi, nuovi studi e considerazioni sono comunque necessari.

### **Blocco del recettore attraverso anticorpi monoclonali**

Uno dei primi approcci biologici utilizzati per bloccare il circuito mediato da IGF-1R utilizzava anticorpi monoclonali diretti contro la porzione extracellulare del recettore.

Diversi anticorpi in grado di riconoscere e inibire IGF-1R sono stati sviluppati nel corso degli anni. Tra i primi e più caratterizzati si ha  $\alpha$ IR-3 (si lega alla subunità  $\alpha$  del recettore inibendone l'attivazione) che inibisce la crescita *in vitro* e *in vivo* di numerose linee cellulari di tumore al seno, tumore ai polmoni, rabdomiosarcoma e sarcoma di Ewing (Arteaga, Kitten et al., 1989; Zia, Jacobs et al., 1996; Kalebic, Tsokos et al.; Scotlandi K, Benini et al., 1998).

In cellule che overesprimono IGF-1R,  $\alpha$ IR-3 può agire come agonista. Effetti simili sono stati ottenuti su cellule di tumore al seno MCF-7 trattate con un anticorpo a

singola catena umanizzato (scFv-Fc) che conserva comunque la capacità di down-modulare il recettore e inibire la formazione di xenografts *in vivo* (Sachdev, Li et al., 2003). Molti di questi anticorpi, nonostante IGF-1R specifici, portano contemporaneamente ad una down-regolazione delle molecole di InsR inserite in HybridR o poste in prossimità di IGF-1R nei *lipid rafts* (Sachdev, Singh et al., 2006). La capacità di down-regolare il recettore, requisito fondamentale per avere un anticorpo efficace, è stata osservata anche negli anticorpi umanizzati CP-751-571 (Cohen, Baker et al., 2005), h7C10 (Goetsch, Gonzalez et al., 2005) e A12 (Burtrum, Zhu et al., 2003; Wu, Odman et al., 2005). Questi anticorpi hanno dimostrato una buona efficacia *in vivo* su cellule di tumore al seno, al colon-retto, al pancreas e al polmone e alcuni di essi sono attualmente inseriti in *clinical trials* in fase I nella terapia di mieloma multiplo (CP-751-571) e tumori solidi (A12 e h7C10).

### **Inibizione della trasduzione del segnale mediante piccoli inibitori**

I piccoli inibitori sono molecole che agiscono inibendo l'attività tirosin-chinasica di un recettore, legandosi al sito di legame per l'ATP o al sito di legame per i substrati, o impedendo il legame del substrato al recettore attivato.

L'identificazione di molecole adatte ad inibire IGF-1R è resa più complicata dall'elevata omologia tra IGF-1R e InsR nel dominio TK (84%) e soprattutto nel sito di legame per ATP (100%). La recente identificazione di InsR e HR-A tra i recettori coinvolti nel processo di tumorigenesi potrebbe quindi semplificare tali problematiche, tenendo comunque sempre presente le possibili alterazioni del metabolismo del glucosio in seguito a tali trattamenti. Tra i piccoli inibitori in grado di inibire IGF-1R si distinguono principalmente due categorie: antagonisti dell'ATP (ad esempio tirfostine e derivati delle pirrolo pirimidine) e non antagonisti (ciclolignani).

Tra i primi si hanno le tirfostine, molecole sintetiche dotate di una scarsa specificità per IGF-1R (Parrizas, Gazit et al., 1997). Vista la scarsa stabilità delle tirfostine sono stati creati dei catecoli bioisosteri di tali molecole. I catecoli agiscono come competitori del substrato e si sono dimostrati in grado di inibire la cascata di trasduzione del segnale di IGF-1R e la proliferazione *in vitro* di cellule di tumore al seno e alla prostata (Blum, Gazit et al., 2003; Youngren, Gable et al., 2005). Tali molecole presentano però cross-reattività con InsR (Blum, Gazit et al., 2000).

Un'altra classe di antagonisti dell'ATP è rappresentata dai derivati delle pirrolo pirimidine. Tra questi, due inibitori promettenti sono stati sviluppati recentemente dalla Novartis Pharma: NVP-ADW742 (Mitsiades, Mitsiades et al., 2004) e NVP-AEW541 (Garcia-Echeverria, Pearson et al., 2004), oggetto di questo studio.

Tali molecole presentano un elevato grado di specificità per IGF-1R: in saggi cellulari di autofosforilazione mostrano una selettività 10-50 volte superiore per IGF-1R

rispetto a InsR in contrapposizione ai risultati ottenuti mediante l'uso di saggi biochimici che hanno evidenziato un effetto comparabile su IGF-1R e su InsR ( $IC_{50} > 200$  nM) (Mitsiades, Mitsiades et al., 2004; Garcia-Echeverria, Pearson et al., 2004; Sachdev & Yee, 2007). Considerando l'effetto inibitorio mostrato da queste molecole su fibrosarcoma e mieloma, l'eventuale aspecificità di azione non sembra interferire con l'azione anti tumorale del farmaco ma potrebbe al contrario potenziarla.

Tra gli inibitori di IGF-1R che non competono con ATP si hanno i ciclolignani, in particolare la picropodofilina (PPP). PPP inibisce selettivamente la fosforilazione della Tyr1136 di IGF-1R in cellule di melanoma, inibendone inoltre la capacità proliferativa *in vivo* (Girnita, Girnita et al., 2004). Questo farmaco induce inoltre la regressione tumorale e inibisce la formazione di metastasi in diversi modelli tumorali, senza però indurre un'elevata farmaco resistenza dopo trattamento prolungato (Girnita, All-Ericsson et al., 2006; Stromberg, Ekman et al., 2006; Vasilcanu, Weng et al., 2006).

### **Riduzione della funzione mediante l'utilizzo di dominanti negativi**

L'azione di IGF-1R può essere inibita attraverso l'uso di dominanti negativi, proteine che agiscono interferendo con il recettore wild-type legandosi direttamente ad esso o competendo per il legame ai suoi mediatori del segnale. I dominanti negativi sono efficaci quando introdotti in cellule in coltura, presentando quindi il problema di veicolazione associato a tutti gli approcci inibitori che richiedono plasmidi.

Il primo dominante negativo per IGF-1R è stato una proteina solubile e secreta originata dall'introduzione di un codone di stop al residuo aminoacidico 486 (486/Stop). Questo mutante, costituito solo da parte della subunità  $\alpha$ , contiene un dominio di legame per IGF-I/IGF-II funzionale, competendo quindi con il recettore wild-type per il legame al ligando (D'Ambrosio, Ferber et al., 1996). Questa proteina inibisce la migrazione e il processo metastatico in diversi modelli sperimentali tumorali quali tumore al seno, al polmone, al colon e al pancreas (Dunn, Ehrlich et al., 1998; Reiss, D'Ambrosio et al., 1998; Lee, Park et al., 2003; Min, Adachi et al., 2005). Oltre ad una modulazione della biodisponibilità dei ligandi, la proteina mutante 486/Stop è stata osservata anche nel citoplasma delle cellule che la producono dove inibisce la sintesi endogena di IGF-1R (Reiss, Tu et al., 2001).

L'utilizzo di un recettore troncato all'aminoacido 950, dotato di dominio transmembrana ma privo di attività catalitica, in grado di formare eterodimeri con il recettore wild type, ha evidenziato una ridotta capacità tumorigenica ed invasiva oltre ad un incremento della chemosensibilità in una serie di modelli tumorali. (Lee, Park et al., 2003; Scotlandi, Avnet et al., 2002)

## **Inibizione dell'espressione mediante RNA antisenso**

Gli RNA antisenso (ASO) sono molecole di 18-20 nt che, legandosi in maniera sequenza specifica ad un mRNA, inibiscono la produzione di proteine bloccando direttamente la traduzione o attivando RNasi come l'RNasi H che digeriscono il filamento di mRNA in seguito alla formazione di un duplex ASO:mRNA (Crooke, 1999).

Numerosi studi, condotti utilizzando RNA antisenso diretti contro IGF-1R, hanno evidenziato inibizione della sopravvivenza *in vitro* e della tumorigenicità *in vivo* in una serie di neoplasie quali melanoma, glioblastoma, neuroblastoma, tumore al seno, alla prostata, al polmone, alla cervice e nei sarcomi. Oltre a bloccare la crescita tumorale, il trattamento con ASO è in grado inoltre di ridurre la capacità metastatica e incrementare la sensibilità ad agenti citotossici, sia in tumori chemosensibili, come i sarcomi e il tumore della vescica, ma anche in tumori chemoresistenti come il tumore della prostata (Salisbury & Macaulay 2003).

Gli ottimi risultati ottenuti *in vitro* con ASO diretti contro IGF-1R hanno portato ad uno studio clinico pilota in cui cellule di astrocitoma maligno, rimosse chirurgicamente, sono state trattate *ex vivo* con ASO e successivamente reimpiantate nel paziente. Più del 60% dei pazienti trattati ha mostrato miglioramento clinico evidenziando la reale valenza clinica di approcci terapeutici diretti contro IGF-1R (Andrews, Resnicoff et al., 2001).

## **Inibizione dell'espressione mediante RNA interference**

Lo sviluppo della tecnologia *RNA interference* per il silenziamento genico di sequenze bersaglio specifiche in cellule di mammifero risale alla fine degli anni '90 (Elbashir, Harborth et al., 2001).

I siRNA sono duplex dsRNA di 21-23 nucleotidi con estremità 3' simmetriche (2-3-nt), gruppi fosfato al 5' e gruppi idrossili al 3'. I siRNA, necessariamente dotati di gruppo fosfato al 5', vengono incorporati in un complesso multi proteico detto RISC (*RNA-inducing silencing complex*). Il duplex viene sciolto e il filamento antisenso guida il complesso RISC sul mRNA bersaglio che viene quindi tagliato (Dykxhoorn, Novina et al., 2003).

Nella formazione del complesso siRNA:mRNA un ruolo importante è rivestito dall'accessibilità della sequenza bersaglio. Studi condotti con diverse sequenze siRNA dirette contro regioni intersperse del mRNA di IGF-1R, non in grado di riconoscere l'mRNA di InsR, hanno evidenziato come l'efficienza di silenziamento sia direttamente proporzionale all'accessibilità del target e come un buon appaiamento permetta una forte inibizione dell'espressione di IGF-1R e quindi della sua via di segnalazione riducendo la sopravvivenza di linee cellulari tumorali murine e umane (Bohula,

Salisbury et al., 2003; Rochester, Riedemann et al., 2005; Yeh, Bohula et al., 2006; Dong, Kong et al., 2006).

Uno studio recente, condotto su cellule di carcinoma della mammella, ha evidenziato come il silenziamento di IGF-1R mediante siRNA non alteri l'espressione di InsR ma sia capace di modulare funzioni ad esso associate. Il calo di IGF-1R diminuisce la formazione di HybridR, altamente espressi nel tumore al seno (Pandini, Vigneri et al., 1999) spostando l'equilibrio verso la formazione di omodimeri InsR favorendo quindi il legame di insulina. La via di segnalazione di InsR risulta quindi maggiormente attivata inducendo un incremento dell'up-take di glucosio (Zhang, Pelzer et al., 2007).

L'applicazione *in vivo* di molecole siRNA resta però fortemente limitata dalla stabilità e dalla veicolazione delle stesse. Analogamente a quanto osservato nel caso di ASO, modificazioni a carico dello scheletro di DNA o degli anelli glucidici, coniugazione con colesterolo o incorporazione all'interno di nano particelle potrebbero ridurre la degradazione del siRNA. I primi studi condotti *in vivo*, utilizzando siRNA diretti contro sequenze bersaglio diverse da IGF-1R, hanno mostrato una down regolazione dell'espressione del gene bersaglio associata ad una minore attività tumorale sia in seguito a somministrazione di siRNA naked (Filleru, Courtin et al., 2003; Duxbury, Ito et al., 2004) che siRNA modificati (Zimmermann, Lee et al., 2006)



# IL SARCOMA DI EWING

## CARATTERISTICHE GENERALI

Il sarcoma di Ewing (SE) è un tumore primitivo dell'osso inserito all'interno di una famiglia di tumori detti *Ewing's sarcoma family tumors* (ESFT) che comprende, oltre al SE classico e a quello atipico, anche il tumore neuroectodermico primitivo periferico dell'osso (PNET) e il tumore di Askin, a carico della parete toracica. L'iniziale caratterizzazione del SE risale al 1921 quando, per la prima volta, il Dottor James Ewing lo classificò come "un diffuso endotelioma dell'osso di origine vascolare", caratterizzato da piccole cellule rotonde (Ewing, 1921).

I numerosi progressi fatti nella definizione e caratterizzazione del tumore non hanno però ancora portato al riconoscimento universale della sua istogenesi. Ad oggi, due sono le ipotesi più accreditate su cui si dibatte: un'origine da cellule della cresta neurale contro un'origine mesenchimale.

La prima ipotesi è accreditata dall'espressione sulle cellule di sarcoma di Ewing di marcatori del differenziamento neurale, come *neural cell-adhesion molecule* (NCAM), *neuron-specific enolase* (NSE), Leu-7, proteina S-100 e proteine dei neurofilamenti (NFP). È stato inoltre dimostrato che le cellule di SE possono differenziare in senso neurale *in vitro* in seguito a trattamento con agenti differenzianti (Cavazzana, Miser et al., 1987; Noguera, Navarro et al., 1994). Si ha inoltre che l'espressione forzata di EWS-FLI1 in una linea cellulare di rhabdomyosarcoma è in grado di indurre l'espressione di numerosi geni coinvolti nello sviluppo e nel differenziamento neurale facendo inoltre assumere a tali cellule una morfologia simile a quella delle cellule di sarcoma di Ewing (Hu-Lieskovan, Zhang et al., 2005).

L'ipotesi mesenchimale è invece altamente accreditata da alcuni studi recenti che analizzano l'effetto della overespressione o del silenziamento di EWS-FLI1 in diversi modelli cellulari. Nel primo caso, Riggi e colleghi hanno indotto l'espressione di EWS-FLI1 in cellule embrionali staminali, fibroblasti embrionali spontaneamente immortalizzati e progenitori mesenchimali del midollo osseo (MPC) osservando come solo quest'ultimo modello cellulare è in grado di conservare l'espressione di EWS-FLI1 anche dopo 14 giorni dalla trasfezione. Il prodotto di fusione aberrante induce precocemente anche l'espressione di molecole quali IGF-I, IGF-BP3 e IGF-BP5, il cui ruolo nella tumorigenesi del SE è stato evidenziato da numerosi studi. In topi inoculati con cellule MPC esprimenti EWS-FLI1 si ha inoltre la formazione di tumori *Ewing-like*, esprimenti CD99 e NSE, tipici marcatori del SE. Le cellule di tali tumori, rimosse chirurgicamente, muoiono in risposta a trattamento con NVP-AEW541, un inibitore tirosin chinasi specifico per IGF-1R confermando nuovamente l'analogia di tale modello sperimentale con linee cellulari di SE (Riggi, Cironi et al., 2005). Tirode e

colleghi hanno invece evidenziato come il silenziamento di EWS-FLI1 riconduca le cellule di sarcoma di Ewing ad un profilo d'espressione genica sovrapponibile a quello di progenitori mesenchimali umani (Tirode, Laud-Duval et al., 2007).

Altri marcatori espressi dalle cellule di SE sono i marcatori epiteliali, desmopachina e citocheratina, e i mesenchimali, tra cui la vimentina (van Valen, 1999).

## **MARCATORI BIOLOGICI E MOLECOLARI**

Il sarcoma di Ewing è caratterizzato da piccole cellule rotonde dotate di aggressività elevata, caratterizzate da crescita omogenea, scarse mitosi e da un rapporto nucleo/citosol elevato.

Gli studi condotti negli ultimi anni hanno portato all'identificazione di alcuni marcatori molecolari importanti nel SE tra cui l'espressione della molecola di membrana CD99 e la presenza di una proteina chimerica aberrante derivante da una traslocazione cromosomica.

La molecola CD99 (nota anche come p30/32MIC2) è una glicoproteina di membrana, espressa nel 98% dei casi, coinvolta nei fenomeni di adesione. La presenza di tale marcatore molecolare è una caratteristica tipica della famiglia di tumori a cui appartiene il sarcoma di Ewing. L'espressione di CD99 è infatti assente in altri tumori a piccole cellule rotonde, quali ad esempio carcinoma a piccole cellule del polmone, retinoblastoma, neuroblastoma metastatico, osteosarcoma a piccole cellule e linfoma maligno.

L'altro principale marcatore molecolare del sarcoma di Ewing è dato dalla costante presenza di una traslocazione cromosomica che porta alla formazione di una proteina chimerica, EWS-Ets, ottenuta dalla fusione della porzione N-terminale della proteina EWS con la porzione C-terminale di un fattore di trascrizione della famiglia Ets. Numerosi riarrangiamenti tra queste famiglie di geni sono stati osservati ma la traslocazione più frequente è la t(11;22)(q24;q12), presente nel 85% dei casi, che porta alla formazione del prodotto chimerico EWS-FLI1. La seconda traslocazione in ordine di frequenza (10%) porta alla formazione della proteina chimerica EWS-ERG. Ognuno di questi prodotti di fusione è caratterizzato da diverse isoforme, 12 per EWS-FLI1 e 5 per EWS-ERG. In entrambi i casi, la forma più frequente è quella che porta alla fusione tra l'esone 7 di EWS e l'esone 6 di FLI1 o ERG; questa traslocazione è detta *type I* e nel caso di EWS-FLI1 rappresenta circa il 60% dei casi.

In tabella 1 sono riassunti gli altri riarrangiamenti cromosomici osservati.

**Tabella I**

<b>TRASLOCAZIONE</b>	<b>PRODOTTO DI FUSIONE</b>	<b>FREQUENZA (%)</b>
t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1	85
t(21;22)(q22;q12)	EWS-ERG	10
t(7;22)(p22;q12)	EWS-ETV1	<1
t(17;22)(q21;q12)	EWS-ETV4	<1
t(2;22)(q33;q12)	EWS-FEV	<1

Il ruolo di EWS-FLI1 nella tumorigenesi è evidenziato da studi condotti su fibroblasti murini NIH-3T3 in cui l'espressione della proteina chimerica EWS-FLI1, ma non di FLI1 (May, Lessnick et al., 1993), favorisce la crescita in condizioni di indipendenza d'ancoraggio e accelera il processo tumorigenico in topi immunocompromessi portando alla formazione di un fenotipo tumorale simile al sarcoma di Ewing. Tale fenomeno di trasformazione richiede però l'espressione sulla membrana cellulare di IGF-1R (Toretsky, Kalebic et al., 1997). Studi recenti hanno poi evidenziato come la sola espressione della proteina chimerica EWS-FLI1 non sia sufficiente ad innescare il processo di trasformazione neoplastica che richiede invece un contesto cellulare adatto. L'espressione forzata di EWS-FLI1 in cellule Rat-1 (May, Gishizky et al., 1993), in fibroblasti embrionali murini (Deneen & Denny, 2001) e in fibroblasti primari umani (Lessnick, Dacwag et al., 2002) non solo non innesca il processo di trasformazione ma al contrario blocca la proliferazione e induce l'apoptosi.

L'azione tumorigenica del prodotto di fusione EWS-FLI1 sembra essere connessa alla deregolazione dell'espressione di geni controllati da FLI1 o normalmente non responsivi ad esso. Tra i geni regolati da EWS-FLI1 si hanno numerosi geni coinvolti nella regolazione della proliferazione e tumorigenicità, tra gli up-regolati si hanno ad esempio E2-C, coinvolto nel controllo di una ciclina, la ciclina D1, IGF-I e MYC, un fattore trascrizionale coinvolto in proliferazione e apoptosi, mentre tra i down-regolati si hanno ad esempio p21, p57<sup>kip</sup> e IGF-BP3 (Riggi & Stamenkovic 2007).

## **ASPETTI CLINICO-PATOLOGICI**

Il sarcoma di Ewing rappresenta il secondo tumore dell'osso più frequente, dopo l'osteosarcoma, in bambini e giovani adulti con un picco d'incidenza a 15 anni (Riggi & Stamenkovic, 2007). L'80% dei pazienti è infatti rappresentato da adolescenti con età inferiore a 20 anni ma ciò non esclude lo svilupparsi del tumore anche in pazienti in età adulta. Costituisce un tumore molto aggressivo ma fortunatamente piuttosto raro con

una frequenza d'incidenza, nell'emisfero occidentale, pari a circa 1-3 per milione per anno con una lieve maggiore incidenza nei maschi (rapporto 1,5:1).

L'insorgenza del tumore avviene preferenzialmente a carico di bacino, regioni diafisarie di ossa lunghe e ossa del torace (clavicola, vertebre, coste, etc). Gli altri tumori della famiglia ESFT insorgono spesso in regioni extraossee quali parti molli di regioni paravertebrali e toraciche nonché tessuti adiacenti alle coste quali rene, vescica, polmone, prostata e meningi (Ushigome, Machinami et al., 2003).

Alla diagnosi, il paziente presenta spesso dolore e tumefazione del segmento osseo interessato, nonché febbre e alterati livelli di fattori ematici. Il tumore si presenta come una massa grigia soffice, con quantità variabile di necrosi, emorragie e formazioni cistiche.

Nel 10% dei casi si osservano lesioni multiple dell'osso alla diagnosi, difficilmente distinguibili da metastasi, che invece si presentano nel 25-30% dei casi e che rappresentano il principale fattore prognostico negativo del sarcoma di Ewing; le metastasi insorgono prevalentemente al midollo osseo, all'osso o al polmone, in ordine di decorso negativo (Weber KL, 2002). Inoltre, un fenomeno frequente è l'insorgenza di neoplasie secondarie, a carico di varie parti dello scheletro, soprattutto vertebre e cranio.

La diagnosi del sarcoma di Ewing sfrutta attualmente tecniche molecolari atte a valutare la presenza delle specifiche alterazioni citogenetiche che caratterizzano tale patologia. La presenza di tali riarrangiamenti viene direttamente rilevata attraverso ibridazione con sonde fluorescenti su cellule in interfase fissate (*Fluorescence in situ hybridization*, FISH) (Giovannini, Selleri et al., 1992). Altre tecniche che permettono la rilevazione dei prodotti chimerici, con una migliore distinzione tra le possibili isoforme sono la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) o la *Retro-Transcriptase PCR* (RT-PCR) che rilevano l'mRNA specifico per EWS-Ets (Giovannini, Biegel et al., 1994; Scotlandi, Serra et al., 1996).

## TERAPIA E PROGNOSI

Il trattamento locale del tumore, mediante combinazione di radioterapia e chirurgia, costituiva la terapia normalmente applicata a pazienti affetti da sarcoma di Ewing fino agli anni '70. Con questo approccio terapeutico, solo il 10% dei pazienti risultava libero da malattia a 5 anni dalla diagnosi (5-year event-free survival, EFS). L'aggiunta, negli anni '80, di un approccio sistemico costituito dall'utilizzo di miscele di chemioterapici, quali Doxorubicina (AD), Vincristina (VC), Cyclophosphamide (CP) e Actinomycina D (AC), ha permesso di incrementare progressivamente le aspettative di vita dei pazienti colpiti da SE. Fattori attualmente determinanti nella scelta dell'approccio terapeutico sono localizzazione del tumore e età del paziente; qualora possibile si tende sempre a preferire un intervento di resezione chirurgica associato a

trattamento pre- e post-operatorio con chemioterapici. La chemioterapia pre-operatoria serve a ridurre le dimensioni del tumore e la possibilità di disseminazione della neoplasia ad altre sedi. I farmaci attualmente in uso, oltre a quelli precedentemente citati, sono Ifosfamide (IF) ed Etoposide (ET). La somministrazione di radiazioni è oggi limitata a pazienti i cui margini chirurgici non risultino adeguati o in cui la localizzazione del tumore non permetta l'intervento di resezione, ad esempio il bacino. I dosaggi di radiazione utilizzati sono compresi tra 45Gy e 60Gy.

Nonostante questi miglioramenti, la prognosi per pazienti colpiti da sarcoma di Ewing resta infausta, soprattutto nel caso di metastasi alla diagnosi. L'associazione di chirurgia e/o radiazioni con chemioterapici ha permesso di raggiungere, nel caso di pazienti privi di metastasi alla diagnosi, un EFS a 3 anni del 66%, a 5 anni del 60% e a 10 anni del 55% (Bacci, Ferrari et al., 2000). Questa ridotta sopravvivenza è dovuta non solo a ricadute della malattia e formazione di metastasi, ma anche all'insorgenza di patologie derivate da tossicità dei chemioterapici (Kushner & Meyers, 2001) o da alte dosi di radiazioni (Kuttesch, Wexler et al., 1996; Goldwein, 1991).

Risulta quindi fondamentale identificare bersagli terapeutici specifici del sarcoma di Ewing su cui agire in maniera mirata al fine di ridurre la crescita e la disseminazione del tumore. E' necessaria inoltre la definizione di fattori prognostici che permettano di stratificare i pazienti in modo da avere terapie soggetto-specifiche, al fine di ridurre effetti collaterali derivati da trattamenti inadeguati.

## **RUOLO DEL SISTEMA IGF NEL SARCOMA DI EWING**

L'importanza del sistema IGF nel sarcoma di Ewing può essere evidenziata considerando il ruolo fondamentale svolto da tale sistema nel metabolismo osseo. La presenza di IGF-I è infatti di grande importanza per la crescita di diverse componenti del tessuto muscolo scheletrico quali fibroblasti, cellule stromali del midollo osseo e osteoblasti, svolgendo un ruolo importante nel rimodellamento dell'osso e nel suo metabolismo (Baserga & Rubin, 1993). IGF-I è inoltre un importante fattore di sopravvivenza per neuroni, oligodendrociti e per i relativi precursori (Barres, Hart et al., 1992).

Inoltre, il sarcoma di Ewing si sviluppa preferenzialmente in età adolescenziale durante la quale i livelli di espressione di IGF-I da parte del fegato risultano particolarmente elevati, in seguito a stimolo dato dall'ormone della crescita, per mediare gli effetti di GH sulla crescita dello scheletro (Kappel, Vele-Yanguas et al., 1994).

Il ruolo del sistema IGF in questa neoplasia è evidenziato anche da numerosi studi *in vitro*. Primo tra tutti lo studio condotto da Toretzky et al. su fibroblasti murini ha evidenziato come sia necessaria la co-espressione di IGF-1R per avere un effetto tumorigenico da parte di EWS-FLI1. Inoltre, il grado di fosforilazione di IRS-1, principale mediatore della cascata di trasduzione del segnale di IGF-1R, risulta essere più elevato quando sia il recettore che il prodotto di fusione sono espressi, rispetto a quando è presente solo IGF-1R (Toretzky, Kalebic et al., 1997).

Studi *in vitro* utilizzando progenitori mesenchimali esprimenti il fattore di trascrizione aberrante hanno evidenziato come EWS-FLI1 non moduli l'espressione di IGF-1R ma sia in grado di modulare l'espressione di altre molecole del sistema IGF, up-regolando l'espressione del ligando IGF-I nonché down-modulando alcune proteine leganti IGF quali IGF-BP3, IGF-BP5 e IGF-BP7 (Prieur, A., Tirode et al., 2004; Tirode, Laud-Duval et al., 2007). Questo permette una maggiore biodisponibilità del ligando con conseguente maggior stimolazione del circuito.

L'analisi dell'espressione di IGF-I e IGF-1R in una serie di campioni tissutali di sarcoma di Ewing e di linee cellulari da esso derivate ha evidenziato l'espressione di tale circuito autocrino in tutti i campioni analizzati (Scotlandi, Benini et al., 1996). L'espressione di IGF-1R in casi clinici presenta inoltre una correlazione positiva, statisticamente significativa, con l'espressione di Ki-67, marcatore di proliferazione, e ciò rappresenta quindi una conferma del ruolo biologico positivo svolto da IGF-1R nella regolazione della tumorigenesi (de Alava, Panizo et al., 2000). Ciò nonostante, i livelli sierici di IGF-I e IGF-BP3 misurati in pazienti affetti da sarcoma di Ewing prima della chemioterapia non correlano significativamente con il decorso clinico, malgrado una leggera tendenza verso una migliore prognosi sia osservabile se si considera il rapporto IGF-BP3/IGF-I, con prognosi migliore nel caso di rapporto elevato (Toretzky, Steinberg et al., 2001).

La migliore definizione del ruolo funzionale di IGF-1R nel sarcoma di Ewing è stata possibile grazie all'utilizzo *in vitro* di diverse strategie inibenti il recettore e la sua via di segnalazione. L'utilizzo dell'anticorpo  $\alpha$ IR-3 che, legandosi alla subunità  $\alpha$ , blocca il legame di IGF-I a IGF-1R e quindi la sua attività inibisce la proliferazione di cellule di sarcoma di Ewing grazie ad un effetto citostatico risultante dalla combinazione della riduzione delle cellule in fase S e dell'induzione di apoptosi. Il blocco di IGF-1R riduce inoltre la produzione del fattore pro-angiogenetico VEGF-A e la capacità migratoria di linee cellulari di SE, evidenziando un potenziale ruolo di IGF-1R nella sviluppo di metastasi (Stramiello, Benini et al., 2003; Scotlandi, Benini et al., 1996). Gli effetti osservati *in vitro* si confermano anche *in vivo*, situazione in cui il trattamento con  $\alpha$ IR-3 riduce la capacità tumorigenica rispetto ai controlli non trattati (Scotlandi, Benini et al., 1998). Considerando il ruolo anti apoptotico svolto da IGF-1R,

diversi studi hanno valutato l'effetto citotossico *in vitro* dei chemioterapici convenzionali in combinazione a trattamenti inibenti IGF-1R e il suo segnale. L'inibizione di IGF-1R, di PI3K o di MAPK, mediante l'anticorpo  $\alpha$ IR-3 o gli inibitori specifici LY294002 e PD98059 rispettivamente, incrementa la sensibilità a farmaci come doxorubicina e vincristina, normalmente utilizzati nella terapia del sarcoma di Ewing (Benini, Manara et al., 2001; Toretsky, Thakar et al., 1999; Benini, Manara et al., 2004). Risultati analoghi sono stati ottenuti attraverso l'uso di RNA antisenso (Scotlandi, Maini et al., 2002) e dominanti negativi (Scotlandi, Avnet et al., 2002) diretti contro IGF-1R.

L'utilizzo di inibitori della cascata di trasduzione del segnale di IGF-1R, in combinazione ad IGF-I, ha inoltre permesso di caratterizzare meglio il ruolo biologico svolto da PI3K e MAPK nel sarcoma di Ewing. Sia LY294002 che PD98059 inibiscono la proliferazione cellulare inducendo un blocco delle cellule in fase G<sub>1</sub>. In contrapposizione, solo LY294002 è in grado di innescare il processo apoptotico confermando il ruolo fondamentale di Akt nel controllo dell'apoptosi. Di particolare interesse sono poi i dati ottenuti con trattamento combinato inibitore/IGF-I. L'aggiunta di IGF-I è in grado di revertire l'effetto pro-apoptotico e anti proliferativo di LY294002 ma non quello anti proliferativo di PD98059. L'attivazione di MAPK risulta quindi essere la via di segnalazione fondamentale nel controllo della proliferazione di cellule di sarcoma di Ewing (Benini, Manara et al., 2004).

L'analisi dei dati ottenuti mediante diversi metodi di inibizione di IGF-1R (anticorpi specifici, RNA antisenso, recettori dominanti negativi e molecole dirette contro i principali mediatori della cascata di trasduzione del segnale) confermano ulteriormente l'importanza del circuito autocrino IGF-I/IGF-1R nella patogenesi del sarcoma di Ewing, evidenziando il ruolo di IGF-1R come potenziale bersaglio terapeutico.

## **SCOPO DELLA TESI**

Il sarcoma di Ewing è un tumore primitivo dell'osso molto aggressivo che colpisce prevalentemente in età pediatrica e la cui sopravvivenza a 5 anni non supera il 60%. Nuovi approcci terapeutici da combinare ai trattamenti convenzionali (chemioterapia, radioterapia e chirurgia) sono quindi necessari per migliorare le aspettative di vita di tali pazienti.

Lo studio qui illustrato si pone come obiettivo la valutazione e la comparazione dell'efficacia preclinica di diverse strategie dirette contro IGF-1R in questo tumore. L'espressione e l'attività di questo sistema nel sarcoma di Ewing risultano infatti essere importanti nel modulare numerosi processi biologici quali proliferazione, apoptosi, migrazione e chemiosensibilità.

E' stata quindi valutata l'efficacia preclinica di una molecola in grado di inibire in maniera specifica l'attività di IGF-1R in contrapposizione all'utilizzo della tecnologia siRNA che inibisce l'espressione del recettore.



# MATERIALI E METODI

## LINEE CELLULARI

Per questo studio sono state utilizzate 10 linee cellulari di sarcoma di Ewing e una linea di carcinoma mammario (SK-BR-3). Le linee LAP-35, IOR/BRZ, IOR/CAR, IOR/NGR, IOR/RCH sono state ottenute nel Laboratorio di Ricerca Oncologica degli Istituti Ortopedici Rizzoli. La linea di carcinoma mammario e le linee SK-ES-1, SK-N-MC e RD-ES sono state fornite dall'American Type Collection (Rockville, MD). Le linee TC-71 e 6647 sono state invece fornite da T.J. Triche (Children's Hospital, Los Angeles, CA).

Il silenziamento del gene codificante IGF-1R è stato effettuato mediante trasfezione stabile di un plasmide codificante una sequenza diretta contro IGF-1R. La linea cellulare TC-71 è stata trasfettata con il metodo del calcio-fosfato. I cloni selezionati sono stati nominati TCsiIGFIR-45, TCsiIGFIR-53 e TCsiIGFIR-61.

Tutte le cellule sono state mantenute in coltura in *Iscove's modified Dulbecco's medium* (IMDM), addizionato di Penicillina (100 U/ml) e Streptomina (100 µg/ml) (Life Technologies), arricchito con 10% di siero fetale inattivato bovino (FBS) (Cambrex-Biowittaker). Le linee trasfettate sono state cresciute nelle stesse condizioni e selezionate con l'aggiunta di G418 (500 µg/ml) (Sigma Aldrich).

Tutte le linee cellulari sono state mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>.

## FARMACI

NVP-AEW541 è un farmaco prodotto e fornito da Novartis Pharma (Basilea, SW). Tale composto è stato solubilizzato in DMSO e conservato a -20°C.

L'anticorpo neutralizzante  $\alpha$ IR-3 è stato fornito da Calbiochem (San Diego, CA). Gli altri farmaci utilizzati sono vincristina (VCR), ifosfamide (IFO), doxorubicina (DXR), actinomicina D (ACT-D) e cis-platino (CDDP). L'IFO (forma attivata) è stata

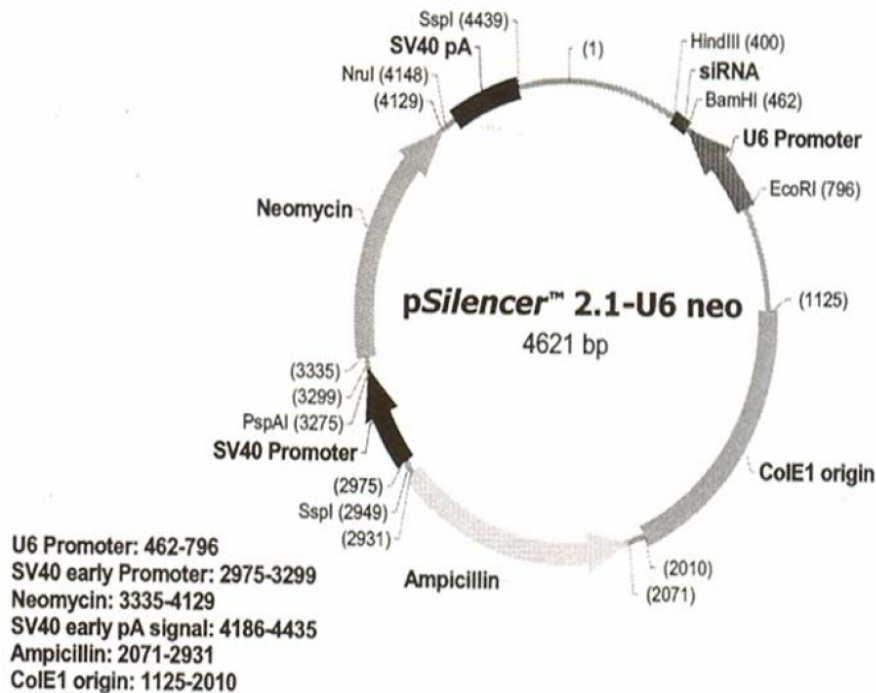
fornita da Baxter Oncology GmbH mentre DXR, CDDP, VCR e ACT-D da Sigma Aldrich.

La DXR (liofilizzata) è stata ricostituita in acqua bidistillata sterile e conservata a  $-20^{\circ}\text{C}$ . L'IFO, per via della sua instabilità, viene mantenuta in forma liofilizzata alla temperatura di  $-20^{\circ}\text{C}$  e ricostituita al momento dell'uso. Tutti i restanti farmaci sono conservati in forma liquida e mantenuti alla temperatura di  $4^{\circ}\text{C}$ .

Le soluzioni d'uso dei vari farmaci sono state preparate diluendo le soluzioni madre in IMDM 10% FBS, immediatamente prima dell'uso.

## PREPARAZIONE DI DNA PLASMIDICO

I cloni TCsiIGFIR sono stati ottenuti in seguito a trasfezione del plasmide pSilencer™-2.1-U6 neo (Ambion), in cui è stata inserita la sequenza codificante la molecola *short hairpin RNA* specifica per il gene IGF-1R.



5' GATCC-GGATTGAGAAAAATGCTGA-TTCAAGAGA-TCAGCATTCTTCTCAATCC-TTTTTTGGAAA 3'  
 G-CCTAACTCTTTTACGACT-AAGTTCTCT-AGTCGTA AAAAGAGTTAGG-AAAAAACCTTTTCGA

L'inserto codificante il shRNA IGF-1R è stato ottenuto mediante reazione di *annealing* dei due filamenti senso ed antisenso.

I due oligonucleotidi sono stati portati alla temperatura di  $95^{\circ}\text{C}$ , mantenuti a tale temperatura per 5 minuti e poi lasciati raffreddare a temperatura ambiente (RT).

La reazione di *annealing* è stata verificata mediante elettroforesi su gel di acrilammide al 15% e colorazione con etidio bromuro.

L'inserto specifico per il gene IGF-1R è stato inserito nel vettore plasmidico mediante trattamento over night a 13°C con T4 DNA ligasi.

Per l'amplificazione del plasmide è stata effettuata una trasformazione batterica. Il gene di selezione per le cellule trasformate codifica per la resistenza all'ampicillina. Il DNA plasmidico è stato aggiunto alle cellule batteriche competenti. La miscela così ottenuta è stata mantenuta in ghiaccio per 30 minuti e successivamente a 42°C per 30 secondi.

La sospensione batterica ottenuta per aggiunta di 250 µl di SOC Medium alle cellule competenti è stata mantenuta in agitazione a 37°C per 1h. I batteri sono poi stati seminati su piastre di agar contenenti ampicillina (50 µg/ml).

Dopo circa 18h a 37°C sono state prelevate alcune colonie singole ed inoculate separatamente in 2 mL di terreno LB addizionato di ampicillina (50 µg/ml). I singoli cloni sono stati amplificati per circa 18h in agitazione a 37°C. Le colture batteriche così ottenute sono state testate per la presenza del plasmide contenente l'inserto. Per l'estrazione del DNA plasmidico è stato usato il sistema *QIAfilter plasmid Mini kit* (QIAGEN). Il DNA così ottenuto è stato digerito per 1h a 37°C con gli enzimi di restrizione BamHI e HindIII, al fine di valutare la presenza dell'inserto. Il prodotto di restrizione è stato visualizzato mediante elettroforesi su gel di acrilammide al 15%. Il clone selezionato è stato inoculato in 100 mL di terreno LB con ampicillina (100 µg/ml). La sospensione batterica è stata posta a 37°C per circa 18h in vigorosa agitazione. Il pellet di batteri così ottenuto è stato poi lisato mediante *QIAfilter plasmid Midi kit* (QIAGEN) per estrarre il DNA plasmidico. Il sequenziamento del plasmide ha permesso di verificare la presenza e la correttezza dell'inserto. La concentrazione del DNA plasmidico è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica.

## **TRASFEZIONE**

Cellule TC-71 sono state seminate in petri da 100 mm di diametro in IMDM 10% FBS, in modo da ottenere il 60% circa di confluenza al momento della trasfezione (250.000 cellule/petri). La trasfezione è stata effettuata a 48h dalla semina secondo il protocollo del kit *Calcium Phosphate Transfection System* (Invitrogen) che prevede la preparazione di una soluzione contenente DNA plasmidico (10-20 µg), CaCl<sub>2</sub>, DNA carrier di sperma di salmone (20 µg), HBS 1X, soluzione con fosfato ed acqua. La soluzione è stata mescolata facendo gorgogliare dell'aria con una pipetta; dopo la formazione di piccoli precipitati Ca<sup>2+</sup>-DNA, la soluzione è stata aggiunta goccia a goccia sulle cellule seminate. Come controllo, le petri restanti sono state trattate con una soluzione contenente solamente acqua e sali

Trascorsi 3-4 giorni dalla trasfezione, le cellule sono state esposte al terreno selettivo con G418 (500 µg/ml) per circa 10 giorni. Successivamente si è proceduto alla selezione dei cloni TCsiIGFIR sulla base dell'espressione proteica di IGF-1R.

## **ANALISI DI IGF-1R E DELLE PROTEINE INTERESSATE NELLA SUA VIA DI TRADUZIONE DEL SEGNALE MEDIANTE WESTERN BLOTTING**

Per selezionare i cloni ottenuti dalla trasfezione, il livello d'espressione di IGF-1R nei lisati cellulari di circa 100 cloni TCsiIGFIR è stato valutato, mediante western blotting,

Le cellule sono state seminate in IMDM 10% FBS e raccolte al raggiungimento di una confluenza pari a circa il 70-80% mediante 2 lavaggi con PBS freddo. La lisi è stata effettuata con RIPA buffer per 30 minuti in ghiaccio (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.1% Sodium Dodecyl Sulphate (SDS), 1% TritonX, 5mM EDTA, 1% SodiumDeoxycholate, 1mM phenyl-methylsulfonyl fluoride, 1mM Sodium Orthovanadate e Aprotinina (10 µg/ml)).

La concentrazione proteica del lisato è stata determinata mediante Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD).

Campioni di 30 µg di proteina sono stati separati mediante elettroforesi su gel di bis-acrilammide, ad una concentrazione del 7.5%, in condizioni denaturanti, e poi trasferiti su membrana di nitrocellulosa.

Mediante colorazione con Ponceau si è valutata la presenza di proteine sulla membrana di nitrocellulosa che è stata poi incubata per 1h con una soluzione TBST (10 mM Tris-HCl ph 7.4, 150 mM NaCl e 0.1% Tween20) al 5% di non-fat dry milk, per saturare i possibili siti aspecifici. La membrana è stata lasciata in incubazione overnight a 4°C con un anticorpo diretto contro la subunità β di IGF-1R (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Dopo incubazione con anticorpo secondario è stata rilevata l'attività della perossidasi mediante Western Blotting Detection Reagents (ECL-AMERSHAM).

Per il controllo dell'omogeneità di caricamento dei lisati proteici, le membrane sono state incubate con anticorpo primario diretto contro la GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc), proteina omogeneamente espressa.

La tecnica del western blotting è stata ulteriormente usata per la caratterizzazione del grado di fosforilazione di IGF-1R, Erk e Akt, nonché per la valutazione dell'espressione di InsR nelle diverse linee di sarcoma di Ewing o nei cloni TCsiIGFIR.

Le diverse linee cellulari di sarcoma di Ewing nonché le cellule TCsiIGFIR sono state seminate in petri 100mm al fine di raggiungere una densità del 70-80% a 48h dalla semina. Per determinare lo stato di fosforilazione di IGF-1R e la formazione di complessi InsR/IGF-1R, le cellule TCsiIGFIR e TC-71 sono state seminate sia in IMDM 10% FBS che in IMDM 1% FBS. Per determinare invece l'effetto del farmaco sulle vie di segnalazione mediate da IGF-1R, la linea cellulare TC-71 è stata seminata in petri 100 mm in IMDM 10% FBS. Dopo circa 36h il terreno è stato sostituito con IMDM senza siero per altre 18h. Le cellule sono quindi state pretrattate per 2h con diverse concentrazioni di NVP-AEW541 e in seguito esposte a IGF-I (Calbiochem) 50 ng/ml per 5-30 minuti. Per valutare l'effetto temporale del farmaco sullo stato di fosforilazione di Erk e Akt è stato effettuato un esperimento di *time course* (da 1h a 48h di trattamento). Dopo 24h della semina le cellule sono state trattate con NVP-AEW541 (1  $\mu$ M e 3 $\mu$ M).

La procedura è analoga a quella precedentemente descritta con la sola eccezione del buffer di lisi (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 0.25 % SodiumDeoxycholate, 1 mM Sodium Orthovanadate, 1 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride e Aprotinina (10  $\mu$ g/ml)). Campioni di 40  $\mu$ g di proteina sono stati separati mediante elettroforesi su gel di bis-acrilammide, in condizioni denaturanti, ad una concentrazione del 10% per Erk e Akt e del 7.5% per IGF-1R e InsR. Le membrane sono state poi lasciate in incubazione overnight a 4°C con anticorpo anti-Phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204), anti-p44/42, anti-Phospho Akt (Ser473), anti-Akt, anti-Phospho IGF-1R (Tyr1131) (tutti Cell Signaling Technology) e anti-InsR (Santa Cruz Biotechnology, Inc).

La presenza dei complessi InsR/IGF-1R è stata valutata mediante co-immunoprecipitazione dei 2 recettori: 500 $\mu$ g di proteina sono stati posti in rotazione ON a 4°C in presenza di 2  $\mu$ g di anticorpo anti-InsR. Sono poi stati aggiunti 40  $\mu$ l di Protein A/G sepharose e la soluzione è stata posta in rotazione per 1h a 4°C. Successivamente sono stati effettuati 5 lavaggi con buffer di lisi più inibitori per rimuovere gli eccessi proteici non catturati dall'anticorpo. Il sample buffer è stato aggiunto e i campioni sono stati posti 5' a 95°C. L'immunoprecipitato è stato quindi caricato su gel di bis-acrilammide. Le membrane sono poi state lasciate in incubazione overnight a 4°C con anticorpo anti-IGF-1R. Il controllo di immunoprecipitazione è stato effettuato mediante incubazione con anticorpo anti-InsR.

## **VALUTAZIONE DELLO STATO DI FOSFORILAZIONE DI AKT E ERK1/2 MEDIANTE TEST ELISA**

La metodica ELISA (Superarray Array ELISA Kit) è stata utilizzata per la valutazione dello stato fosforilativo di Erk1/2 e Akt nei cloni TCsiIGFIR.

Gli esperimenti sono stati effettuati in IMDM 10. Si è voluto inoltre valutare lo stato fosforilativo di tali molecole in seguito a stimolazione con IGF-I.

Le cellule sono state seminate in piastra 96 pozzetti (10.000 cellule/pz). Per la valutazione dello stato basale di Erk1/2 e Akt, le cellule sono state fissate a 48h dalla semina. Negli esperimenti con IGF-I, a 36 h dalla semina, i cloni TCsiIGFIR e le cellule della linea parentale sono stati posti in IMDM senza siero. Dopo circa 18h è stata effettuata la stimolazione con IGF-I (50 ng/ml): 5 minuti per la valutazione dello stato fosforilativo di Erk1/2 e 45 minuti per valutare Akt. La fissazione è stata fatta con formaldeide al 4% per 20 minuti a temperatura ambiente.

La quantificazione è stata effettuata seguendo il protocollo del kit che prevede una fase di quencing, seguita da antigen retrieval con trattamento in microonde, blocco dei siti aspecifici e incubazione con anticorpo primario e secondario (vedi anticorpi usati in Western Blotting).

La rilevazione colorimetrica avviene per aggiunta di una soluzione di sviluppo e una soluzione di stop, cui segue la misurazione dell'assorbanza a 450nm.

Tutti i valori ottenuti vengono normalizzati sul numero di cellule per pozzetto determinato in seguito ad una procedura di colorazione delle cellule e misurazione dell'assorbanza a 550nm.

## **VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI IGF-1R SULLA MEMBRANA PLASMATICA**

Per caratterizzare l'espressione di IGF-1R sulla superficie cellulare dei cloni TCsiIGFIR rispetto alla linea parentale, è stata effettuata un'immunofluorescenza indiretta e successiva analisi in citometria a flusso.

Per ogni linea cellulare sono stati preparati dei prelievi da 500.000 cellule. I campioni sono stati lavati in PBS e successivamente risospesi in anticorpo primario anti IGF-1R o PBS (controllo negativo). Dopo 30 minuti di incubazione a 4°C, la reazione è stata bloccata con aggiunta di IMDM senza siero. Le cellule sono state poi risospese con anticorpo secondario anti-mouse FITC (Euroclone). Dopo 30 minuti a 4°C, l'incubazione è stata interrotta come sopra e i campioni sono stati centrifugati e risospesi in PBS con etidio bromuro (100 ng/ml) per la rilevazione delle cellule morte.

## **ANALISI DELLA CRESCITA CELLULARE *IN VITRO***

### ***Crescita in monostrato***

Le cellule TC-71 e i cloni TCsiIGFIR sono state seminate in piastra 96 pozzetti ad una densità di 1000 cellule/pozzetto. La capacità di crescita è stata analizzata sia in normale terreno di crescita (IMDM 10% FBS) sia in condizioni di basso siero (IMDM 1% FBS). L'andamento della crescita è stato monitorato a 24h, 48h, 72h e 96h dalla semina mediante la metodica MTT assay (Roche-Diagnostic) con lettura di assorbanza a 550nm.

### ***Crescita cellulare in presenza di IGF-I e insulina***

Le cellule TCsiIGFIR e quelle della linea parentale TC-71 sono state seminate ad una densità di 50000 cellule/pozzetto in piastra 24 pozzetti in IMDM 1% FBS in presenza o assenza di insulina 10 nM o IGF-I 50 ng/ml. A 96h dalla semina è stata effettuata conta vitale mediante Trypan blue.

### ***Test di citotossicità in vitro***

L'effetto citotossico di NVP-AEW541 è stato valutato sia in IMDM 10% FBS che in IMDM 1% FBS. Le cellule TC-71 sono state seminate in piastra 24 pozzetti (50.000 cellule/pz) in IMDM 10% FBS. Dopo 24h il terreno è stato sostituito con IMDM 10% FBS o 1% FBS più o meno varie concentrazioni di NVP-AEW541 (da 30nM a 3µM) per 72h.

Per determinare la concentrazione di NVP-AEW541 e degli altri farmaci in grado di inibire la crescita cellulare del 50% (IC<sub>50</sub>), le linee cellulari sono state seminate ad una densità di 20.000 cellule/cm<sup>2</sup>, in IMDM 10% FBS. A 24h dalla semina, è stato effettuato un cambio di terreno, incubando così le cellule con differenti concentrazioni di NVP-AEW541 (da 30nM a 10µM) per 72h. Esperimento analogo è stato condotto sulla linea cellulare TC-71 in cui il cambio di terreno con NVP-AEW541 (100nM, 300nM e 1µM) è stato effettuato un'unica volta a 24h della semina o ripetutamente dopo ogni 24h.

Per valutare la capacità di IGF-I di recuperare l'effetto inibitorio di NVP-AEW541 sulla capacità proliferativa, cellule TC-71 (50.000 cellule/pz in piastra 24 pozzetti) sono state esposte al farmaco (300nM e 1µM) insieme ad IGF-I 50ng/ml per 48h.

In tutti gli esperimenti la crescita cellulare è stata valutata mediante conta con colorante vitale Trypan blue.

### ***Crescita cellulare in terreno semi-solido (soft agar)***

La crescita in condizioni d'indipendenza da ancoraggio dei trasfettanti TCsiIGFIR e della linea parentale TC-71 è stata valutata in Agar 0.33% (Seaplaque Agarose, FMC Bioproducts) sia in IMDM 10% FBS che in IMDM 1% FBS. Per quel che riguarda i trattamenti con NVP-AEW541, le linee cellulari sono state seminate in terreno semi-solido in IMDM 10% FBS con dosi crescenti di farmaco (100nM, 300nM, 1µM, 3µM). In entrambi i casi, sospensioni da 1000 e 3300 cellule sono state seminate in terreno semi-solido. Le petri sono state mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Le colonie delle linee cellulari sono state contate dopo 7-15 giorni.

### ***Valutazione dell'apoptosi mediante test morfologico e annessina***

Le linee cellulari sono state seminate in IMDM 10% FBS. A 24h dalla semina è stato effettuato un cambio di terreno con concentrazioni crescenti di NVP-AEW541 (300nM, 1µM, 3µM). Le cellule sono state raccolte dopo 24h e 48h di trattamento. Prelievi da 500.000 cellule sono stati processati seguendo la metodica acclusa al kit MEBCYTO Apoptosis kit (MBL, Medical and Biological Laboratories). Si è quindi proceduto con la lettura della fluorescenza mediante citometria a flusso (FACScan, Becton Dickinson).

Lo stesso schema di trattamento è stato applicato per la valutazione dei nuclei apoptotici. Dopo 24h, 48h e 72h dall'aggiunta del farmaco, le cellule sono state fissate con una soluzione di metanolo/acido acetico (3:1) per 15 minuti. Dopo una breve idratazione, si è effettuato il contrasto nucleare mediante colorazione con Hoechts 33258 (Sigma-Aldrich). L'osservazione al microscopio di circa 1000 nuclei ha permesso di valutare la presenza di corpi apoptotici.

### ***Analisi del ciclo cellulare***

Al fine di valutare eventuali variazioni nel ciclo cellulare in seguito a trattamento con NVP-AEW541 è stato eseguito il test d'incorporazione della Bromodesossi-Uridina (BrdU).

Le varie linee cellulari sono state seminate ad una densità di 500.000 cellule/fiaschina in IMDM 10% FBS.

A 24h dalla semina, è stato effettuato un cambio di terreno con concentrazioni crescenti di NVP-AEW541 (100nM, 300nM, 1µM, 3µM) diluito in IMDM 10% FBS. Dopo 24h e 48h di trattamento, il terreno è stato sostituito con IMDM 10% FBS contenente BrdU 10µM seguito da incubazione di 1h a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state raccolte, lavate due volte con PAT (PBS, 1% BSA, 0.5% Tween20) e fissate incubandole per 30 minuti a 4°C in etanolo 70% freddo. Dopo



una serie di lavaggi con PAT, il pellet è stato messo in incubazione 30 minuti a RT con HCl 2N 0.5% TritonX, per denaturare il DNA, e poi 5 minuti in sodio tetraborato 0.1 M pH 8.5. Dopo tale trattamento si è effettuata una normale fluorescenza indiretta con anticorpo anti-BrdU (Becton Dickinson) diluito 1:4 in PAT (i controlli negativi sono stati risospesi in solo PAT) e successivamente con anticorpo secondario anti-mouse FITC (Euroclone, diluito 1:20 in PAT) per 30 minuti. Il pellet cellulare è stato messo in incubazione per 5 minuti con ioduro di propidio (20 µg/ml) diluito in PAT. I campioni sono stati successivamente analizzati mediante citometria a flusso.

## **ANALISI DELLA CAPACITÀ MIGRATORIA**

La valutazione della capacità migratoria è stata effettuata utilizzando camere Transwell (Costar) caratterizzate da una membrana di policarbonato con pori di 8 µm di diametro. In ogni camera è stata seminata una sospensione cellulare contenente 100.000 cellule. Per quel che riguarda i cloni TCsiIGFIR, le cellule sono state risospese in IMDM 10% FBS. Per valutare l'effetto di NVP-AEW541 sulla migrazione, le cellule sono state invece risospese in IMDM 10%FBS ± NVP-AEW541 (0.3-3 µM). Nella camera sottostante sono stati aggiunti 600µl di IMDM 10%FBS ± IGF-I (50 ng/ml).

Le camere sono state incubate per circa 18h a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state fissate in metanolo e successivamente colorate con Giemsa (Riedel-De Haen). Il conteggio delle cellule migrate è stato effettuato mediante osservazione al microscopio.

## **TRATTAMENTO COMBINATO *IN VITRO* DI NVP-AEW541 CON I CHEMIOTERAPICI CONVENZIONALI**

Gli esperimenti sono stati effettuati sulla linea cellulare TC-71. La linea cellulare è stata seminata ad una densità di 20.000 cellule/cm<sup>2</sup> in IMDM 10% FBS. A 24h dalla semina è stato effettuato un cambio di terreno, incubando così le cellule con differenti concentrazioni di solo chemioterapico o chemioterapico associato a NVP-AEW541 100 nM (dose inibente il 20-25% della crescita cellulare). Dopo 72h di trattamento, le cellule sono state contate con colorante vitale Trypan blue per valutare l'effetto combinato di chemioterapico e NVP-AEW541.

## **VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI NVP-AEW541 SULLA CAPACITÀ TUMORIGENICA E METASTATICA *IN VIVO***

Per valutare la modulazione della capacità tumorigenica da parte di NVP-AEW541, topi atimici femmina Crl:nu/nu di 4-5 settimane (CD1) BR (Charles River) sono stati inoculati sottocute con  $5 \times 10^6$  cellule TC-71. Quando il tumore ha raggiunto una dimensione quantificabile, 6 giorni dopo l'inoculo, i topi sono stati divisi in gruppi casuali. I trattamenti sono stati i seguenti: veicolo (25mmol/L L(+)-acido tartarico), VCR 1mg/kg/die al giorno 0 e giorno 1, NVP-AEW541 (50 mg/kg o 100 mg/kg) o NVP-AEW541 (50 mg/kg) più VCR (1mg/kg/die) al giorno 0 e giorno 1. Il trattamento è stato eseguito due volte al giorno, 7 giorni alla settimana per 2 settimane. La crescita del tumore è stata valutata settimanalmente misurando il volume, calcolato come  $\pi/6 \times [\sqrt{(ab)}]^3$ , dove  $a$  e  $b$  sono i due diametri maggiori.

La capacità metastatica è stata invece valutata mediante inoculo endovena di  $2 \times 10^6$  cellule TC-71. Al fine di ottenere animali privi di cellule natural killer, ai topi è stata effettuata un'iniezione i.v. di anti-asialo GM<sub>1</sub> antiserum 1:25 (Wako). I trattamenti sono stati i seguenti: veicolo (25mmol/L L(+)-acido tartarico), VCR 1mg/kg/die al giorno 0 e giorno 1 di trattamento, NVP-AEW541 (50 mg/kg), o NVP-AEW541 (50 mg/kg) più VCR (1mg/kg/die) al giorno 0 e giorno 1 di trattamento. Il trattamento è stato eseguito due volte al giorno, 7 giorni alla settimana per 2 settimane. Per ragioni etiche, i topi sono stati sacrificati, e quindi sottoposti all'esame necroscopico, quando il volume tumorale/metastasi ossea aveva raggiunto i 2.5 cm<sup>3</sup>. Topi senza evidenti segni di malattia sono stati sacrificati 3 mesi dopo l'inoculo. Il numero delle metastasi polmonari sperimentali è stato determinato contando con uno stereomicroscopio, dopo colorazione con inchiostro nero India.

Le procedure sperimentali sono state approvate dal comitato etico locale e sono state eseguite in accordo con l'ultima versione della Dichiarazione di Helsinki.

La valutazione di glucosio, urea e transaminasi sieriche è stata effettuata su tre topi inoculati s.c. per gruppo dopo una settimana dall'inizio del trattamento con NVP-AEW541 (50 mg/kg) o VCR.

## **VALUTAZIONE DELL'UP-TAKE DI GLUCOSIO**

Cellule TC-71 e SK-BR-3 sono state seminate in petri 60mm su vetrino copri oggetto in IMDM 10% FBS. Il terreno di crescita è stato poi sostituito con IMDM senza siero per circa 20 ore. Le cellule sono quindi state trattate per 1h con NVP-AEW541 (300 nM), insulina (50 ng/ml) o combinazione dei due. Si è quindi aggiunto fluorescent glucose analogue 6-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-6-deoxyglucose (30

$\mu\text{M}$ ) per 10 minuti. Il DNA è stato marcato con Hoechst. Stesso protocollo è stato seguito per i cloni TCsiIGFIR in cui le cellule sono state trattate con insulina e glucosio fluorescinato o solo con glucosio fluorescinato.

## **ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA**

### ***Estrazione di RNA da linee cellulari***

$2 \times 10^6$  cellule sono state seminate in piastre da 100 mm in IMDM 10% FBS o IMDM 1% FBS. Dopo 48h le cellule sono state raccolte e il pellet è stato risospeso in RNAlater (Ambion Inc.) per preservare l'RNA. Questo è stato poi estratto utilizzando *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN).

### ***Controllo qualitativo dell'RNA estratto***

La concentrazione dell'RNA è stata misurata mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm e 280 nm. Sono stati considerati di buona qualità solo gli RNA con un valore di ratio maggiore di 1,8 (il rapporto tra i valori dell'assorbanza a 260 nm tipica dell'RNA e a 280 nm del DNA).

Per verificare ulteriormente la qualità dell'RNA estratto, i campioni sono stati controllati su gel all'1% di agarosio in Tris-Borato EDTA (TBE).

L'osservazione su gel evidenzia due bande predominanti di RNA ribosomiale 18S e 28S (2-5 kb) e RNA a basso peso molecolare (0.1-0.3 kb).

### ***Retro trascrizione***

L'espressione del recettore IGF-1R e di altri fattori cellulari è stata analizzata mediante tecniche di Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) e Real Time PCR.

La tecnica di RT-PCR prevede la conversione dell'RNA messaggero in cDNA. Per ogni linea cellulare, 500 ng di RNA totale sono stati denaturati a  $65^\circ\text{C}$  per 10 minuti e quindi retrotrascritti secondo la metodica per PCR quantitativa: 10 minuti a  $25^\circ\text{C}$  per l'attivazione della retrotrascrittasi, 30 minuti a  $48^\circ\text{C}$  per la retrotrascrizione e 5 minuti a  $95^\circ\text{C}$  per l'inattivazione dell'enzima. La miscela di retrotrascrizione contiene  $500 \mu\text{M}$  di dNTPs, 125 unità di MultiScribe Reverse Transcriptase, 40 unità di RNase Inhibitor,  $2.5 \mu\text{M}$  oligo d(T)<sub>16</sub>, 1X TaqMan RT Buffer, e 5 mM  $\text{MgCl}_2$  (Applied Biosystems). Come controlli negativi sono stati utilizzati dei campioni derivanti da reazioni nelle quali erano stati omessi l'enzima di retrotrascrizione o l'RNA.

## ***Polymerase Chain Reaction (PCR)***

Per valutare il successo della RT-PCR è stata effettuata una PCR per la  $\beta$ -actina (479 bp), un gene ubiquitariamente espresso.

Le sequenze dei primer utilizzati sono: senso: 5'-CGA GCG GGA AAT CGT GCG TGA CAT TAA GGA G -3; antisenso: 5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3'

La PCR è stata effettuata secondo le seguenti condizioni: *hot-start* a 95°C per 5', seguito da 30 cicli da 94°C per 30'' (denaturazione), 60°C per 30'' (annealing) e 72°C per 50'' (allungamento).

I prodotti di amplificazione sono stati identificati tramite elettroforesi in gel di agarosio al 2% in TBE 1X e colorazione con etidio bromuro.

## ***Real time Polymerase Chain Reaction***

L'analisi quantitativa dell'espressione del recettore IGF-1R è stata seguita mediante la tecnica di Multiplex Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR quantitativa). I primers per l'analisi quantitativa della glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) sono stati disegnati utilizzando il software Primer Express (Applied Biosystem); l'analisi quantitativa di IGF-1R è stata effettuata utilizzando uno specifico TaqMan Gene Expression Assay (Hs 00181385\_m1) (Applied Biosystem).

Il livello di espressione del gene di controllo GAPDH è quantificato al fine di normalizzare il livello di espressione del gene target preso in esame.

Le reazioni di PCR per GAPDH e IGF-1R sono state eseguite utilizzando la soluzione TaqMan Universal PCR Master Mix, contenente AmpliTaq Gold DNA Polymerase (0.025 U/  $\mu$ M), AmpErase UNG (0.01 U/ $\mu$ l), dATP (200  $\mu$ M), dCTP (200 $\mu$ M), dGTP (200 $\mu$ M) e dUTP (400 $\mu$ M), MgCl<sub>2</sub> (5.5mM), TaqMan Buffer A 1X.

Per poter distinguere le due reazioni di amplificazione sono stati utilizzati reporter diversi per i due geni, ovvero il fluorocromo Fam per il IGF-1R e il fluorocromo Vic per il gene GAPDH. I primers per il gene GAPDH sono stati utilizzati in condizioni limitanti.

Le sequenze dei primers e del probe usati per GAPDH sono:

senso: 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGTC-3',

antisenso: 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3',

probe: 5'-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC-3'

L'amplificazione è stata eseguita con lo strumento ABI PRISM 7900H SDS (Applied Biosystems). Tutti i campioni sono stati amplificati in triplicato e fatti correre su un gel al 2 % d'agarosio al fine di confermare la specificità dei prodotti di PCR.

Il livello d'espressione dei geni analizzati nei cloni TCsiIGFIR è stato rapportato a quello della linea parentale TC-71, utilizzata come calibratore. L'analisi dei risultati è

stata eseguita secondo il metodo comparativo con valutazione del ciclo soglia (Ct). Il Ct della GAPDH, gene di riferimento per la normalizzazione, è stato sottratto al Ct del gene d'interesse in tutti i campioni. Si ottiene così il Delta Ct ( $\Delta Ct$ ) cui viene ulteriormente sottratto il  $\Delta Ct$  del calibratore (TC-71), ottenendo così il  $\Delta\Delta Ct$ . Il dato ultimo (RQ) viene calcolato con la formula ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Questo valore numerico evidenzia quante volte, in più o in meno, è espresso il gene d'interesse nel clone analizzato rispetto al calibratore.

### ***SuperArray PCR Array***

Per poter valutare contemporaneamente la modulazione dell'espressione di geni coinvolti nella via di trasduzione del segnale dell'insulina nei cloni TCsiIGFIR sono state utilizzate Insulin Signaling Pathway PCR Array (SuperArray Bioscience Corporation) che permettono la contemporanea valutazione di 84 geni di interesse più 5 geni di controllo. La reazione di PCR è stata effettuata seguendo il protocollo fornito dalla ditta. L'amplificazione è stata eseguita con lo strumento ABI PRISM 7900H SDS.

## **ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA**

I campioni analizzati derivano da xenografts, opportunamente fissati con formalina 10% PBS e inclusi in paraffina. L'analisi immunoistochimica è stata condotta secondo il metodo del complesso avidina-biotina perossidasi. Gli anticorpi utilizzati sono anti-IGF-1R $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology, Inc), MIB1 (Calbiochem), anti-Phospho Akt (Ser473) (Cell Signaling Technology) e anti-Phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology). Per la rilevazione della positività per IGF-1R e Ki-67, le sezioni sono state pretrattate con buffer citrato (0.01M acido citrico e 0.01M sodio citrato pH 6.0) in microonde a 750W per 3 cicli da 5 minuti ognuno. E' stato seguito il protocollo del kit Vectastain ABC kit (Vector Laboratories). L'attività endogena delle perossidasi è stata bloccata trattando i vetrini con perossido di idrogeno in metanolo per 30 minuti a temperatura ambiente mentre i siti aspecifici sono stati schermati da trattamento con siero di coniglio o di pecora. La rilevazione dell'espressione proteica è stata possibile grazie all'esposizione a 0.03% diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) e alla contro colorazione con ematossilina Mayer.

# **ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI IGF-1R IN CASI CLINICI**

## ***Casistica***

Lo studio è stato condotto su una serie di prelievi tumorali (biopsie o resezioni) di pazienti affetti da sarcoma di Ewing visitati agli Istituti Ortopedici Rizzoli dal 1995 al 2005. I campioni clinici analizzati derivano da tessuti tumorali congelati, per quel che riguarda le analisi di Microarray e RealTime PCR, o da tessuti inclusi in paraffina, nel caso di analisi in immunohistochimica.

Le caratteristiche clinico patologiche delle casistiche analizzate sono raccolte in Tabella 2.

## ***Controllo istologico***

Tutti i campioni tissutali sono stati controllati istologicamente in base alla qualità del campione e per la loro rappresentatività tumorale. Ad ogni campione destinato all'estrazione dell'RNA è stato asportato un frammento per la fissazione in formalina 4% tamponata e successiva inclusione in paraffina. Sezioni di tessuto di 5 µm di spessore sono state colorate con la tecnica dell'ematossilina-eosina e i preparati istologici sono stati osservati al microscopio per valutare lo stato e la percentuale di vitalità delle cellule di sarcoma Ewing.

## ***Analisi immunohistochimica***

La procedura precedentemente descritta per gli xenografts è stata utilizzata anche per valutare l'espressione di IGF-1R in circa 100 sezioni di biopsie/resezioni di pazienti affetti da sarcoma di Ewing incluse in Tissue Array preparato dal gruppo del Professor Antonio Llombart-Bosch dell'Università di Valencia.

## ***Estrazione di RNA***

Il Trizol è una soluzione monofasica costituita da fenolo e guanidina tiocianato utilizzata per isolare RNA totale e DNA da cellule e tessuti. Durante l'omogenizzazione o la lisi cellulare, il Trizol mantiene integro l'RNA, mentre disgrega la cellula e ne dissolve i componenti.

Prima di iniziare l'estrazione, i frammenti di tessuto tumorale vengono omogeneizzati e risospesi in un appropriato volume di Trizol. Successivamente, viene aggiunto cloroformio nella quantità di 1/5 del volume totale; la soluzione che si ottiene subisce un passaggio di agitazione decisa con il vortex per miscelare le due fasi e viene lasciata per 15 minuti in ghiaccio. Con la centrifugazione la fase acquosa si separa dalla

fase organica, in mezzo si interpone un'interfaccia contenente DNA. Alla fase acquosa prelevata contenente l'RNA viene aggiunto un ugual volume di isopropanolo che determina la precipitazione dell'RNA. Dopo 15 minuti di incubazione in ghiaccio segue una centrifugazione, al termine della quale viene eliminato il surnatante e lavato il pellet con etanolo 75%. Dopo averlo asciugato, il pellet di RNA viene sciolto in acqua sterile fredda e incubato per 10 minuti a 60 °C.

Le procedure di controllo qualitativo dell'RNA estratto, retro trascrizione, Polymerase Chain Reaction (PCR) sono analoghe a quelle applicate su RNA estratti da linee cellulari.

### ***Real time Polymerase Chain Reaction***

L'analisi dell'espressione di IGF-1R in casi clinici è stata effettuata utilizzando la tecnologia Low Density Array (Applied Biosystems). La reazione di PCR è stata eseguita utilizzando la soluzione TaqMan Universal PCR Master Mix. Tutti i campioni sono stati amplificati in duplicato utilizzando lo strumento ABI PRISM 7900H SDS.

Il TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystem) utilizzato è (Hs 00181385\_m1).

### ***Microarray***

Per lo studio di Microarray, l'RNA estratto mediante Trizol è stato quantificato mediante lo spettrofotometro GeneQuant pro (Amersham Pharmacia) e la sua qualità determinata mediante corsa su gel di agarosio e analisi con Agilent's 2100 Bioanalyzer (Agilent). I campioni derivati da tumori primitivi di sarcoma di Ewing e da un pool di cellule CD 34+ sono stati quindi utilizzati per ibridare Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 oligonucleotide microarrays (Affymetrix) secondo il protocollo GeneChip® One-Cycle Target Labelling ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)). In breve, 5 µg di RNA totale sono stati retrotrascritti a cDNA usando One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix). La marcatura con Biotina del filamento antisense di cRNA è stata effettuata con IVT Labelling Kit (Affymetrix). Il cRNA marcato e frammentato (15 µg ognuno) è stato ibridato per 16h a 45°C in forno di ibridizzazione 640 (60 rpm). I lavaggi e la colorazione degli array con streptavidina-ficoeritrina (SAPE) è stata completata in Fluidics Station 450 (Affymetrix). La scansione degli array è stata effettuata usando il laser confocale GeneChip Scanner 3000 mentre per l'analisi delle immagini è stato utilizzato il software GeneChip Operating (GCOS; Affymetrix).

La processazione dei dati e le successive analisi sono state effettuate usando software R e Bioconductor (Gentleman et al. 2004) e MATLAB (MathWorks Inc.). I dati sono stati ottimizzati all'interno di ogni array e tra i diversi array attraverso una *affine transformation* (Bengtsson and Hossjer 2006).

## **ANALISI STATISTICA**

La differenza tra medie è stata analizzata usando il test del *t student* e il test ANOVA. L'IC<sub>50</sub> è definito come la dose di farmaco che riduce la crescita del 50% rispetto ai controlli ed è stato calcolato dalla trasformazione lineare delle curve dose-risposta. L'analisi degli effetti della combinazione dei farmaci è stata effettuata usando il metodo del prodotto frazionale. Infine, per quanto riguarda la rappresentazione e la valutazione della significatività delle curve di sopravvivenza è stato usato il metodo del Log-Rank e di Kaplan-Meier.



**Tabella 2. Elenco dei casi di sarcoma di Ewing analizzati in questo studio**

	<i>Real-Time PCR</i> (42 casi)	<i>MicroArray</i> (30 casi)	<i>TissueArray</i> (98 casi)
<b>Sesso</b>			
Maschi	26	19	57
Femmine	16	11	41
<b>Età</b>			
≤ 14 anni	15	9	44
> 14 anni	27	21	54
<b>Sito del Tumore</b>			
Estremità	25	19	50
Pelvi	8	5	22
Altro	9	6	26
<b>Metastasi alla diagnosi</b>			
No	36	24	81
Si	6	6	17
<b>EFS (mesi)</b>			
Min-Max:	3-161	3-161	5-129
Mediana:	18	18	27
<b>OVS (mesi)</b>			
Min-Max:	4-161	4-161	5-129
Mediana:	33	35	36

# RISULTATI

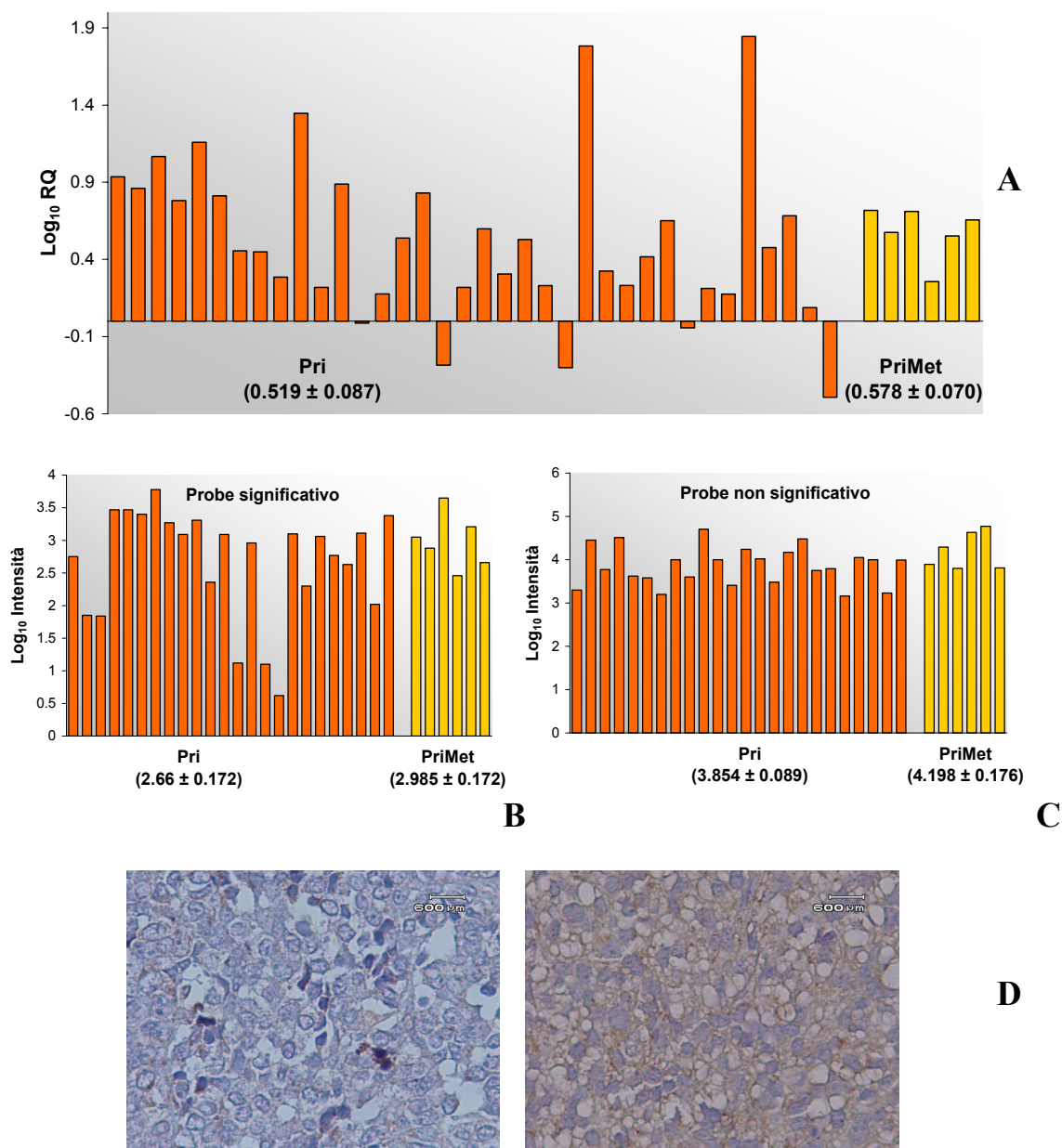
## ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI IGF-1R IN UNA SERIE DI CASI CLINICI

L'espressione di IGF-1R è da sempre considerata una caratteristica importante del sarcoma di Ewing. Numerosi studi hanno valutato l'uso di diversi approcci diretti contro IGF-1R come possibili terapie adiuvanti da applicare nella terapia di pazienti affetti da sarcoma di Ewing. Si è quindi valutata l'espressione e il ruolo prognostico di IGF-1R in una serie di casi clinici mediante 3 diversi approcci molecolari: RealTime PCR, cDNA Microarray e Tissue Array, i primi in grado di valutare l'espressione genica, il terzo in grado di valutare l'espressione proteica della molecola d'interesse.

I dati di Microarray sono espressi come  $\text{Log}_{10}$  dell'intensità assoluta misurata. L'analisi dei risultati di RealTime PCR è stata invece eseguita secondo il metodo comparativo con valutazione del ciclo soglia (Ct). Questo metodo prevede la definizione di un calibratore da utilizzare come riferimento che nel caso di studi clinici è solitamente rappresentato dal tessuto sano da cui origina il tumore. Nel caso del sarcoma di Ewing ciò non è possibile in quanto l'istogenesi del tumore è tuttora controversa. Le analisi sono quindi state effettuate utilizzando due calibratori diversi: un pool di RNA derivanti da tessuto muscolare sano e un pool di RNA derivanti da cellule CD34+. I risultati ottenuti con i due calibratori sono sovrapponibili. I valori di RealTime PCR sono quindi mostrati come  $\text{Log}_{10}$  del valore di RQ, ottenuti utilizzando cellule CD34+ come calibratore.

Come si può osservare in figura 3, il livello di espressione è eterogeneo sia in RealTime PCR (A) che in Microarray (B, C). La casistica analizzata comprende sia pazienti metastatici all'esordio che pazienti non metastatici. E' importante sottolineare come, l'analisi statistica condotta utilizzando il metodo del  $t$  test, non abbia evidenziato differenze significative tra i 2 gruppi di soggetti che sono quindi stati raggruppati insieme nelle successive analisi di sopravvivenza. L'analisi del  $t$  test è stata inoltre effettuata per valutare eventuali differenze significative tra i livelli di espressione in

pazienti liberi da malattia (NED) e in pazienti ricaduti (REL). Anche in questo caso non sono state osservate differenze significative tra i 2 gruppi in analisi, sia per i dati di RealTime PCR che di Microarray.



**Figura 3.** Espressione di IGF-1R in una serie di casi clinici. Analisi dell'espressione genica mediante RealTime PCR (A) e Microarray (B, C). I grafici B e C mostrano gli andamenti di due probe rappresentativi di valore prognostico significativo e non significativo, rispettivamente. Valori espressi come Media  $\pm$  SE. (D) Analisi dell'espressione proteica in Tissue Array.

Si è quindi valutato il ruolo prognostico di IGF-1R. I pazienti sono stati stratificati in base al livello d'espressione. Per i dati di RealTime PCR e Microarray, il

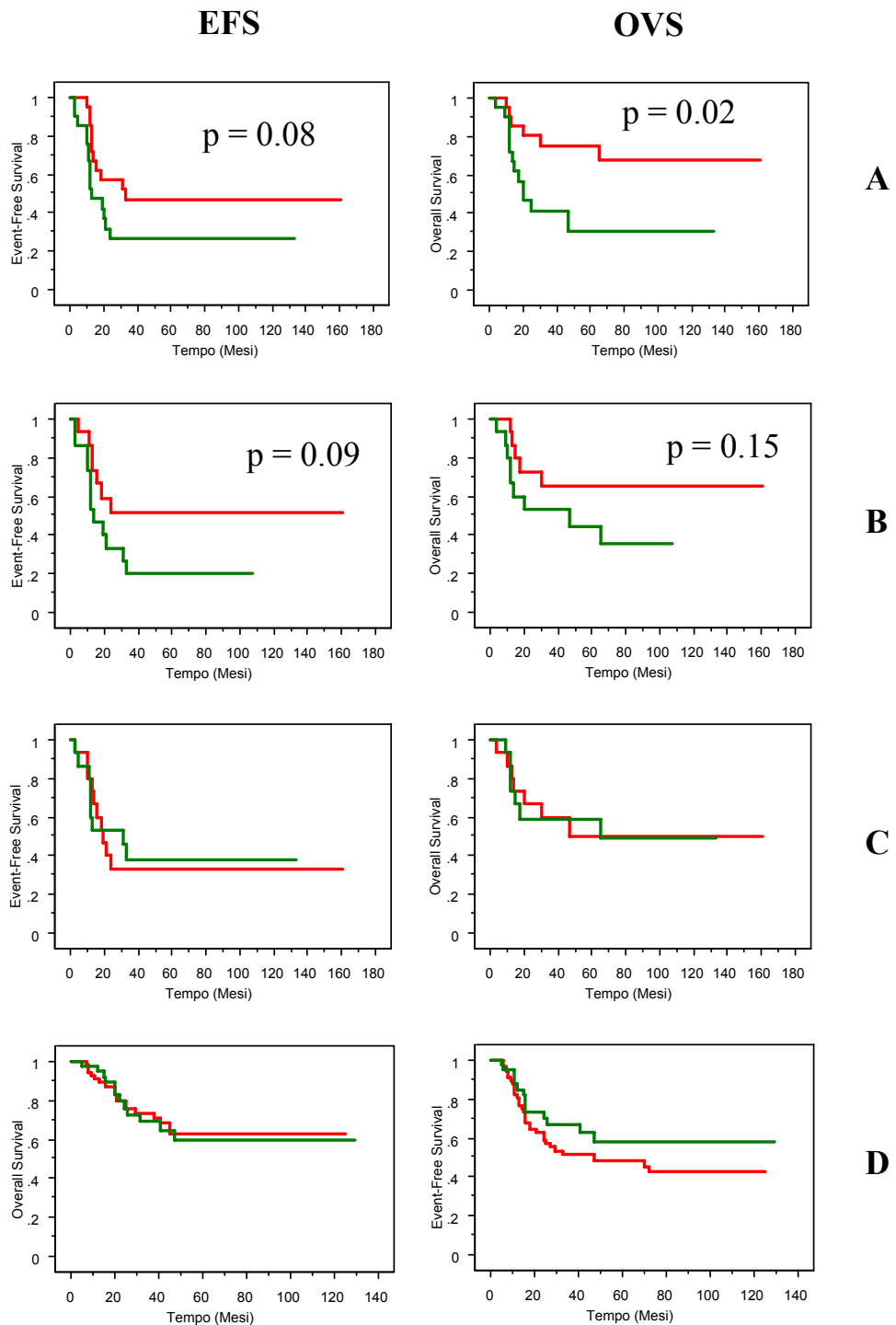
*cut-off* è stato definito nel valore mediano (RQ/intensità > valore mediano =HIGH, RQ/intensità ≤ valore mediano = LOW). Per i dati di Tissue Array, ad ogni caso è stato assegnato uno *score* sulla base di cui sono stati stratificati i pazienti (++-, +++ = HIGH; Neg, +/-, +-- = LOW). In figura 3D sono mostrati due casi rappresentativi del diverso livello d'espressione proteica di IGF-1R.

Il valore prognostico di IGF-1R è stato valutato come *Event-Free Survival* (EFS) e *Overall Survival* (OVS).

I valori di RealTime PCR evidenziano come un'elevata espressione di IGF-1R sia associata ad una significativa migliore prognosi nel caso di OVS, con una tendenza analoga anche nel caso di EFS (Figura 4A). L'analisi dei dati di Microarray risulta più complessa dato il numero di *probes* identificativi di IGF-1R (9 probes) presenti nel chip Affimetrix utilizzato. 7 probes su 9 evidenziano una completa sovrapposizione tra le curve di sopravvivenza dei pazienti alto esprimenti e basso esprimenti (Figura 4C). Solo nel caso di 2 *probes* si evidenzia una leggera tendenza, non statisticamente significativa, verso una migliore prognosi nel caso di alta espressione di IGF-1R (Figura 4B). L'analisi Microarray sembra quindi tendere complessivamente ad un'assenza di valore prognostico per IGF-1R. Entrambe le tecniche valutano il livello d'espressione genica del recettore. In RealTime PCR si parla però di valori relativi, essendo necessario un campione di riferimento che potrebbe inficiare i valori misurati. Tale effetto non si osserva invece nel caso di Microarray in cui si misura un valore assoluto di intensità.

La proteina IGF-1R risulta essere espressa nell'84% dei casi, tra cui 57 casi alto esprimenti, 25 casi basso esprimenti e solo 16 casi negativi, confermando l'espressione quasi costante di IGF-1R nel SE. L'analisi del suo valore prognostico mostra una completa sovrapposizione tra le curve di sopravvivenza dei pazienti alto esprimenti e basso esprimenti (Figura 4D). Tale studio è stato condotto su una casistica più ampia ma parzialmente sovrapposta alle precedenti (98 casi vs 42/30 casi per RealTime PCR/Microarray).

Studi precedenti hanno evidenziato come diverse modificazioni post trascrizionali possano intervenire su IGF-1R. Si può quindi ipotizzare che tali fenomeni rendano meno significativo il livello di espressione genica rispetto all'espressione proteica, annullando il valore prognostico evidenziato per i livelli di mRNA. Considerando inoltre la maggiore rappresentatività dello studio di Tissue Array e l'elevata frequenza di espressione osservata, si può quindi assegnare ad IGF-1R il ruolo di potenziale bersaglio terapeutico nel sarcoma di Ewing.



**Figura 4.** Analisi del valore prognostico dell'espressione di IGF-1R in (A) RealTime PCR; (B) Microarray, esempio di probe significativo; (C) Microarray, esempio di probe non significativo; (D) Tissue Array. (---: alto esponenti; ---: basso esponenti). (Log-rank test)

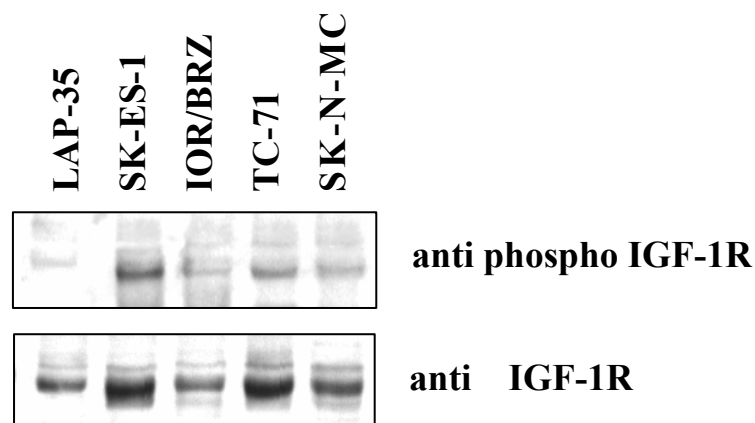
# STUDIO DI UN INIBITORE TIROSIN-CHINASICO SPECIFICO PER IGF-1R

Lo studio seguente è stato condotto utilizzando un inibitore tirosin-chinasico derivato dalle pirrolo [2,3*d*] pirimidine, sviluppato recentemente da Novartis Pharma, NVP-AEW541. Il farmaco mostra una selettività 10-50 volte superiore per IGF-1R rispetto a InsR mediante saggi cellulari di autofosforilazione.

## ATTIVAZIONE BASALE DI IGF-1R *IN VITRO*

Il recettore IGF-1R risulta essere sempre espresso sia in campioni prelevati da pazienti affetti da sarcoma di Ewing sia nelle linee cellulari comunemente utilizzate in studi *in vitro*. Prima di procedere alla caratterizzazione del ruolo biologico dell'inibitore tirosin-chinasico IGF-1R specifico NVP-AEW541, si è voluto quindi valutare lo stato di attivazione basale del recettore in alcune linee cellulari selezionate per lo studio.

Le cellule sono state cresciute in normale terreno di crescita e, mediante western blotting, è stato valutato lo stato fosforilativo del recettore, indice dell'attività dello stesso. Come si può osservare in figura 5, tutte le linee cellulari esprimono livelli elevati di IGF-1R con un'attivazione basale sempre presente e che risulta essere proporzionale all'espressione del recettore stesso.

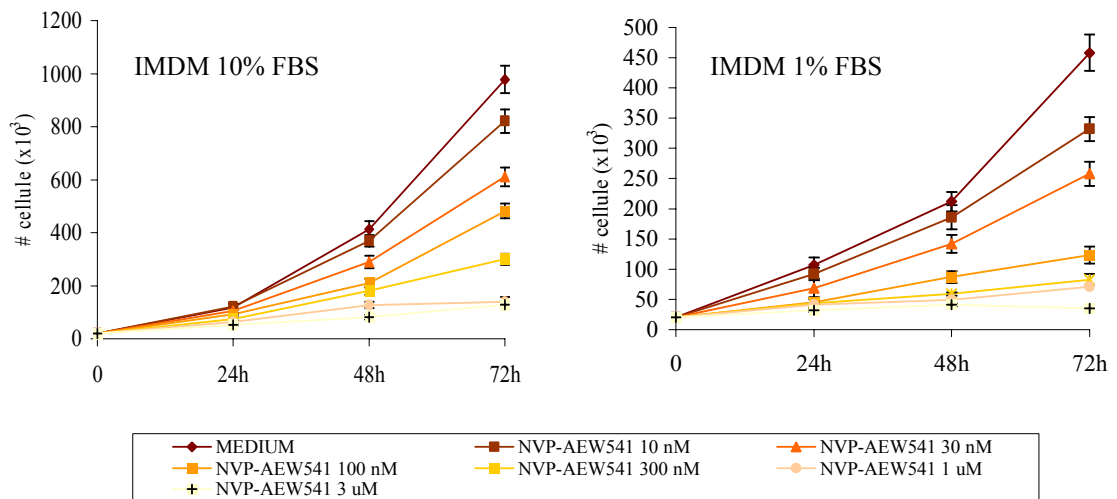


**Figura 5.** Analisi della fosforilazione costitutiva di IGF-1R in un pannello rappresentativo di linee cellulari di sarcoma di Ewing.

# EFFETTO DI NVP-AEW541 SULLA CRESCITA *IN VITRO*

## Crescita in monostrato

Al fine di determinare le migliori condizioni di azione del farmaco, si è inizialmente effettuato uno studio di proliferazione sia in presenza di normale terreno di crescita (IMDM 10% FBS) che in presenza di basso siero (IMDM 1% FBS). A tale scopo, le cellule TC-71 sono state trattate con dosi crescenti di NVP-AEW541 (0.01 - 3  $\mu$ M). L'inibizione della crescita è stata osservata sia in condizioni di basso siero che in normale terreno di crescita, con un andamento dose dipendente sovrapponibile tra le due condizioni di crescita (Figura 6).



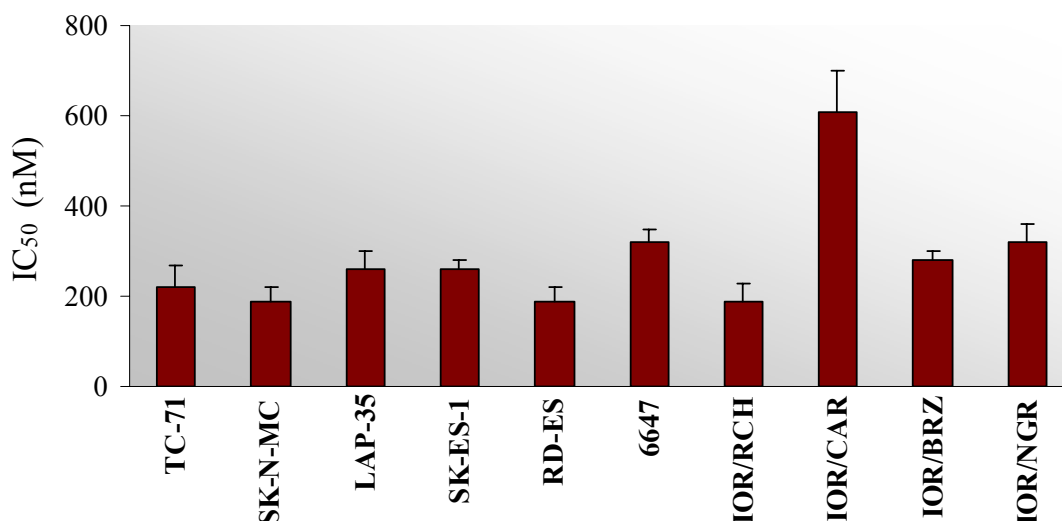
**Figura 6.** Effetto di NVP-AEW541 sulla crescita in monostrato di cellule TC-71 in presenza di alto o basso siero.

Gli studi biologici su linee cellulari di sarcoma di Ewing prevedono normalmente l'utilizzo di un terreno contenente 10% FBS tale da mimare le condizioni di crescita che le cellule tumorali ritrovano *in vivo*, ossia la presenza di un cocktail di diversi fattori di crescita. Considerando che NVP-AEW541 è in grado di inibire analogamente la proliferazione cellulare sia in terreno contenente 10% FBS che in presenza di basso siero, tutti gli esperimenti successivi sono stati condotti in terreno di coltura standard.

Per valutare l'efficacia del farmaco *in vitro*, l'effetto citotossico di NVP-AEW541 è stato valutato su un pannello di 10 linee cellulari di sarcoma di Ewing dopo esposizione continuativa al farmaco per 72h.

In figura 7 sono rappresentati i valori di IC<sub>50</sub> ottenuti, ossia della dose di farmaco in grado di inibire il 50% della crescita cellulare rispetto al controllo non trattato. Le

linee cellulari analizzate mostrano una sensibilità elevata a NVP-AEW541 con valori di  $IC_{50}$  compresi tra 190 nM (SK-N-MC, RD-ES e IOR/RCH) e 610 nM (IOR/CAR) e un valore medio di circa 280 nM, molto inferiore ai valori medi osservati nel caso di linee di osteosarcoma ( $3,10 \pm 0,36 \mu\text{M}$ ) e rhabdomiosarcoma ( $1,06 \pm 0,13 \mu\text{M}$ ).



**Figura 7.** Valori di  $IC_{50}$  di NVP-AEW541 su un pannello di linee di sarcoma di Ewing, calcolati dopo 72h di trattamento.

I risultati ottenuti sono stati quindi confrontati con i dati di inibizione precedentemente conseguiti con l'utilizzo di un anticorpo neutralizzante IGF-1R ( $\alpha\text{IR-3}$ ) che blocca in modo specifico la segnalazione intracellulare IGF-1R dipendente. In tutte le linee cellulari utilizzate, l'efficacia di NVP-AEW541 a concentrazione di 300 nM è risultata paragonabile a quella del anticorpo  $\alpha\text{IR-3}$  a concentrazione di  $1\mu\text{g/ml}$ , dose generalmente applicata negli studi *in vitro*.

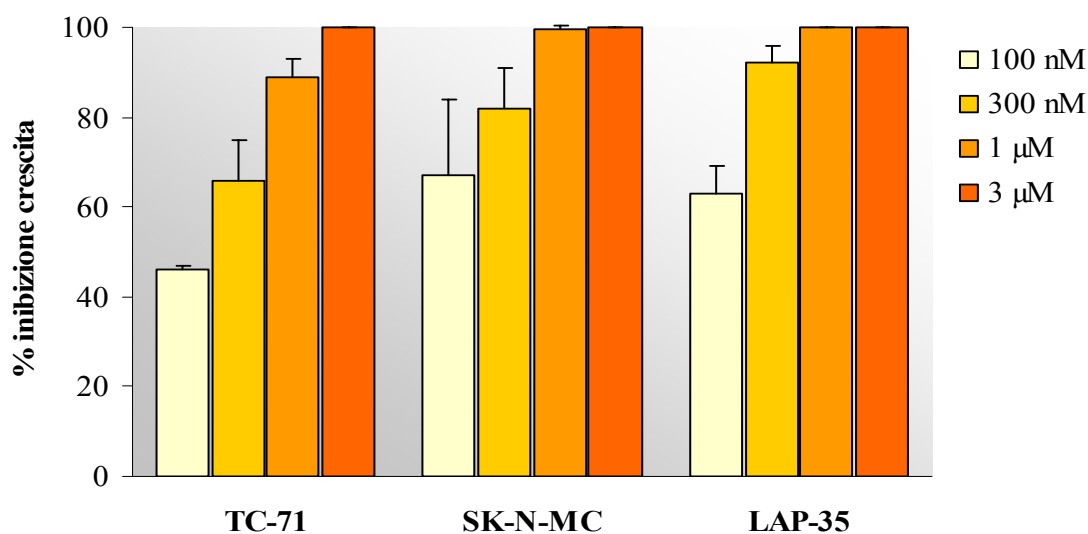
### **Crescita in assenza di ancoraggio**

La capacità delle cellule di crescere in condizione d'indipendenza da ancoraggio è considerata un criterio di valutazione dell'attività trasformante e dell'aggressività di una linea tumorale. La crescita in soft-agar in presenza di differenti dosi di NVP-AEW541 è stata valutata su 3 linee cellulari di sarcoma di Ewing rappresentative (LAP-35, SK-N-MC e TC-71). I dati mostrano come l'inibitore sia in grado di indurre una riduzione significativa della capacità di formare colonie in soft-agar già alla dose di 100 nM (inibizione del 50%) portando ad un'inibizione totale con la dose di  $1\mu\text{M}$ , nel caso di LAP-35 e SK-N-MC, e di  $3\mu\text{M}$ , nel caso di TC-71 (Figura 8).

Il farmaco NVP-AEW541 ha dimostrato una maggiore efficacia nell'inibire la crescita in condizioni d'indipendenza d'ancoraggio rispetto al monostato, risultato



legato al maggior ruolo di IGF-1R nella trasformazione cellulare piuttosto che nella proliferazione cellulare.



**Figura 8.** Effetto di NVP-AEW541 sulla capacità di crescita in condizione di indipendenza d'ancoraggio di un pannello di linee cellulari di sarcoma di Ewing.

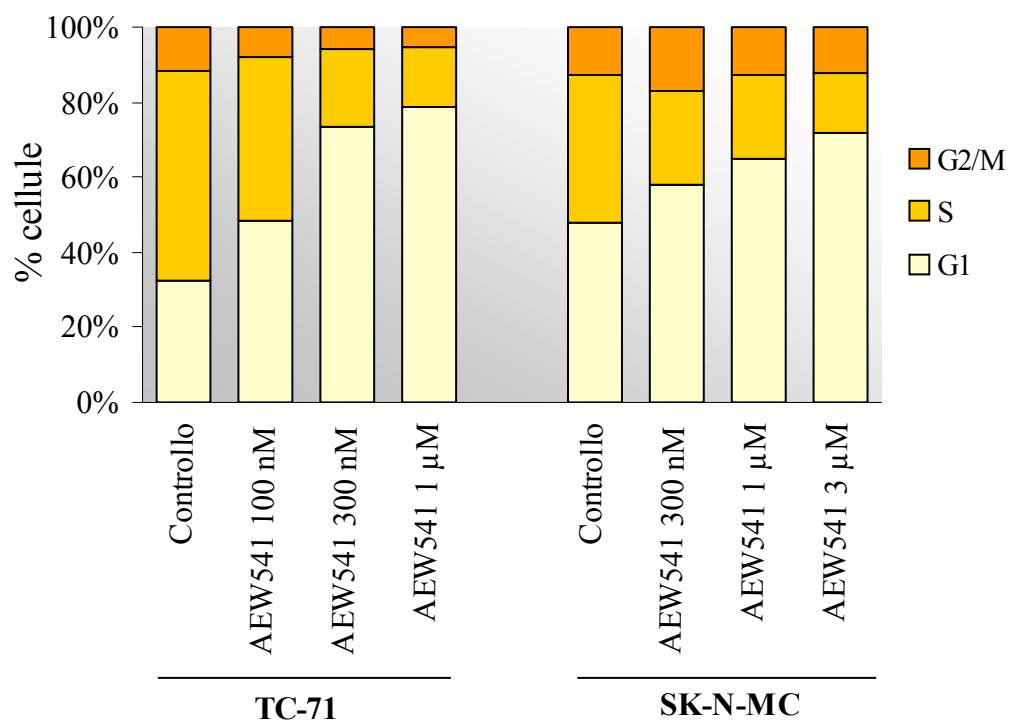
### Analisi del ciclo cellulare

Per spiegare i meccanismi alla base del rallentamento della proliferazione indotto dal trattamento con NVP-AEW541 si è valutato l'effetto del farmaco sulla progressione del ciclo cellulare mediante test di incorporazione della Bromo-desossi-Uridina. La figura 9A mostra i dati ottenuti sulle linee cellulari TC-71 e SK-N-MC. NVP-AEW541 inibisce la progressione del ciclo cellulare in maniera dose dipendente, inducendo un arresto in fase G<sub>1</sub>, in entrambe le linee cellulari testate.

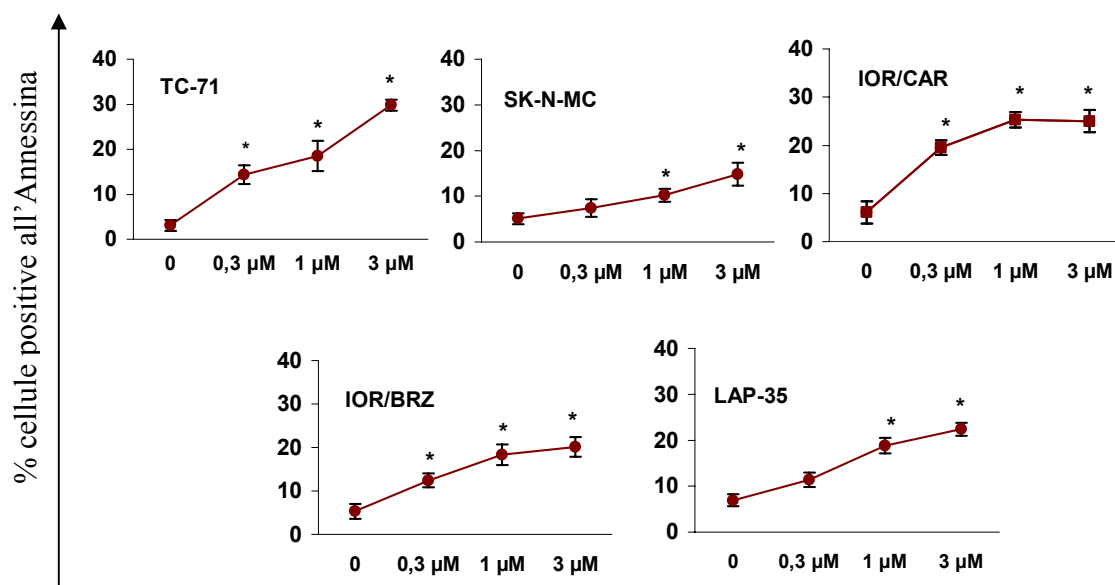
### Apoptosi

La valutazione del processo apoptotico è stata effettuata sia mediante osservazione morfologica e conta dei nuclei apoptotici marcati con Hoechts 33258 che mediante test dell'annessina. Quest'ultimo permette una discriminazione tra fase precoce e fase tardiva dell'apoptosi grazie alla doppia marcatura con annessina-FITC, che riconosce i residui di fosfatidilserina esposti sulla membrana all'inizio del processo apoptotico, e con ioduro di propidio, in grado di marcare sia cellule necrotiche che cellule in fase apoptotica tardiva.

Entrambe i test, hanno evidenziato l'induzione di apoptosi, dose-dipendente, con un aumento sempre significativo in seguito a trattamento con NVP-AEW541 1 μM e 3 μM, come evidenziano i dati di positività all'annessina mostrati in figura 9B.



A



B

**Figura 9.** Effetto di NVP-AEW541 sul ciclo cellulare (A) e sull'apoptosi (B) di linee cellulari di sarcoma di Ewing dopo 24h di trattamento. \*,  $p < 0.05$ , Student's  $t$  test

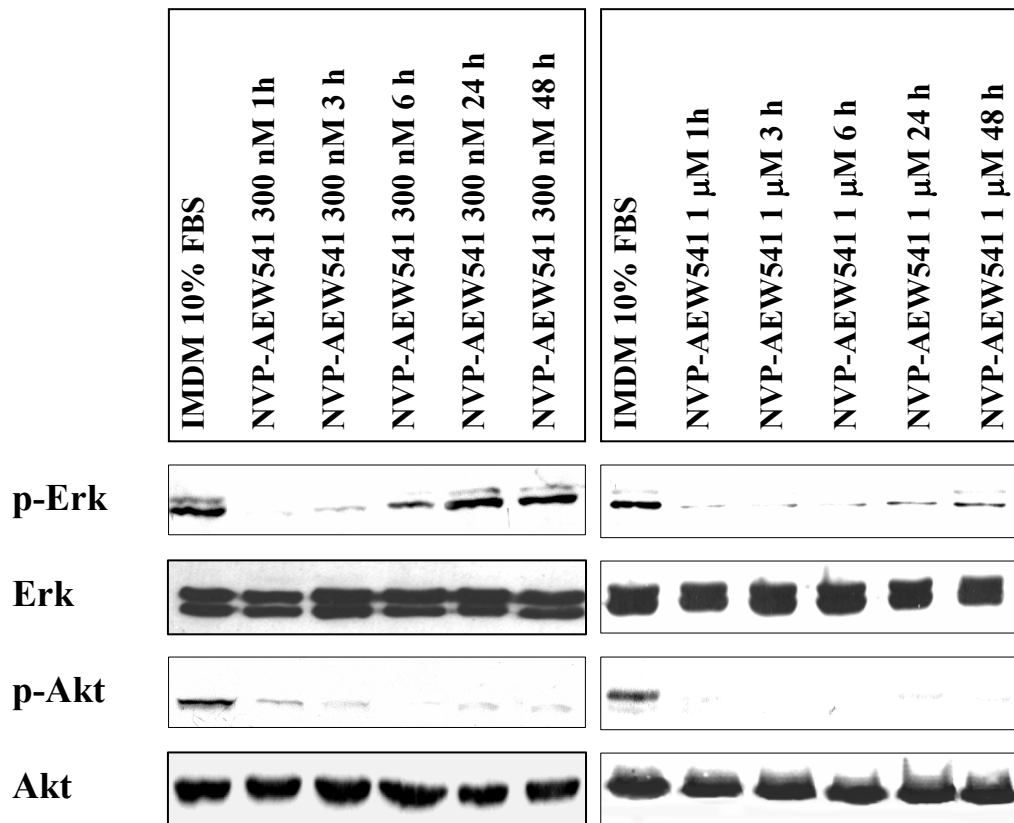
## EFFETTO DI NVP-AEW541 SULLE VIE DI SEGNALAZIONE MEDIATE DA IGF-1R

La cascata di trasduzione del segnale dipendente dall'attivazione di IGF-1R si avvale principalmente di due vie di segnalazione: MAPK e PI3K. Al fine di definire lo schema di trattamento per un farmaco è fondamentale analizzare la durata dell'effetto inibitorio. E' stato quindi effettuato un esperimento di *time course* sulla linea cellulare TC-71 allo scopo di valutare l'effetto nel tempo di NVP-AEW541 su Erk1/2 (MAPK) e Akt (PI3K). L'analisi effettuata mediante western blotting ha evidenziato, per la dose di 300 nM, un'inibizione transitoria della fosforilazione di Erk1/2 con un effetto massimo tra 1h e 3h di trattamento, a cui segue un recupero dell'attività del mediatore che risulta completamente ristabilita a 48h dall'inizio del trattamento. Lo stesso esperimento condotto con la dose di 1  $\mu$ M, molto superiore alla dose di IC<sub>50</sub>, ha evidenziato una maggiore stabilità nell'inibizione. Si osserva infatti un lieve recupero dell'attività di Erk1/2 a partire dalle 24h con un ulteriore lieve incremento dopo 48h. Tale fosforilazione è comunque significativamente inferiore a quella dei controlli (Figura 10A).

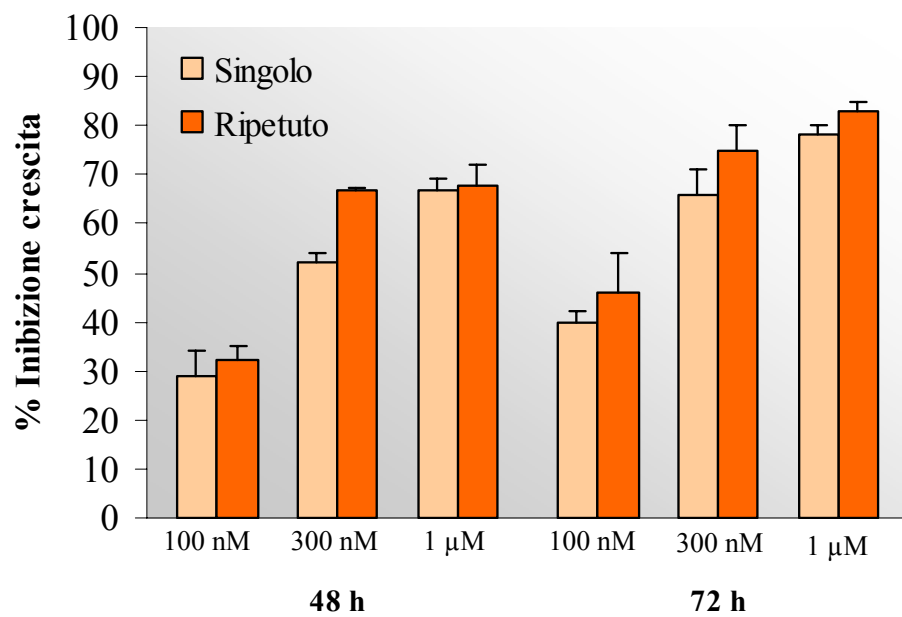
Effetto diverso si osserva invece analizzando Akt. L'inibizione della fosforilazione di Akt da parte di NVP-AEW541 si mantiene infatti costante per tutto il periodo di trattamento (1-48h) sia con la dose 300 nM che con la dose 1  $\mu$ M (Figura 10A).

Considerando la transitorietà dell'effetto inibitorio sulla fosforilazione di Erk1/2, mediatore del segnale proliferativo, mediante test di citotossicità *in vitro* è stata confrontata la risposta proliferativa cellulare a somministrazione singola piuttosto che ripetendo giornalmente la somministrazione del farmaco. I dati in figura 10B evidenziano come non ci siano differenze tra i due schemi di somministrazione. E' quindi ipotizzabile che l'inibizione stabile di Akt sia sufficiente a ridurre la capacità proliferativa di cellule TC-71.

NVP-AEW541 agisce bloccando l'attivazione intracellulare del recettore indipendentemente dalla presenza di segnali esterni. Le cellule di sarcoma di Ewing sono caratterizzate da un circuito autocrino IGF-I/IGF-1R che rende costantemente attivata tale via di segnalazione. Ci si è quindi chiesti se la presenza di IGF-I esogeno potesse essere in grado di revertire l'effetto inibitorio di NVP-AEW541 su queste cellule. A tale scopo la linea cellulare TC-71 è stata pretrattata per 2 ore col farmaco (300 nM e 1  $\mu$ M) e successivamente stimolata con IGF-I (50 ng/ml) per 5 o 30 minuti. Il tempo di pretrattamento è stato scelto considerando i dati precedentemente illustrati: si ha infatti che dopo 2 ore sia Erk1/2 che Akt risultano essere inibiti. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in totale assenza di siero.



**A**



**B**

**Figura 10.** (A) Effetto tempo dipendente (1–48h) di NVP-AEW541 (300 nM e 1 μM) sull'attivazione costitutiva di Erk1/2 e Akt. (B) Effetto di NVP-AEW541 sulla capacità proliferativa dopo trattamento singolo o ripetuto ogni 24h. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati sulla linea cellulare TC-71.

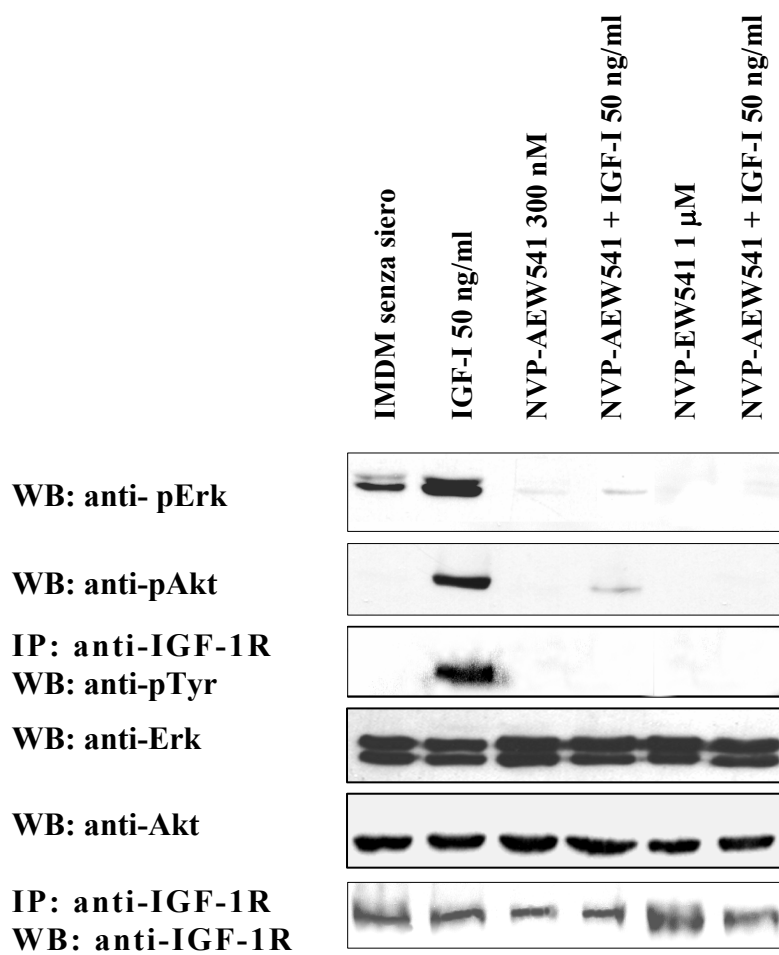
La figura 11A evidenzia come in IMDM senza siero si possa osservare una debole fosforilazione solo per Erk1/2 mentre Akt e IGF-1R risultano essere completamente inattivi. La stimolazione con IGF-I è in grado di indurre una risposta molto elevata per tutte e tre le molecole considerate. Il trattamento con NVP-AEW541, sia 300 nM che 1  $\mu$ M, blocca completamente l'attività di IGF-1R, Erk1/2 e Akt, attività che la stimolazione con IGF-I non è in grado di ripristinare se non debolmente nel caso di trattamento con NVP-AEW541 300 nM, ad eccezione di IGF-1R.

La non responsività ad IGF-I in presenza di NVP-AEW541 è stata ulteriormente confermata da studi di proliferazione *in vitro*, trattando le cellule TC-71 con dosi di farmaco di 300 nM e 1  $\mu$ M in presenza o in assenza di IGF-I 50 ng/ml. L'aggiunta di IGF-I al terreno di coltura non è in grado di compensare l'effetto antiproliferativo di NVP-AEW541 come dimostrato dalle percentuali di inibizione della crescita mostrate in figura 11B.

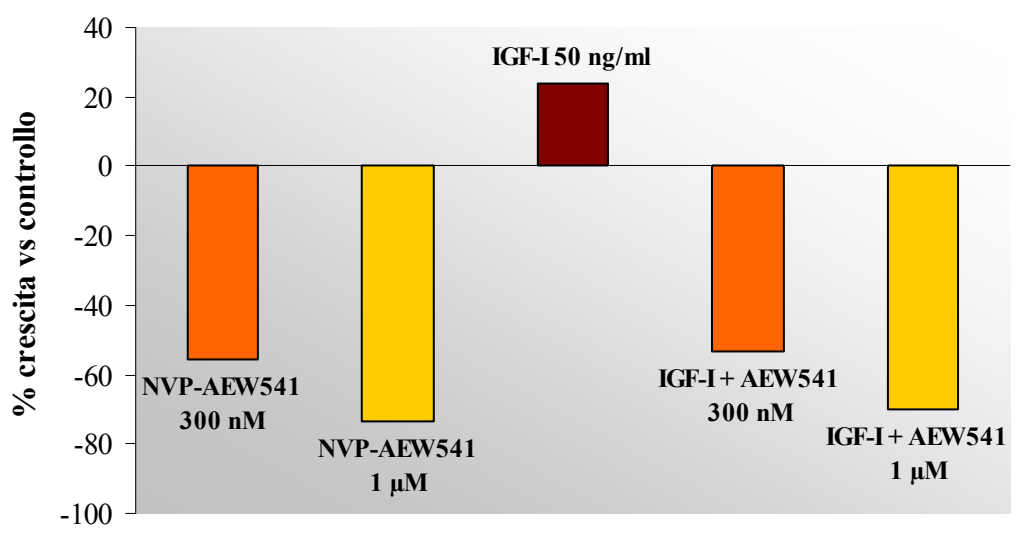
Ciò dimostra come l'azione di NVP-AEW541 sul dominio tirosin-chinasico del recettore sia sufficiente ad inibirne l'attività indipendentemente dal blocco del legame del fattore al recettore, azione esplicata da altri approcci inibitori quali ad esempio l'anticorpo  $\alpha$ IR-3.

## **TRATTAMENTO COMBINATO DI NVP-AEW541 CON CHEMIOTERAPICI CONVENZIONALI *IN VITRO***

La terapia del sarcoma di Ewing prevede attualmente la combinazione di una serie di farmaci quali Vincristina (VCR), Ifosfamida (IFO), Actinomicina-D (ACT-D), Doxorubicina (DXR) e Cis-platino (CDDP). Al fine di utilizzare in terapia i chemioterapici convenzionali in associazione con i nuovi farmaci bersaglio specifici è necessario definire la migliore combinazione possibile tra queste due categorie farmacologiche. A tal fine sono stati condotti esperimenti in cui dosi diverse di chemioterapico sono state utilizzate in combinazione con una dose di NVP-AEW541 (100 nM) sufficiente ad inibire la crescita cellulare del 20-25% circa. Il trattamento simultaneo dell'inibitore tirosin-chinasico con VCR, ACT-D o IFO ha evidenziato un significativo aumento dell'inibizione della crescita cellulare rispetto al trattamento col singolo chemioterapico con un effetto sinergico tra NVP-AEW541 e il farmaco usato. Al contrario, il trattamento combinato di NVP-AEW541 con DXR o CDDP induce un effetto citotossico subadditivo rispetto al trattamento con i singoli farmaci (Figura 12).

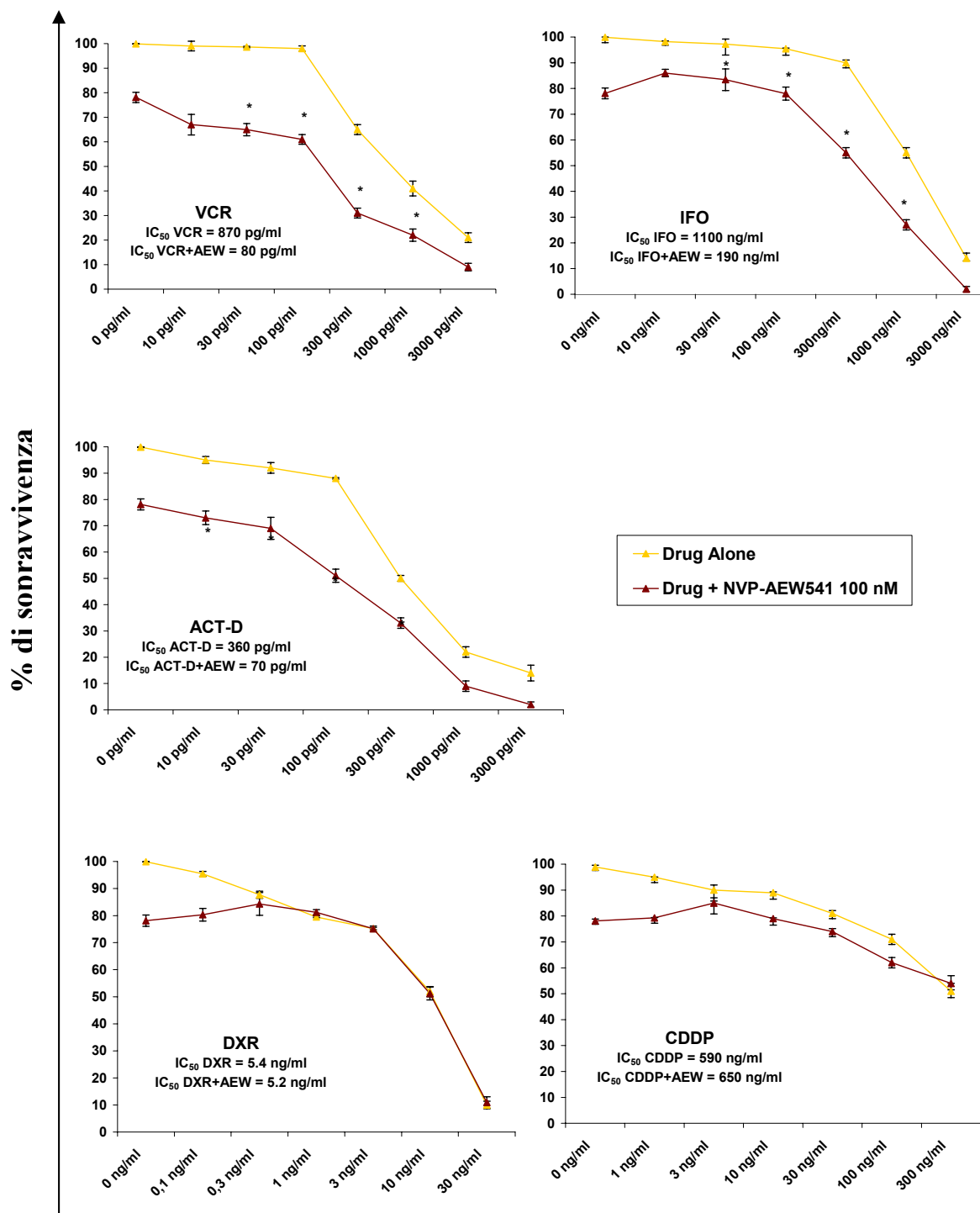


A



B

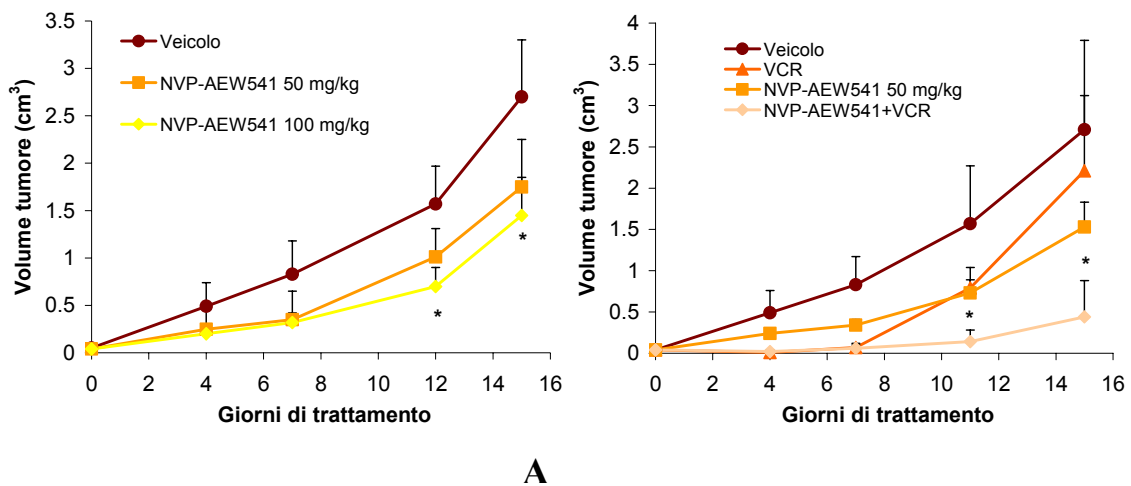
**Figura 11.** Effetto di NVP-AEW541 sull'attivazione del recettore e sulla crescita indotti da IGF-I. (A) Valutazione dello stato fosforilativo di IGF-1R, Akt e Erk1/2 in seguito a stimolazione con IGF-I dopo 2h di pretrattamento con NVP-AEW541 (300 nM e 1  $\mu$ M) in cellule TC-71. (B) Inibizione della crescita della linea cellulare TC-71 dopo 48h di trattamento con NVP-AEW541 in presenza o assenza di IGF-I (50 ng/ml).



**Figura 12.** Effetto inibitorio di doxorubicina, cisplatino, vincristina, actinomicina D o ifosfamide sulla crescita di cellule TC-71 dopo trattamento singolo o in combinazione con NVP-AEW541 (100 nM). Valore  $\pm$  SE. \*,  $p < 0.05$ , Student's *t* test.

## ANALISI DEGLI EFFETTI *IN VIVO* DI NVP-AEW541 SU CAPACITA' TUMORIGENICA

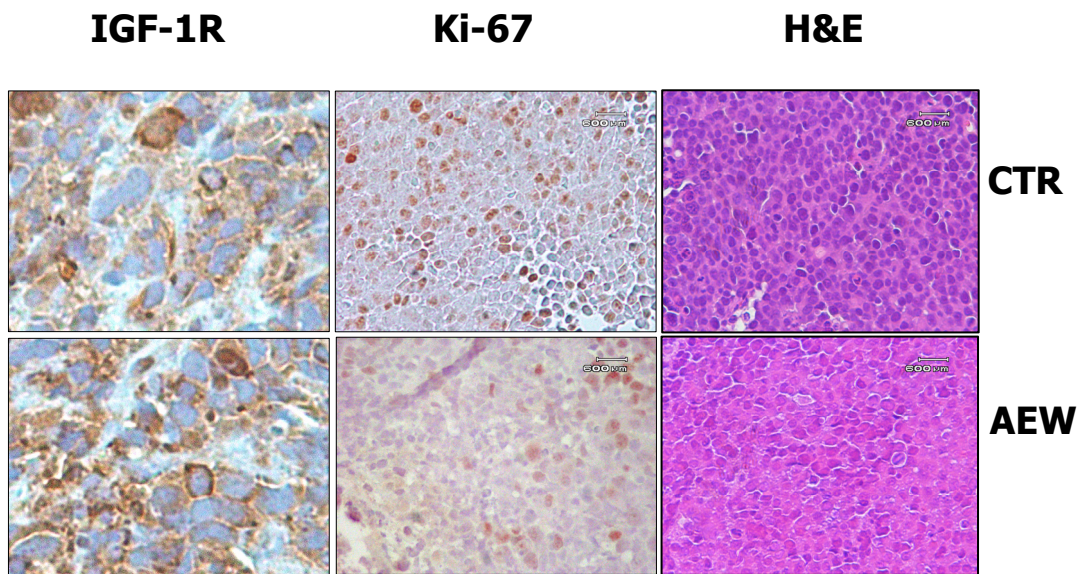
La ridotta capacità proliferativa di cellule di sarcoma di Ewing in seguito a trattamento con NVP-AEW541 ha portato allo studio degli effetti di tale farmaco *in vivo*. Topi atimici di età compresa tra 4 e 5 settimane sono stati inoculati sottocute con cellule TC-71 e trattati con NVP-AEW541, VCR o combinazione dei due farmaci. Il trattamento con NVP-AEW541 (50 mg/kg) ha indotto una riduzione della massa tumorale rispetto al controllo con un effetto leggermente superiore nel caso della dose 100 mg/kg (Figura 13A). Nel caso di impiego di VCR si è registrato un effetto maggiore seppure per un periodo più ristretto: dopo i primi giorni di trattamento il volume del tumore ha ricominciato a crescere raggiungendo quello dei controlli alla fine del trattamento. Il trattamento combinato dei due farmaci ha portato ad una riduzione significativa della massa tumorale, con un effetto costante per tutto il periodo di trattamento (Figura 13B).



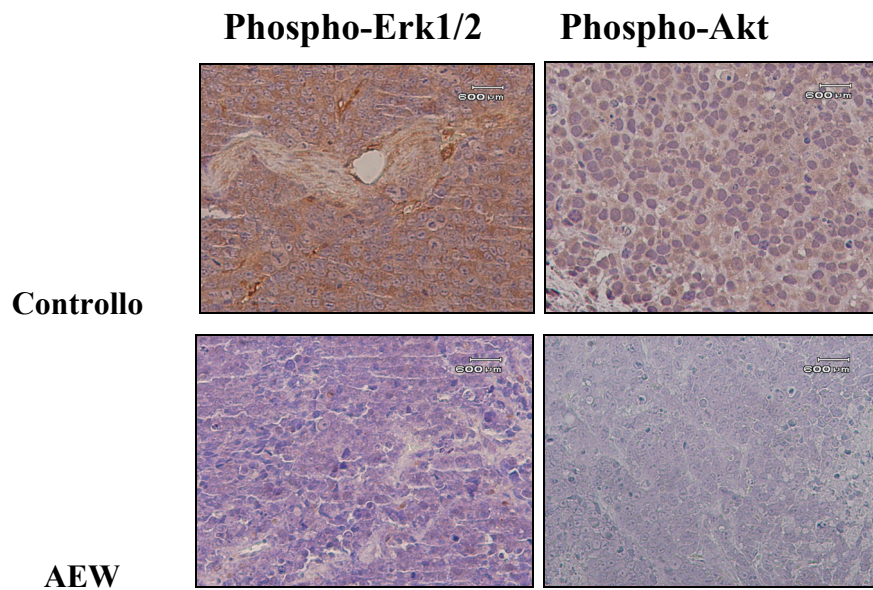
**Figura 13.** Effetto di NVP-AEW541 sulla crescita tumorale in topi nudi inoculati s.c. con cellule di sarcoma di Ewing TC-71. Valutazione dell'effetto dose risposta (A) e dell'effetto in combinazione con VCR (B).

Contrariamente a quanto osservato con l'uso di anticorpi monoclonali diretti contro IGF-1R, l'utilizzo di inibitori tirosin-chinasici non comporta la down-regolazione del recettore come è osservabile dalla figura 14A. L'effetto di NVP-AEW541 sembra quindi riconducibile all'inibizione di Erk1/2 e Akt, principali mediatori della cascata di trasduzione del segnale di IGF-1R (Figura 14B). La mancata riduzione dell'espressione dei IGF-1R associata ad un calo della positività per Ki-67 possono spiegare l'effetto citostatico piuttosto che citotossico del farmaco. Numerosi studi evidenziano infatti come il processo apoptotico sia dipendente dalla down-regolazione del recettore.





**A**



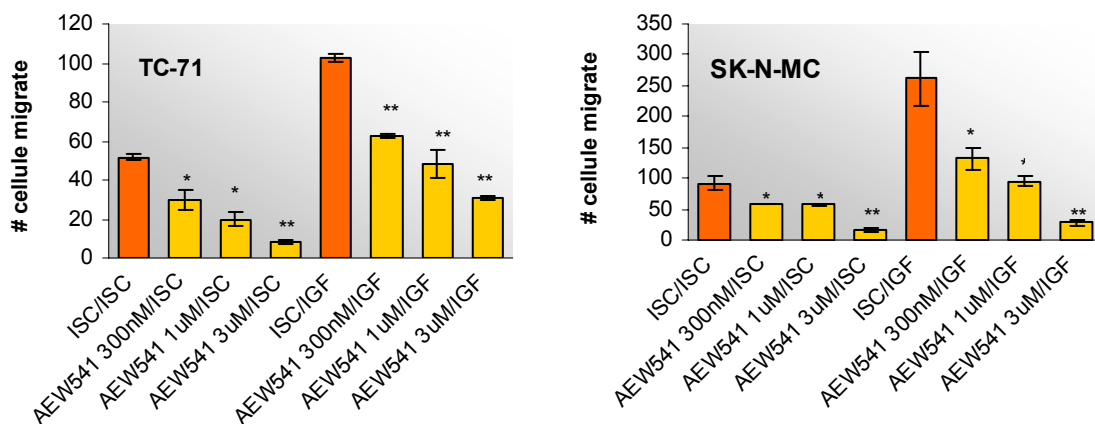
**B**

**Figura 14.** Valutazione mediante immunistochemica dell'espressione di IGF-1R e Ki-67 (A) e dello stato fosforilativo di Erk1/2 e Akt (B) in topi nudi inoculati s.c. con cellule di sarcoma di Ewing TC-71 trattati o meno con NVP-AEW541.

## EFFETTO DI NVP-AEW541 SULLA MIGRAZIONE *IN VITRO* E SULLA CAPACITA' METASTATICA *IN VIVO*

La migrazione cellulare è fondamentale nella formazione di metastasi, la cui presenza alla diagnosi o l'insorgenza successiva è un problema rilevante nei pazienti affetti da sarcoma di Ewing. Va sottolineato inoltre come l'attivazione di IGF-1R da parte di IGF-I sia in grado di stimolare il processo migratorio. E' quindi importante che un farmaco inibente IGF-1R sia in grado di modulare anche questa funzione del recettore.

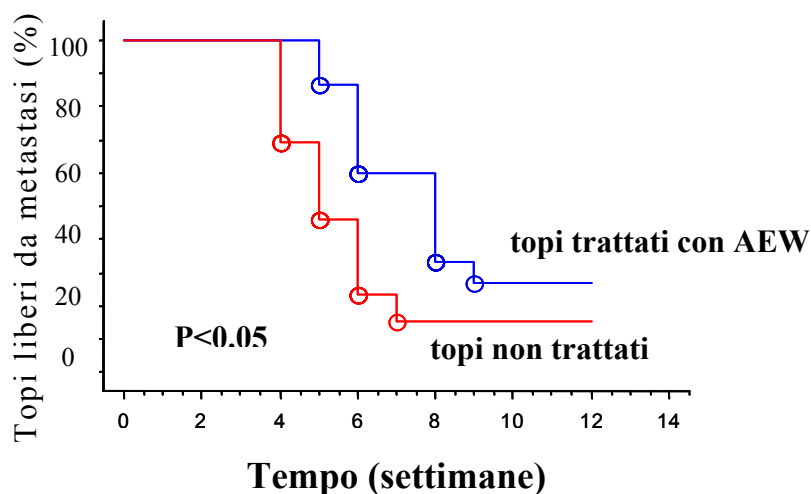
Studi di migrazione sono stati condotti sulle linee cellulari TC-71 e SK-N-MC mediante camere di Boyden. Le cellule sono state seminate in IMDM 10% FBS in presenza di dosi crescenti di NVP-AEW541 (0.3-3  $\mu$ M). Nella camera sottostante è stato posto IMDM 10% FBS  $\pm$  IGF-I (50 ng/ml). Per entrambe le linee cellulari analizzate si osserva un'inibizione della migrazione dose dipendente sia in presenza che in assenza di IGF-I (Figura 15).



**Figura 15.** Effetto di NVP-AEW541 sulla capacità migratoria di cellule di sarcoma di Ewing TC-71 e SK-N-MC trattate con NVP-AEW541 in condizioni basali ed in presenza di IGF-I (50 ng/ml). Media  $\pm$  SE. \*,  $p < 0.05$ , ANOVA test rispetto al proprio controllo.

Vista la minore migrazione osservata, topi atimici sono stati inoculati i.v. al fine di valutare l'effetto di NVP-AEW541 sulla capacità metastatica di cellule TC-71. La somministrazione orale del farmaco riduce significativamente l'insorgenza di metastasi come mostrato dalla figura 16 che evidenzia una maggiore percentuale di topi liberi da metastasi rispetto ai controlli. Va poi sottolineato come qualora insorgano metastasi ossee, queste si sviluppano tardivamente rispetto ai controlli con una media di  $35 \pm 2$

giorni nel gruppo dei controlli e  $45 \pm 3$  giorni nel gruppo dei topi trattati con NVP-AEW541.



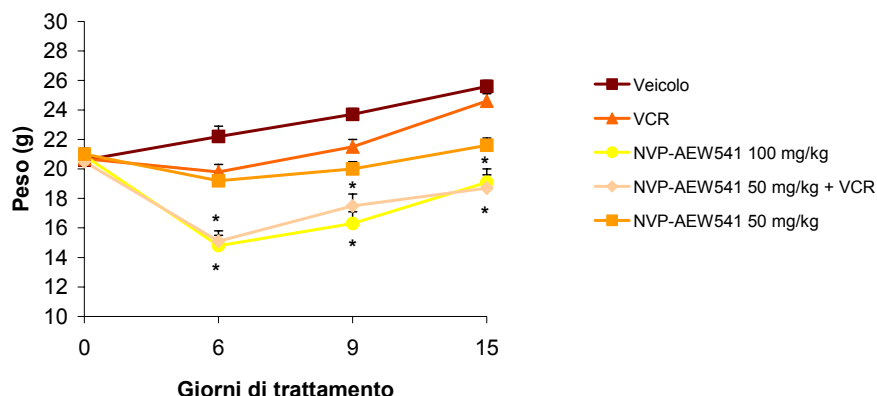
**Figura 16.** Effetto di NVP-AEW541 sulla capacità metastatica di cellule di sarcoma di Ewing TC-71 inoculate i.v. in topi atimici. \*,  $p < 0.05$ , log-rank test.

## ANALISI DEGLI EFFETTI TOSSICI *IN VIVO* DI NVP-AEW541

La riduzione della capacità tumorigenica e metastatica indotta da NVP-AEW541 rende questo specifico inibitore tirosin-chinasico un nuovo potenziale farmaco da utilizzare in clinica. Una valutazione degli effetti tossici è però necessaria. A tal fine sono stati valutati alcuni parametri clinici indicativi di sofferenza: peso corporeo nonché livelli sierici di urea, glucosio, trigliceridi e enzimi epatici sono stati misurati in un sottogruppo dei topi trattati.

Un dimagrimento è stato osservato nei topi trattati con NVP-AEW541 100 mg/kg e nei topi trattati con la combinazione NVP-AEW541 50 mg/kg + VCR rispetto ai controlli. Dopo il calo di iniziale peso, i topi hanno però ricominciato a crescere con andamento analogo ai controlli (Figura 17).

Per quel che riguarda le analisi del sangue, non sono state riscontrate né sofferenze epatiche né modifiche nei livelli di trigliceridi con nessuno dei trattamenti applicati. Si è osservato invece un incremento dei livelli di urea, simile però a quello osservato in seguito a trattamento con vincristina (Tabella 3).



**Figura 17.** Valutazione del peso corporeo in topi inoculati s.c. e trattati con NVP-AEW541 (50 o 100 mg/kg), VCR o combinazione dei 2 farmaci. \*,  $p < 0.05$ , ANOVA test.

Particolare attenzione è stata rivolta alla valutazione del glucosio ematico. Vista l'elevata omologia tra IGF-1R e InsR, NVP-AEW541 potrebbe indurre un effetto diabetogenico aspecifico, inibendo non solo l'attività di IGF-1R ma anche di InsR. Al contrario, il trattamento con NVP-AEW541 ha portato ad una significativa riduzione dei livelli ematici di glucosio rispetto ai controlli, analoga al calo osservato in seguito a trattamento con VCR, farmaco già usato nella terapia del sarcoma di Ewing

**Tabella 3: Analisi ematologiche di topi trattati con NVP-AEW541 o VCR**

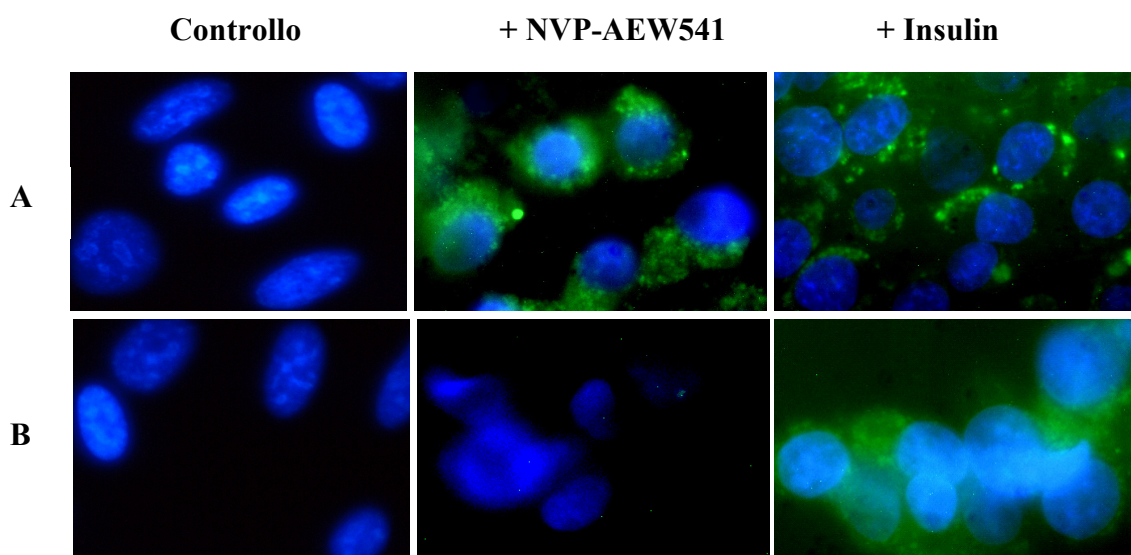
	Urea (mg/dL)	Glucosio (mg/dL)	Trigliceridi (mg/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
<b>Controllo</b>	49 ± 4	77 ± 12	97 ± 21	94 ± 33	29 ± 7
<b>NVP-AEW541 (50 mg/kg)</b>	76 ± 9*	34 ± 8*	97 ± 22	106 ± 15	22 ± 16
<b>VCR</b>	74 ± 16	20 ± 18	149 ± 24	169 ± 23	24 ± 10

NOTE: Analisi dopo una settimana dall'inizio del trattamento. (Media ± SE) \* $P \leq 0.05$ , Student's *t* test  
AST: aspartato aminotransferasi; ALT: alanina aminotransferasi

## MODULAZIONE DELL'UP-TAKE DI GLUCOSIO *IN VITRO* DOPO TRATTAMENTO CON NVP-AEW541

Considerato il calo dei livelli sierici di glucosio osservati *in vivo* in seguito a trattamento con NVP-AEW541, si è voluto valutare l'effetto di tale farmaco sul metabolismo del glucosio in sistemi cellulari *in vitro*. E' stato quindi condotto un esperimento di *up-take* del glucosio utilizzando un suo analogo fluorescinato e analizzandone quindi la localizzazione in seguito a trattamento con NVP-AEW541 e/o

insulina, utilizzata come controllo positivo della regolazione dell'*up-take* di glucosio. Come ulteriore controllo è stata inserita la linea cellulare SK-BR-3 che esprime InsR ma non IGF-1R. Nel caso della linea cellulare di sarcoma di Ewing TC-71, l'*up-take* del glucosio è stato osservato sia in seguito a trattamento con NVP-AEW541 sia con insulina. Le cellule SK-BR-3 sono invece state in grado di internalizzare il glucosio solo in risposta a stimolo da insulina (Figura 18). Questi dati evidenziano come il calo del glucosio ematico sia direttamente imputabile all'azione di NVP-AEW541 su IGF-1R e non ad effetti aspecifici del farmaco diretti contro InsR.



**Figura 18.** Analisi dell'*up-take* di glucosio in seguito a trattamento per 1h con NVP-AEW541 (300 nM) o insulina (50 ng/ml) in cellule TC-71 (A), esprimenti sia InsR che IGF-1R, e in cellule SK-BR-3 (B), esprimenti solamente InsR. La fluorescenza è stata rilevata in seguito ad aggiunta di fluorescence-labeled glucose analogue 6-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazl-4-yl)amino]-6-deoxyglucose.

# **ANALISI DEL SILENZIAMENTO GENICO DI IGF-1R MEDIANTE siRNA**

Lo studio comparativo di diverse tecniche inibitorie dirette contro IGF-1R, oggetto di questa tesi, ha analizzato inoltre l'effetto del silenziamento genico di tale recettore in una linea cellulare di sarcoma di Ewing. Le cellule TC-71 sono state trasfettate, mediante metodo del calcio-fosfato, col plasmide pSilencer<sup>TM</sup>-2.1-U6 neo (Ambion), contenente il gene per la resistenza alla neomicina,. Il plasmide utilizzato codifica per una sequenza siRNA diretta contro la subunità  $\alpha$  di IGF-1R.

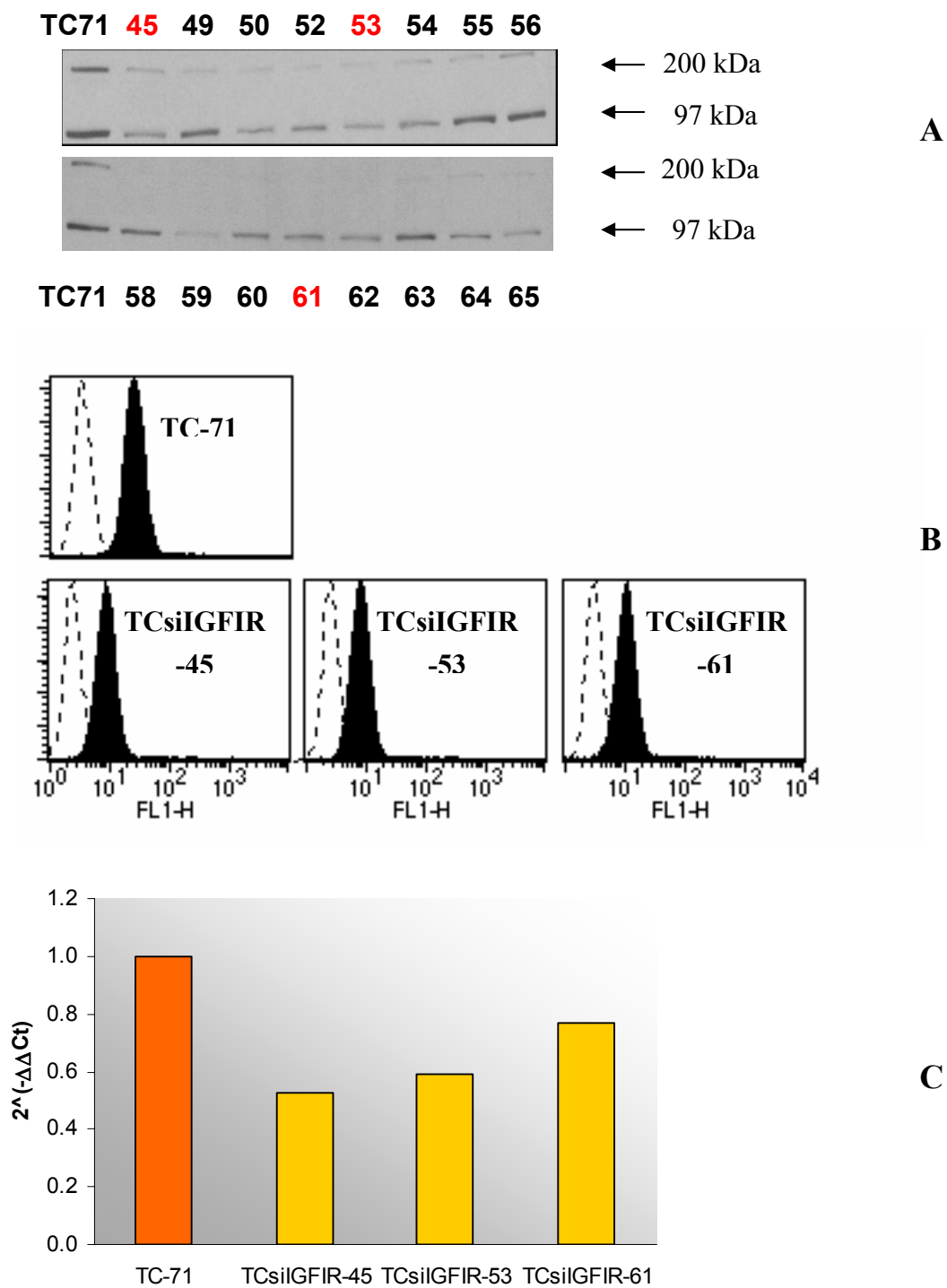
## **SELEZIONE DEI CLONI**

Il processo di selezione ha permesso di ottenere circa 100 cloni su cui è stata analizzata l'espressione proteica di IGF-1R mediante western blotting. Caratteristica comune alla maggior parte dei cloni analizzati è la down-modulazione dell'espressione del precursore di IGF-1R (200 kDa) mentre solo alcuni cloni presentano una contemporanea minor espressione del recettore maturo (97 kDa). Tra questi ultimi, ne sono stati scelti una ventina di cui è stata valutato il silenziamento genico, mediante RealTime PCR, nonché l'espressione in membrana del recettore, vero sito funzionale di IGF-1R.

In figura 19, si possono osservare i dati di espressione proteica nei lisati cellulari, mediante western blotting (A), sulla membrana plasmatica mediante analisi citofluorimetrica (B) e di espressione genica mediante RealTime PCR (C) relativi ai 3 cloni selezionati per i successivi studi funzionali: TCsiIGFIR-45, TCsiIGFIR-53 e TCsiIGFIR-61.

L'analisi complessiva dei dati mostra una maggiore down modulazione di IGF-1R a livello proteico, come evidenziato dall'analisi citofluorimetrica e di western blotting, piuttosto che del gene *IGF-1R*. A livello di mRNA si ha infatti un silenziamento massimo del 45-50% contro il 70% osservato nell'analisi citofluorimetrica.





**Figura 19.** Analisi dell'espressione di IGF-1R nei cloni TCsiIGFIR selezionati. Valutazione dell'espressione proteica di IGF-1R in lisato cellulare mediante Western Blotting (A), sulla membrana mediante analisi citofluorimetrica (B) e dell'espressione genica mediante RealTime PCR (C).

## **EFFETTI DEL SILENZIAMENTO DI IGF-1R SULLA CRESCITA *IN VITRO***

IGF-I risulta essere uno dei principali fattori di crescita nel sarcoma di Ewing e l'attivazione del circuito autocrino IGF-1R/IGF-I è alla base della proliferazione di tali cellule. Al fine di valutare in maniera precisa gli effetti biologici dati dal silenziamento di IGF-1R, tutti gli studi di seguito riportati sono stati svolti sia in normale terreno di crescita (IMDM 10% FBS) che in presenza di basso siero (IMDM 1% FBS), in modo da escludere effetti derivati da altri fattori di crescita presenti nel siero.

### **Crescita in monostrato**

La crescita della linea parentale TC-71 è stata confrontata con quella dei cloni TCsiIGFIR-45, TCsiIGFIR-53 e TCsiIGFIR-61. Contrariamente a quanto riportato in letteratura, il silenziamento di IGF-1R non ha evidenziato differenze significative nella crescita dei cloni TCsiIGFIR rispetto alla linea parentale in IMDM 10% FBS (Figura 20A).

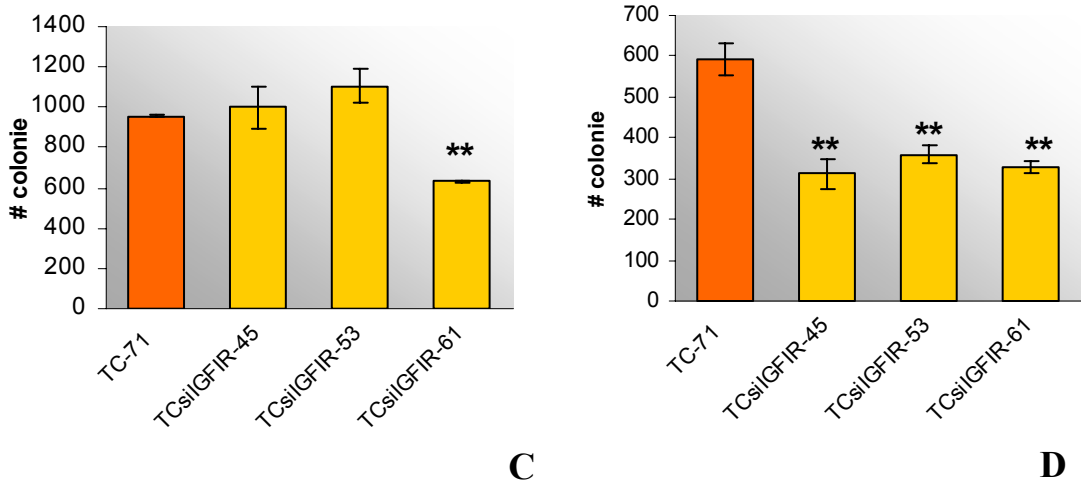
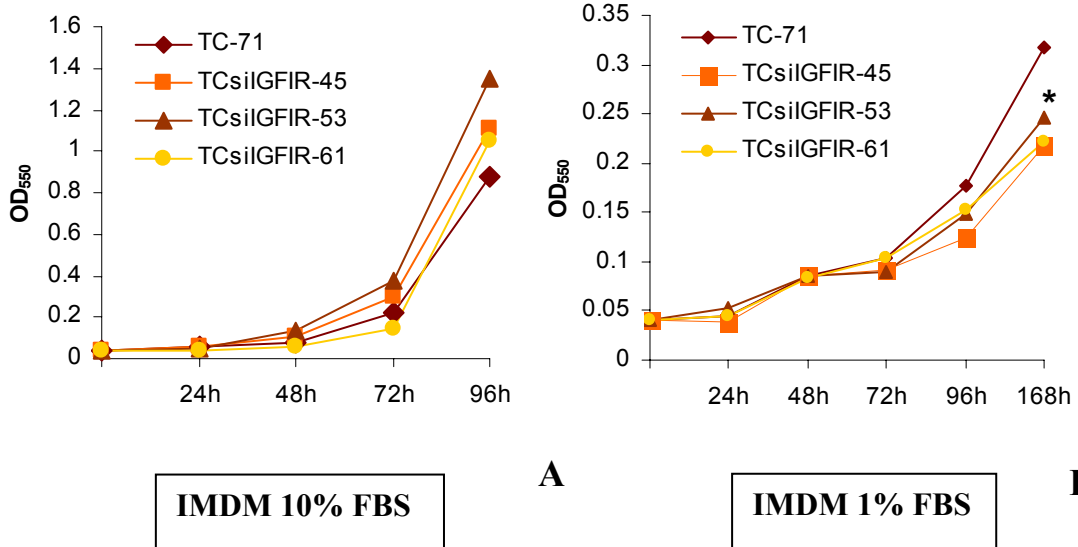
Diversi sono stati i risultati quando le cellule sono state cresciute in condizioni di basso siero. In tale situazione, tutti i cloni presentano una significativa minore capacità proliferativa con tempi di raddoppiamento che raggiungono circa le 50 ore nei trasfettanti TCsiIGFIR contro le 36 ore della linea parentale (Figura 20B).

### **Crescita in assenza di ancoraggio**

La formazione di colonie in soft-agar rappresenta un utile metodo di valutazione della capacità trasformante di cellule mantenute in coltura, essendo generalmente considerata un'evidenza di fenotipo trasformato. Analogamente a quanto osservato per la crescita in monostrato, i cloni presentano un comportamento divergente se si considerano la crescita in IMDM 10% FBS rispetto alla crescita in IMDM 1% FBS. Si ha infatti che in normale terreno di crescita tutti i cloni generano un numero di colonie non significativamente differente dalla linea parentale con la sola eccezione del clone 61 che risulta parzialmente inibito (Figura 20C). Tale clone presenta però il minor livello di silenziamento per IGF-1R ed è quindi dubbia la specificità di effetto.

Nel caso di crescita in basso siero si ha, anche in condizioni di indipendenza da ancoraggio, una forte inibizione della capacità proliferativa con un effetto analogo per tutti i cloni considerati (Figura 20D).



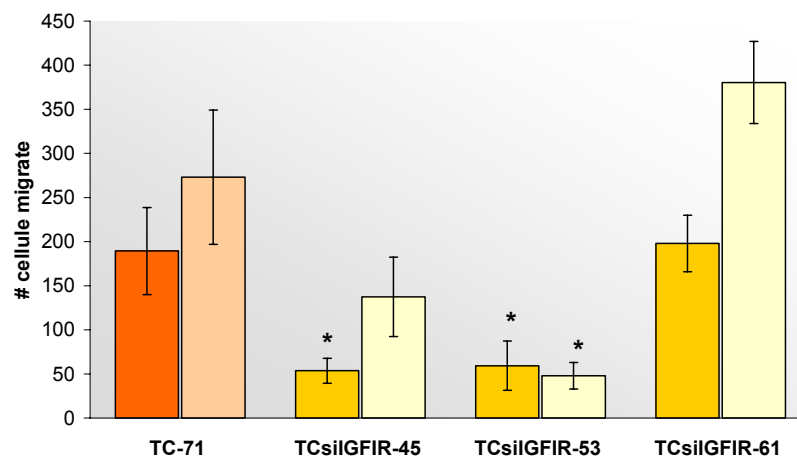


**Figura 20.** Analisi della capacità proliferativa dei cloni TCsiIGFIR in IMDM 10% FBS in monostrato (A) e in soft-agar (C) o in IMDM 1% FBS in monostrato (B) e in soft-agar (D). Media  $\pm$  SD. \*,  $p < 0.05$ , Student's *t* test.

## EFFETTO DEL SILENZIAMENTO DI IGF-1R SULLA CAPACITA' MIGRATORIA

Al fine di verificare la capacità di migrazione dei cloni TCsiIGFIR rispetto alla linea parentale TC-71 è stato utilizzato il metodo delle camere di Boyden, analogamente a quanto precedentemente descritto. E' stata analizzata sia la migrazione in condizioni basali che in seguito a stimolo chemoattraente di IGF-I. I risultati ottenuti, mostrati in figura 21, evidenziano una minore capacità migratoria dei trasfettanti 45 e 53 in condizioni basali rispetto al controllo; il clone 61, al contrario, mostra un andamento molto simile a quello della linea parentale TC-71.

La figura mostra inoltre i risultati ottenuti in presenza di IGF-I: solo il clone 53 non sembra risentire della presenza di IGF-I, confermando quindi il maggior livello di silenziamento. I cloni TCsiIGFIR-45 e TCsiIGFIR-61 presentano invece una maggiore migrazione rispetto ai risultati ottenuti in condizioni basali, risultando quindi sensibili all'azione di IGF-I. In particolare, tali cloni sembrano rispondere maggiormente all'effetto chemoattraente di IGF-I rispetto persino alla linea parentale TC-71.



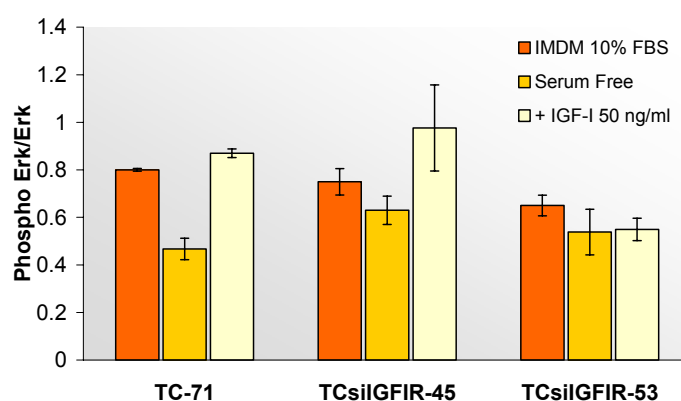
**Figura 21.** Valutazione della capacità migratoria dei cloni TCsiIGFIR rispetto alla linea parentale TC-71, in condizioni basali (sinistra) ed in presenza di IGF-I (50 ng/ml) (destra). \*,  $p < 0.05$ , Student's *t* test.

## VALUTAZIONE DELLE PRINCIPALI VIE DI SEGNALAZIONE ATTIVATE DA IGF-1R

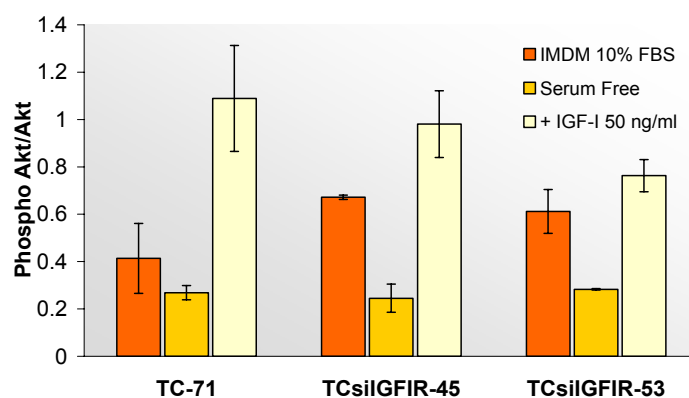
La modulazione di processi biologici quali proliferazione e migrazione è fortemente dipendente dall'attivazione di IGF-1R. Considerata l'assenza di modificazioni rilevanti nella capacità proliferativa dei cloni TCsiIGFIR in presenza di

normale terreno di crescita si è quindi valutato lo stato di fosforilazione dei principali mediatori della sua cascata di trasduzione del segnale: Erk1/2 e Akt. Mediante test Elisa è stata valutata la presenza di tali molecole sia in condizioni normali di crescita che in seguito a stimolazione con IGF-I. Tutti i dati sono stati normalizzati sul livello d'espressione della proteina e sul numero di cellule.

Per quel che riguarda il rapporto Phospho-Erk/Erk (Figura 22A), non sono state osservate differenze significative tra i cloni e la linea parentale in presenza di condizioni normali di crescita, a conferma dei dati ottenuti con gli studi di proliferazione *in vitro*. In contrasto, tutti i cloni analizzati presentano una maggiore attivazione di Akt (Figura 22B).



A



B

**Figura 22.** Valutazione dello stato di fosforilazione di Erk1/2 e Akt nella linea parentale TC71 e nei trasfettanti TCsiIGFIR in condizioni basali, in assenza di siero e dopo stimolazione con IGF-I 50 ng/ml. I valori misurati sono espressi come rapporto tra Abs phospho proteina /Abs proteina totale, normalizzati per il numero di cellule.

Per quello che riguarda la stimolazione da parte di IGF-I va innanzitutto sottolineato come la totale assenza di siero pre stimolazione (16 ore) riconduca le cellule al medesimo stato di quiescenza con un livello di fosforilazione non significativamente diverso tra linea parentale e cloni, sia per Erk1/2 che per Akt (Figura

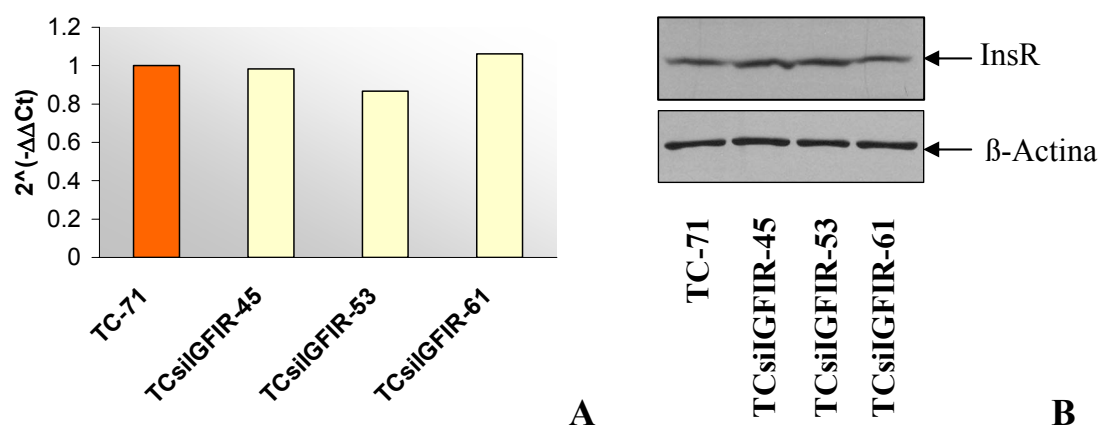
22A e 22B). La stimolazione delle cellule con IGF-I 50 ng/ml ha effetti diversi se si considerano i due mediatori. Per quel che riguarda Erk1/2, l'effetto attivatorio di IGF-I è visibile solo nel caso delle cellule TC-71 e del clone 45 che presenta una responsività ad IGF-I analoga a quella della linea parentale. Il clone 53, più silenziato, non sembra invece rispondere a tale stimolazione come già precedentemente osservato nel test di migrazione. Nel caso di Akt, la risposta del clone 45 risulta essere sovrapponibile a quella delle cellule TC-71 mentre quella del clone 53 risulta essere leggermente inferiore.

Le vie di segnalazione MAPK e PI3K non sembrano quindi essere inibite dalla minore espressione di IGF-1R. Al contrario, nel caso di Akt si osserva una up-regolazione della sua attività. E' quindi ipotizzabile che intervengano modificazioni nella regolazione di tali vie in grado di compensare il silenziamento di IGF-1R.

## EFFETTO DEL SILENZIAMENTO DI IGF-1R SUL SISTEMA DELL'InsR

### Espressione di InsR

IGF-1R presenta un'elevata omologia di sequenza, nonché strutturale, con il recettore per l'insulina (InsR). Al fine di escludere effetti aspecifici della sequenza siRNA nei confronti dell'InsR è stata valutata, mediante RealTime PCR e western blotting, l'espressione di InsR nei cloni TCsiIGFIR selezionati. Come si può osservare dalla figura 23, la linea parentale TC-71 e i trasfettanti hanno livelli di espressione genica di InsR comparabili (A). Per quello che riguarda l'espressione proteica, un lieve ma non significativo incremento di InsR è osservabile nei cloni 45 e 53 rispetto alla linea parentale TC-71 (B). Questo dato mostra l'assenza di effetti aspecifici del siRNA utilizzato nei confronti di InsR, nonostante l'omologia di sequenza, ed evidenzia inoltre un potenziale meccanismo compensatorio dei cloni TCsiIGFIR per superare il silenziamento di IGF-1R.

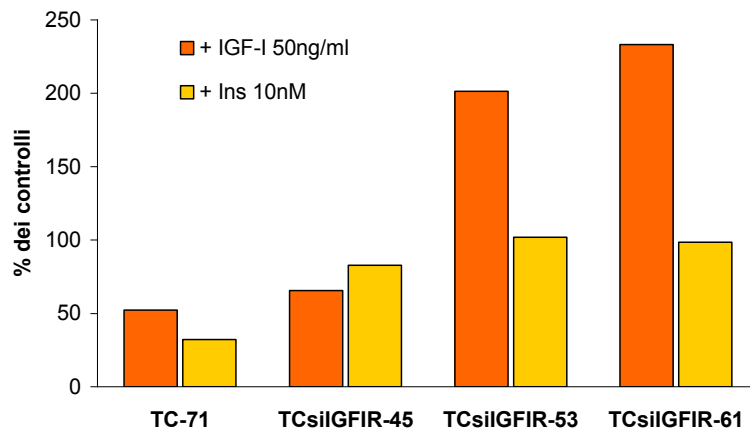


**Figura 23.** Valutazione dell'espressione di InsR mediante RealTime PCR (A) e western blotting (B) nei cloni TCsiIGFIR rispetto alla linea parentale TC-71.

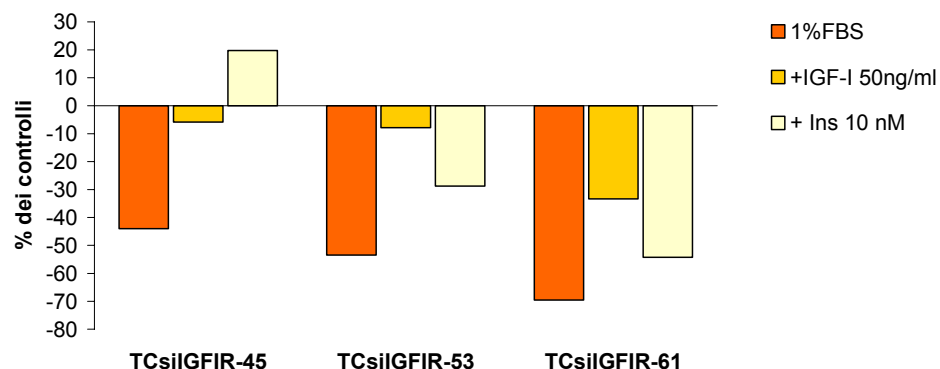
## Ruolo di IGF-I e insulina nella proliferazione cellulare

L'espressione di InsR sulla superficie cellulare associata alle recenti scoperte che gli attribuiscono un ruolo nella tumorigenesi ha fatto ipotizzare un ruolo dell'insulina sierica nel controllo della crescita cellulare dei cloni TCsiIGFIR.

Vista l'inibizione della proliferazione osservata in presenza di basso siero, è stata valutata la capacità di IGF-I e insulina di compensare a tale fenomeno. Le cellule TCsiIGFIR e quelle della linea parentale TC-71 sono state seminate in IMDM 1% FBS addizionato di IGF-I 50 ng/ml o insulina 10 nM. Come si può osservare in figura 24A, l'effetto pro proliferativo di IGF-I e insulina risulta molto più evidente nel caso dei cloni TCsiIGFIR rispetto alla linea parentale con un effetto massimo per i cloni 53 e 61. A conferma della maggiore risposta ad IGF-I, i cloni 45 e 53 raggiungono un livello di proliferazione analogo a quello della linea parentale TC-71 mentre il clone 61 non supera il 66% del controllo. L'analisi della stimolazione con insulina evidenzia invece un andamento verso un aumento della proliferazione in tutti i cloni, con un effetto minore nel clone 61, intermedio nel clone 53 e massimo nel clone 45 (Figura 24B).



A



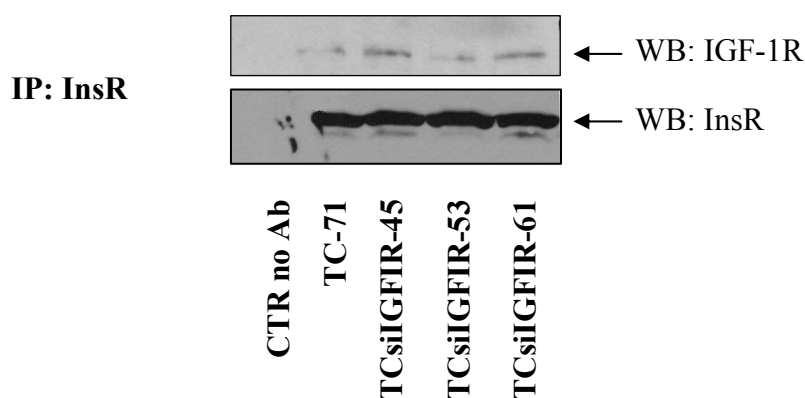
B

**Figura 24.** Effetto di insulina e IGF-I sulla proliferazione cellulare. Le cellule sono state trattate per 96 h con IGF-I 50 ng/ml o Insulina 10 nM. (A) Valori espressi come aumento percentuale rispetto al proprio controllo cresciuto in IMDM 1% FBS. (B) Valori espressi come percentuale della linea parentale TC-71.

## Espressione di recettori ibridi InsR/IGF-1R

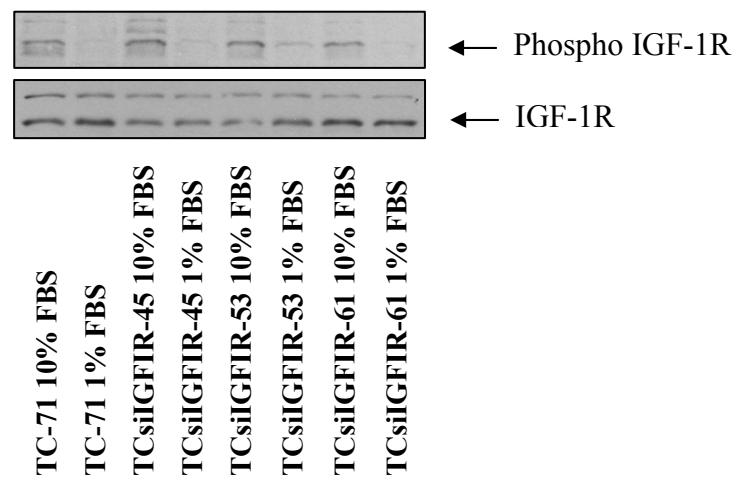
Dati recenti evidenziamo come l'alterazione dell'equilibrio InsR/IGF-1R moduli la formazione di recettori ibridi costituiti da una subunità  $\alpha$ - $\beta$  di InsR e una subunità  $\alpha$ - $\beta$  di IGF-1R. Gli HybridR sono recettori in grado di rispondere a stimolo da parte di IGF-I, IGF-II e insulina. IGF-I è prodotto in maniera autocrina dalle cellule TC-71 che non esprimono però IGF-II. Considerando il calo d'espressione di IGF-1R associato ad una costante espressione di InsR nonché la maggiore risposta dei cloni TCsiIGFIR alla stimolazione proliferativa con IGF-I e insulina ci si è quindi chiesti se tale fenomeno potesse essere spiegato da una maggiore formazione di recettori ibridi.

La presenza di HybridR è stata quindi valutata mediante tecnica di co-immunoprecipitazione. Come mostrato in figura 25, una maggiore interazione tra InsR e IGF-1R risulta evidente nel caso dei cloni 45 e 61 rispetto alla linea parentale TC-71.



**Figura 25.** Valutazione dei complessi InsR/IGF-1R nei cloni TCsiIGFIR rispetto alla linea parentale mediante co-immunoprecipitazione.

L'alterazione dell'equilibrio InsR/IGF-1R porta quindi all'espressione sulla superficie cellulare di recettori in grado di attivare il sistema IGF e la sua cascata di trasduzione del segnale dopo stimolazione non solo da parte di IGF-I ma anche di insulina. Si è quindi valutato lo stato di fosforilazione di IGF-1R, indice della sua attività, sia in normale terreno di crescita che in presenza di basso siero. L'analisi mediante western blotting conferma la minore espressione del recettore, soprattutto nei cloni 45 e 53; ciò nonostante non è osservabile una riduzione della sua fosforilazione (Figura 26). Si ha quindi che le cellule TCsiIGFIR, grazie all'espressione di InsR e soprattutto alla formazione di HybridR, presentano una percentuale di recettore attivo più elevata rispetto alla linea parentale, portando ad un'attivazione di Erk1/2 e Akt analoga a quella della linea parentale come precedentemente mostrato. Questo effetto è potenzialmente in grado di annullare gli effetti negativi sulla proliferazione dati dalla minore espressione di IGF-1R.

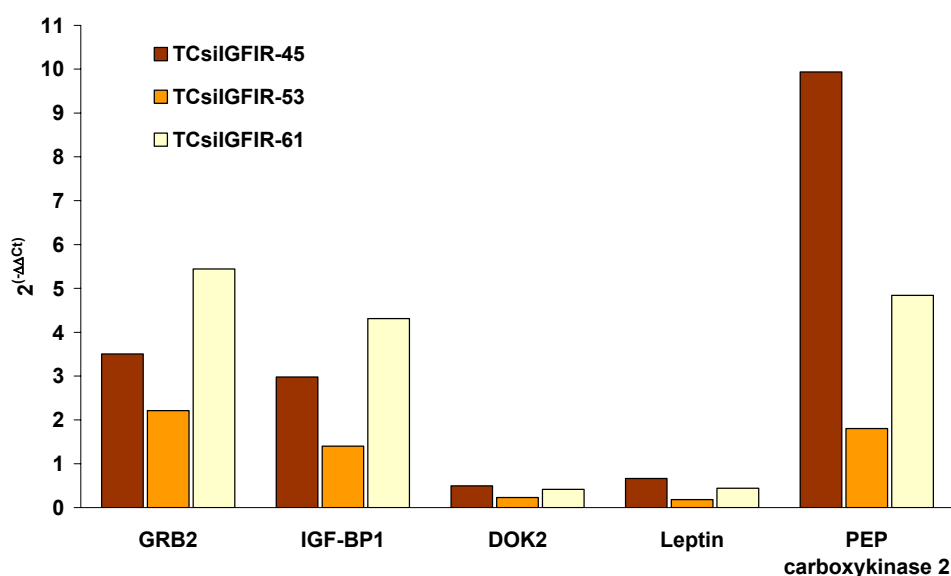


**Figura 26.** Valutazione dello stato di fosforilazione di IGF-1R nella linea parentale TC71 e nei trasfettanti TCsiIGFIR. Le cellule sono state seminate in IMDM 10% FBS o 1% FBS e analizzate a 48h dalla semina mediante western blotting.

## Espressione genica di molecole coinvolte nel metabolismo del glucosio

In seguito all'osservazione di modificazioni nell'espressione di recettori coinvolti nel controllo del metabolismo del glucosio, al fine di meglio caratterizzare l'espressione di molecole coinvolte nella complessa segnalazione mediata dall'insulina nei cloni TCsiIGFIR, ci si è avvalsi di Insulin Signaling Pathway PCR Array, un sistema che permette di valutare contemporaneamente, mediante RealTime PCR, 84 geni coinvolti nel signaling dell'insulina e non solo. L'analisi è stata effettuata su cDNA di cellule cresciute in normale terreno di crescita. Una certa variabilità è stata osservata tra i diversi cloni analizzati. Per identificare i meccanismi responsabili del diverso comportamento biologico dei cloni TCsiIGFIR, si è concentrata l'analisi sui geni analogamente modulati in tutti e 3 i cloni analizzati.

Dall'analisi globale dei dati sono stati identificati solo 5 geni soggetti ad una regolazione trascrizionale comparabile tra i diversi cloni: 3 geni up-regolati, GRB2, IGF-BP1, Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2, e 2 geni down-regolati, DOK2 e Leptina. Tra questi, solo GRB2 e DOK2 presentano una significativa alterazione dell'espressione con ( $RQ \geq 2$ ) o ( $RQ \leq 0.5$ ) (Figura 27).



**Figura 27.** Espressione di geni coinvolti nel metabolismo del glucosio nei cloni TCsiIGFIR. L'analisi è stata effettuata su mRNA estratti da cellule coltivate in presenza di IMDM 10% FBS. Gli istogrammi mostrano i geni modulati con lo stesso andamento nei diversi cloni rispetto alla linea parentale TC-71.

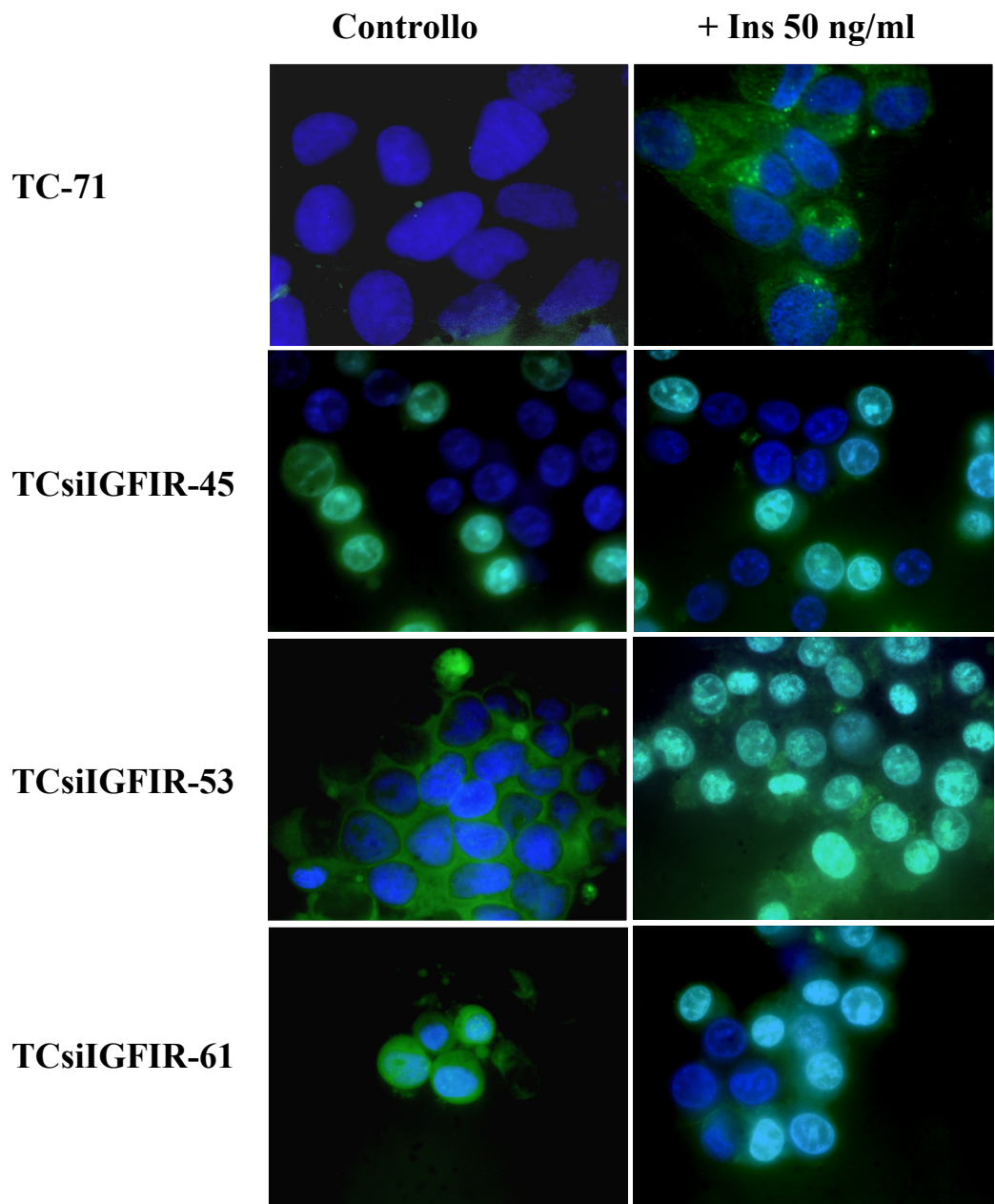
In condizioni fisiologiche, il legame di insulina a InsR regola l'espressione delle altre molecole modulate dal silenziamento di IGF-1R, up-regolando la leptina, proteina coinvolta nel controllo ormonale dell'appetito, e down-modulando IGF-BP1 e Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2, enzima fondamentale nel controllo della



gluconeogenesi. L'andamento da noi osservato risulta essere opposto a quello osservato in letteratura facendo ipotizzare il legame di insulina a HR e non a InsR, fenomeno in grado inoltre di spiegare la maggiore proliferazione osservata in seguito a stimolo insulinico.

### **Up-take del glucosio**

La modulazione della risposta ad insulina nei cloni TCsiIGFIR rispetto alla linea parentale TC-71, l'alterazione dell'equilibrio InsR/IGF-1R e la maggiore espressione di recettori ibridi ha fatto ipotizzare un'alterazione del metabolismo del glucosio nelle cellule silenziate per IGF-1R, come già precedentemente osservato in seguito ad inibizione dell'attività del recettore. Un aumento dell'up-take del glucosio è stato osservato in tutti i cloni, con un effetto massimo per il clone 61, intermedio per il clone 53 e minore per il clone 45. Si ha infatti che queste cellule incorporano glucosio fluorescinato indipendentemente dallo stimolo con insulina, fenomeno non osservabile nelle cellule della linea parentale (Figura 28). In seguito a stimolo insulinico, l'incorporazione del glucosio aumenta drasticamente nelle cellule TC-71, debolmente nei cloni 45 e 53 e per niente nel clone 61 che presenta già un elevato livello di internalizzazione di glucosio fluorescinato basale e che non sembra rispondere a tale stimolazione.



**Figura 28.** Up-take di glucosio dei cloni TCsiIGFIR rispetto alla linea parentale TC-71. Le cellule sono state pretrattate o meno per 1h con insulina 50 ng/ml e esposte per 10 minuti a Fluorescent glucose analogue 6-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-6-deoxyglucose & Hoechst.

## DISCUSSIONE

Il sarcoma di Ewing è un tumore primitivo dell'osso altamente aggressivo che colpisce prevalentemente bambini e adolescenti. I numerosi progressi terapeutici che si sono avuti negli anni, tra cui l'introduzione della chemioterapia, hanno permesso di raggiungere un'aspettativa di vita a 5 anni intorno al 60% nei pazienti che non presentano metastasi alla diagnosi (Bacci, Ferrari et al., 2003). Questa scarsa sopravvivenza è dovuta non solo ad una ridotta efficacia del trattamento chirurgico, radioterapico e/o chemioterapico, ma anche all'insorgenza di neoplasie secondarie e ad effetti collaterali gravi e irreversibili dovuti ai trattamenti applicati. Le aspettative di vita si riducono però al 20% nel caso di pazienti metastatici all'esordio, fenomeno osservato in circa il 30% dei casi. Tali soggetti vengono trattati con alte dosi di radiazioni e/o chemioterapia ma ciò nonostante la prognosi resta infausta, rendendo la presenza di metastasi alla diagnosi il principale fattore prognostico negativo del SE (Paulussen, Ahrens et al., 1998; Cotterill, Ahrens et al., 2000; Cangir, Vietti et al., 1990). L'insieme di queste considerazioni unita alla mancanza di miglioramenti della prognosi negli ultimi 10-15 anni evidenzia la necessità dell'identificazione di nuovi approcci terapeutici che agiscano su bersagli specifici coinvolti nella patogenesi del SE.

Tra i marcatori molecolari caratteristici del sarcoma di Ewing si ha il sistema IGF. IGF-1R è un recettore eterotetramerico  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$  ad attività tirosin chinasi la cui attivazione in seguito a legame con ligando induce l'autofosforilazione di alcuni residui di tirosina fondamentali per l'attivazione delle sue due principali vie di segnalazione: MAPK e PI3K. L'importanza di questo sistema nella patogenesi del SE è stata evidenziata da numerosi studi che evidenziano innanzitutto come l'espressione di IGF-1R sia necessaria per l'azione trasformante di EWS-FLI1 (Toretzky, Kalebic et al., 1997), proteina di fusione in grado a sua volta di regolare l'espressione di numerose componenti del circuito (Prieur, A., Tirode et al., 2004; Tirode, Laud-Duval et al., 2007), e come l'espressione di IGF-1R sia sempre rilevabile sia in linee cellulari che in campioni biotici di SE (Scotlandi, Benini et al., 1996; de Alava, Panizo et al., 2000). Diversi approcci inibitori diretti contro IGF-1R sono stati utilizzati nel corso degli anni al fine di meglio definire il ruolo di questo recettore nella tumorigenesi del SE. Studi condotti con anticorpi neutralizzanti, dominanti negativi, RNA antisense e inibitori della sua via di segnalazione hanno evidenziato un ruolo fondamentale di IGF-1R nel

controllo positivo della proliferazione cellulare e del processo apoptotico, quest'ultimo fondamentale nei fenomeni di resistenza ai farmaci chemioterapici. L'inibizione di IGF-1R è inoltre in grado di ridurre la capacità migratoria e invasiva di cellule di SE, sia *in vitro* che *in vivo*, modulando inoltre negativamente la produzione di fattori pro angiogenetici, quali ad esempio VEGF-A, fondamentali per il sostentamento del tumore e per la formazione di metastasi, evento frequente nel SE (Scotlandi, Benini et al., 1998; Benini, Manara et al., 2001; Scotlandi, Avnet et al., 2002; Scotlandi, Maini et al., 2002). L'inibizione di IGF-1R rappresenta quindi un buon approccio terapeutico in pazienti affetti da sarcoma di Ewing.

L'efficacia di una terapia bersaglio specifica è condizionata dall'espressione del target. L'espressione di IGF-1R in una serie di casi clinici di SE è stata quindi determinata mediante l'utilizzo di diverse tecniche molecolari che valutano l'espressione genica, RealTime PCR e Microarray, o l'espressione proteica, immunoistochimica su Tissue array. Indipendentemente dalla tecnica applicata, IGF-1R risulta essere espresso con frequenza elevata, a conferma dei dati disponibili in letteratura ottenuti mediante immunoistochimica (de Alava, Panizo et al., 2000). L'approccio metodologico utilizzato condiziona invece la valutazione del ruolo prognostico del recettore. Alti livelli di mRNA, rilevati mediante RealTime PCR, sono significativamente associati ad una migliore prognosi nel caso di *Overall survival* (OVS) e ad una tendenza con lo stesso andamento ( $p = 0.08$ ) nel caso di *Event-Free Survival* (EFS). Tale andamento è solo parzialmente confermato dall'analisi di Microarray in cui 7 probes su 9 evidenziano una totale sovrapposizione delle curve di sopravvivenza di pazienti alto e basso esprimenti mentre 2 probes su 9 presentano una tendenza simile a quella osservata dall'analisi di RealTime PCR, priva però di significatività statistica. Nonostante entrambe le tecniche valutino i livelli di espressione genica, i dati ottenuti sono solo parzialmente confrontabili vista la presenza di un sistema di riferimento in RealTime PCR, assente invece nell'analisi Microarray. Questa tecnica fornisce infatti valori assoluti di intensità mentre i valori ottenuti con RealTime PCR sono valori relativi, calibrati su un pool di cellule CD34+, calibratore scelto vista la mancata identificazione di una cellula progenitrice per il sarcoma di Ewing. La valutazione mediante immunoistochimica dell'espressione proteica di IGF-1R condotta su una casistica molto più ampia parzialmente sovrapposta alle precedenti (98 casi vs 42/30 casi per RealTime PCR/Microarray), rispecchia l'andamento osservato dalla maggior parte dei probes di Microarray: i livelli di IGF-1R non influenzano infatti il decorso clinico di pazienti affetti da SE, sia nel caso di EFS che di OVS. Nonostante la grande importanza riconosciuta ad IGF-1R nel processo neoplastico, il suo ruolo prognostico è tuttora controverso con alta espressione associata a prognosi favorevole nel caso dei sarcomi delle parti molli (Ahlén, Wejde et al., 2005) e a prognosi infausta

in tumori come gastrinoma, tumore ovarico e carcinoma esofageo a cellule squamose (Furukawa, Raffeld et al., 2005; Spentzos, Cannistra et al., 2007; Imsumran, Adachi et al., 2007). Studi condotti sul tumore della mammella o della prostata evidenziano poi risultati contrastanti che dipendono certamente dalla diversità di casistica ma anche dalle diverse tecniche applicate (Shimizu, Hasegawa et al., 2004; Peyrat, Bonnetterre et al., 1988; Railo, von Smitten et al., 1994; Ueda, Tsuda et al., 2006; Figueroa, De Raad et al., 2001; Hellawell, Turner et al., 2002; Tennant, Thrasher et al., 1996). Lo studio da noi condotto ha permesso la contemporanea valutazione del ruolo prognostico di IGF-1R sia a livello dell'espressione genica che di quella proteica evidenziando nel complesso un'assenza di significatività per tali valori nel determinare la prognosi di pazienti affetti da SE. Meccanismi di regolazione post trascrizionali e post traduzionali possono essere ipotizzati per spiegare questa discordanza tra i valori di mRNA e i valori di proteina. La regolazione dell'espressione genica ma soprattutto la processazione del propeptide sono fenomeni soggetti a fine regolazione da parte di numerosi enzimi, tra cui ad esempio proteasi e glicosidasi, che guidano l'assemblaggio del recettore maturo e la sua traslocazione in membrana, posizione in cui prevale la positività per IGF-1R in immunoistochimica (Samani, Yakar et al., 2007).

Lo sviluppo di terapie target specifiche per il trattamento delle neoplasie è condizionato all'identificazione di molecole bersaglio ampiamente espresse nella patologia analizzata su cui agire in maniera selettiva. La variabilità di espressione di tali fattori permette la stratificazione dei pazienti in sottogruppi che possono quindi essere sottoposti a trattamenti diversificati allo scopo di aumentare l'efficacia terapeutica senza però avere effetti tossici indesiderati. La presenza di un'espressione costante di IGF-1R, associata ad un'assenza di valore prognostico elimina quindi la necessità di stratificare i pazienti, processo molto difficile e lento in una patologia rara come il sarcoma di Ewing, rendendo quindi IGF-1R un buon bersaglio terapeutico per lo sviluppo di studi clinici.

Questo studio pone quindi a confronto due approcci metodologici diversi che mirano ad inibire l'attività di IGF-1R o la sua sintesi, mediante rispettivamente un piccolo inibitore o un siRNA specifico.

Lo sviluppo di approcci diretti contro IGF-1R deve sempre considerare l'elevata omologia che questo recettore presenta con l'InsR, responsabile dell'omeostasi del glucosio, la cui inibizione comporta un effetto diabetogenico. La ricerca di molecole in grado di inibire in maniera specifica l'attività di IGF-1R ha portato al recente sviluppo di un derivato delle pirrolo[2,3-*d*]pirimidine, NVP-AEW541. Questa molecola presenta un vantaggio fondamentale rispetto ad altri approcci inibenti IGF-1R precedentemente studiati in quanto è somministrabile per via orale. Ciò la rende quindi facilmente veicolabile e utilizzabile *in vivo*. NVP-AEW541 mostra inoltre un'elevata specificità nei

confronti di IGF-1R rispetto ad altri recettori tirosin chinasi, con un'affinità 27 volte superiore per IGF-1R rispetto a quella mostrata nei confronti di InsR (Garcia-Echeverria, Pearson et al., 2004). La sua efficacia e selettività su diverse linee cellulari tumorali *in vitro* risulta poi essere superiore a quella di altri derivati delle pirrolo[2,3-*d*]pirimidine attualmente in studio (Mitsiades, Mitsiades et al., 2004; Warshamana-Greene, Litz et al., 2004).

NVP-AEW541 agisce modulando numerosi processi biologici importanti nella tumorigenesi. Si ha infatti che il trattamento di linee cellulari di SE con tale farmaco induce un'inibizione della proliferazione cellulare a dosi sub micromolari con un effetto che risulta essere indipendente dallo stato di attivazione del recettore e che non viene annullato dalla stimolazione con IGF-I. Questo è molto importante considerando che le cellule di SE sono soggette a continua stimolazione autocrina/paracrina da parte dell'IGF-I secreto dalle cellule stesse o da quello presente in grandi quantità nella matrice ossea (Staal, Geertsma-Kleinekoort et al., 1998), facilmente liberabile dal processo osteolitico delle cellule tumorali. L'azione antiproliferativa di NVP-AEW541 risulta ancora più evidente in condizioni di ancoraggio indipendenza, situazione in cui IGF-1R regola maggiormente la crescita di cellule tumorali. La ridotta proliferazione osservata si associa ad un blocco delle cellule in fase G<sub>1</sub> e ad un aumento dell'apoptosi, entrambi con un effetto dose dipendente. Questo fenomeno trova la sua spiegazione nella forte inibizione dell'attività di Akt, molecola fondamentale nella protezione dal processo apoptotico (Parrizas, Saltiel et al., 1997). Il trattamento con NVP-AEW541 inibisce stabilmente l'attività di Akt mentre un effetto transitorio è osservabile nel caso di Erk1/2, evento riscontrabile anche in altri modelli tumorali quali neuroblastoma e leucemia mieloide acuta (Tanno, Mancini et al., 2006; Tazzari, Tabellini et al., 2007). La transitorietà dell'effetto inibitorio sulla via MAPK non riduce però l'azione di NVP-AEW541 evidenziando come il solo blocco di Akt sia in ogni caso sufficiente ad inibire la proliferazione di cellule di SE inducendo un effetto citostatico.

Lo studio della capacità tumorigenica *in vivo* ha poi evidenziato un significativo calo nello sviluppo di tumori in topi trattati con NVP-AEW541 con un effetto superiore nel caso del suo uso in combinazione con vincristina, farmaco con cui agisce sinergicamente anche *in vitro*. L'azione di protezione da parte di IGF-1R e della sua cascata di trasduzione del segnale nei confronti di diversi insulti tossici quali i chemioterapici è stata osservata in diversi modelli tumorali quali carcinoma della mammella, del colon e vari sarcomi tra cui il sarcoma di Ewing (Sell, Baserga et al., 1995; Beech, Perer et al., 2003; Toretsky, Thakar et al., 1999, Benini, Manara et al., 2001, 2004; Scotlandi, Maini et al., 2002; Scotlandi, Avnet et al., 2002). Come precedentemente osservato con altri approcci metodologici, l'inibizione di IGF-1R da parte di NVP-AEW541 in cellule di SE è in grado di potenziare l'effetto chemioterapico

di farmaci quali vincristina, actinomicina D e ifosfamida, mentre ha solo effetti subadditivi in combinazione con cis platino e doxorubicina. La maggiore inibizione osservata con il trattamento combinato trova giustificazione nell'effetto citostatico piuttosto che citotossico di NVP-AEW541 sulle cellule, evidenziando la necessità di una sua associazione con i chemioterapici convenzionali nella terapia del SE.

La presenza o l'insorgenza di metastasi rappresenta un fattore prognostico altamente sfavorevole in pazienti affetti da SE, vista anche la scarsa responsività ai trattamenti convenzionali riscontrata in tali soggetti. NVP-AEW541, agendo sulle principali vie di segnalazione attivate da IGF-1R, è in grado di indurre un'inibizione dose dipendente della capacità migratoria che, in combinazione con la riduzione della secrezione del fattore pro angiogenetico VEGF-A, si associa ad un ritardo nell'insorgenza di metastasi ossee e ad una minore crescita di tali lesioni *in vivo*.

Gli ottimi risultati ottenuti sia *in vitro* che *in vivo* hanno portato alla valutazione dei potenziali effetti collaterali di questo trattamento. Le alte dosi di NVP-AEW541 o la sua combinazione con VCR portano ad un calo del peso corporeo degli animali trattati, peso che tende però a riavvicinarsi a quello dei controlli alla fine del trattamento. La riduzione del peso corporeo è un effetto nuovo, non osservato nel primo studio su NVP-AEW541 condotto su un modello tumorale di fibrosarcoma (Garcia-Echeverria, Pearson et al., 2004). Nel nostro studio si è scelto di utilizzare topi di 4-5 settimane, che mimano l'età pediatrica/adolescenziale umana, periodo della vita in cui il SE insorge con frequenza più elevata. In tale periodo il sistema IGF svolge un ruolo fondamentale nel controllo e nella stimolazione dello sviluppo e della crescita, rendendo quindi non trascurabile l'effetto tossico di NVP-AEW541 sul peso corporeo.

Per quel che riguarda le analisi ematiche, i livelli di trigliceridi ed enzimi epatici non risultano invece particolarmente alterati nei topi trattati rispetto ai controlli. Nel caso dell'urea si osservano invece modificazioni dell'ordine di grandezza di quelle osservate in seguito a trattamento con VCR, tossicità prontamente gestita dagli oncologi essendo la vincristina un farmaco normalmente utilizzato nella terapia del SE. Un dato particolarmente rilevante è rappresentato però dai livelli ematici di glucosio. La specifica inibizione di IGF-1R da parte di NVP-AEW541 induce sorprendentemente un calo dei livelli sierici di glucosio in contrasto con l'effetto diabetogenico che un'inibizione aspecifica di InsR potrebbe fare ipotizzare. Tale fenomeno si associa *in vitro* ad una maggiore internalizzazione di glucosio da parte delle sole cellule tumorali esprimenti IGF-1R. L'opinione generale attribuisce ad IGF-1R un ruolo principale nella crescita tissutale e nello sviluppo (Liu, Baker et al., 1993; Baker, Liu et al., 1993) mentre assegna ad InsR un ruolo esclusivo nel metabolismo del glucosio. Studi condotti su diversi modelli cellulari in cui InsR è deletato dimostrano invece come anche IGF-1R sia in grado di modulare alcuni processi metabolici, tra cui ad esempio l'induzione

dell'up-take di glucosio (Di Cola, Cool et al., 1997; Baudry, Lamothe et al., 2001; Shefi-Friedman, Wertheimer et al., 2001). L'inibizione di IGF-1R da parte di NVP-AEW541 potrebbe quindi spostare l'azione del recettore verso funzioni metaboliche, avendone bloccato le funzioni mitogeniche.

L'altro approccio inibitorio diretto contro IGF-1R preso in esame in questo studio prevede l'utilizzo della tecnologia siRNA per modulare negativamente l'espressione genica del recettore. I dati da noi ottenuti nella linea cellulare di sarcoma di Ewing TC-71 evidenziano come questa tecnica di inibizione di IGF-1R non sia ottimale in questo tumore in cui il sistema IGF costituisce il principale circuito di mantenimento. E' infatti molto probabile che un silenziamento superiore al 50% risulti essere letale per queste cellule. La scarsa efficacia di questo approccio inibitorio è evidenziata dai dati ottenuti *in vitro*. Contrariamente a quanto osservato con RNA antisense (Scotlandi, Maini et al., 2002), la minor espressione di IGF-1R non inibisce la capacità proliferativa di cellule di SE né in monostrato né in condizione d'indipendenza d'ancoraggio. Tale effetto è osservabile solo se si crescono le cellule in presenza di basso siero, situazione in cui vengono a mancare tutti i principali fattori di crescita esogeni. L'assenza di effetti inibitori rilevanti è confermata dall'analisi dell'attività dei principali mediatori della cascata di trasduzione del segnale di IGF-1R. Le vie di segnalazione MAPK e PI3K non risultano infatti down-regolate; al contrario, il silenziamento di IGF-1R sembra indurre una maggiore attivazione di Akt in condizioni basali insieme ad un'attivazione di Erk1/2 analoga alla linea parentale. In condizioni normali di crescita si osserva inoltre la modulazione dell'espressione di due *docking proteins* coinvolte nel controllo della trasmissione del segnale mediata da IGF-1R: Grb2 e Dok2. Grb2 è una molecola coinvolta nell'attivazione della via MAPK (Samani, Yakar et al., 2007) mentre Dok2 controlla negativamente l'attività di Erk1/2 *in vitro* e *in vivo* (Jones & Dumont, 1999; Niki, Di Cristofano et al., 2004; Yasuda, Shirakata et al., 2004). La maggiore espressione di Grb2 associata ad una minore espressione di Dok2 potrebbe quindi spiegare la mancata alterazione dell'attività di Erk1/2 e la conseguente assenza di effetti sulla proliferazione osservata *in vitro* in presenza di normale terreno di crescita. In contrapposizione però, il silenziamento di IGF-1R è in grado di ridurre la capacità migratoria di due dei tre cloni selezionati, a conferma del ruolo rilevante svolto da IGF-1R nella regolazione della migrazione e invasione cellulare. Si può quindi ipotizzare che il numero di recettori espressi dalle cellule silenziate per IGF-1R consenta di conservare la capacità proliferativa ma non sia però sufficiente a mantenere inalterate le altre funzioni biologiche cellulari tra cui ad esempio la capacità migratoria. A parziale conferma di ciò si pone lo studio di Rubini e colleghi che ha evidenziato come il numero di recettori per IGF-I espressi sulla membrana plasmatica sia in grado di condizionare la crescita cellulare di fibroblasti murini (Rubini, Hongo et al., 1997). In



presenza di siero, tutte le cellule sono in grado di proliferare indipendentemente dall'espressione e dal livello del recettore. In contrapposizione esiste però un livello critico di espressione di IGF-1R in grado di influenzare la capacità di crescita in assenza di siero e in risposta ad IGF-I, analogamente a quanto da noi osservato nelle cellule di SE silenziate per il recettore.

Numerosi studi hanno evidenziato come l'attivazione di InsR da parte dell'insulina o di IGF-II sia in grado di stimolare proliferazione e migrazione in diversi sistemi cellulari (Milazzo, Giorgino et al., 1992; Benoliel, Kahn-Perles et al., 1997; Sciacca, Mineo et al., 2002) e come cellule tumorali di carcinoma al seno siano molto più sensibili all'azione dell'insulina rispetto alla controparte normale (Frittitta, Vigneri et al., 1993). Considerando l'elevata omologia di sequenza tra IGF-1R e InsR e l'alterazione del metabolismo del glucosio osservata in seguito all'inibizione di IGF-1R col piccolo inibitore NVP-AEW541 si è quindi deciso di valutare l'effetto del silenziamento di IGF-1R sul sistema dell'InsR. L'espressione del recettore per l'insulina non risulta alterata, a conferma della specificità del siRNA utilizzato. Il silenziamento di IGF-1R induce però nelle cellule di SE silenziate una maggiore sensibilità ad IGF-I e inaspettatamente all'insulina, riportando la capacità proliferativa fino a livelli simili a quelli della linea parentale. La maggiore sensibilità ad insulina è stata osservata anche in altri modelli sperimentali silenziati per IGF-1R. In cellule di carcinoma della mammella, alto esprimenti l'InsR, il silenziamento di IGF-1R favorisce la formazione di omodimeri InsR la cui attivazione induce up-take di glucosio (Zhang, Pelzer et al., 2007). In adipociti deleti per IGF-1R si osserva invece un incremento dell'attività di Erk1/2 e un'aumentata proliferazione in seguito a stimolo con insulina (Mur, Valverde et al., 2002). Analogamente a quanto osservato nel nostro modello, tali cellule non presentano alterazione nella crescita in presenza di normale terreno di coltura.

La risposta cellulare ad insulina è generalmente attribuita alla sola attivazione del recettore per l'insulina. Recentemente sono però stati identificati dei recettori ibridi, costituiti da una subunità  $\alpha$ - $\beta$  di IGF-1R e una subunità  $\alpha$ - $\beta$  di InsR in grado di rispondere allo stimolo da parte di tutti i ligandi del sistema IGF: IGF-I, IGF-II ma anche insulina. L'alterazione dell'equilibrio InsR:IGF-1R porta quindi ad un aumento della formazione di recettori ibridi HR nei cloni silenziati e ad una fosforilazione basale del recettore comparabile a quella della linea parentale in grado di spiegare l'assenza di effetti proliferativi in normali condizioni di crescita e la maggiore sensibilità all'insulina osservata in terreno a basso siero.

Il ruolo funzionale dei recettori ibridi e la loro espressione fisiologica è però tuttora poco conosciuto. I dati più ampi e rilevanti sono stati ottenuti dal gruppo del Professor Belfiore che ha evidenziato come l'espressione di HR-A risulti essere superiore a quella di IGF-1R nel 75% dei casi di tumore della mammella analizzati

(Pandini, Vigneri et al., 1999). In questa neoplasia si ha inoltre che alti livelli di InsR sono associati ad una prognosi negativa (Mathieu, Clark et al., 1997) evidenziando un forte coinvolgimento del sistema InsR e HR-A nella patogenesi di tale tumore. Dal punto di vista funzionale, evidenze sperimentali mostrano come la formazione del complesso HR-A/insulina sembra in grado di attivare la cascata di trasduzione del segnale di IGF-1R (Pandini, Frasca et al., 2002) ma non può essere escluso che l'attivazione di HR da parte di uno dei suoi ligandi porti alla transfosforilazione della subunità  $\beta$  di InsR attivando la via metabolica del recettore per l'insulina (Dominici, Argentino et al., 2005). L'alterazione dell'equilibrio InsR:IGF-1R e le modificazioni al metabolismo del glucosio ad esso dovute potrebbero quindi spiegare il maggiore uptake di glucosio indipendentemente da stimolo con insulina osservato nelle cellule di SE silenziate in maniera. In condizione di deprivazione di siero, l'IGF-I prodotto in maniera autocrina dalle cellule di SE potrebbe quindi agire sui recettori ibridi HR o sull'IGF-1R attivo rimasto inducendo uno spostamento delle funzioni del recettore verso un ruolo metabolico, analogamente a quanto osservato in seguito al blocco della sua attività col piccolo inibitore NVP-AEW541.

Nonostante la grande importanza che il sistema dell'insulina sembra rivestire in questo modello di cellule di SE silenziate per IGF-1R, è necessario però sottolineare come lo stimolo con insulina porti ad un ripristino solo parziale della capacità proliferativa di cellule di SE silenziate per IGF-1R facendo quindi ipotizzare la presenza di altri meccanismi compensatori attivati dal siero presente nel terreno di crescita. Tale fenomeno è stato ad esempio osservato in un recente studio che evidenzia la modulazione positiva dell'attività di EGF-R in seguito al silenziamento di IGF-1R (Riedemann, Sohail et al., 2007). Uno studio mirato a definire tali meccanismi d'azione e a meglio caratterizzare il ruolo dell'insulina nel sarcoma di Ewing sarebbe quindi necessario per valutare possibili meccanismi di resistenza sviluppabili in seguito ad approcci terapeutici diretti contro IGF-1R.

In conclusione, un dato importante evidenziato da questo studio, che va però oltre gli scopi di questa tesi, è il forte legame tra IGF-1R e InsR. In maniera indipendente dall'approccio utilizzato, l'inibizione di IGF-1R porta all'alterazione del metabolismo del glucosio e dell'insulina. In particolare, nel caso del silenziamento genico la maggiore sensibilità all'insulina conferisce un vantaggio proliferativo alle cellule di SE, a conferma di dati recenti della letteratura che evidenziano come il sistema dell'InsR e dei recettori ibridi sia importante nel processo di tumorigenesi, in maniera analoga al sistema IGF.

In merito allo studio comparativo dell'inibizione di IGF-1R, scopo di questa tesi, l'analisi complessiva dei dati evidenzia come l'inibizione dell'attività di IGF-1R da

parte del piccolo inibitore NVP-AEW541 rappresenti un approccio terapeutico migliore nel trattamento del SE rispetto all'inibizione dell'espressione del recettore. I numerosi processi biologici che intervengono nell'assemblaggio del recettore maturo potrebbero infatti ridurre l'efficacia di questo approccio rispetto al blocco dell'attività di IGF-1R già correttamente posizionato in membrana. L'utilizzo clinico del silenziamento genico di IGF-1R risulta inoltre fortemente limitato dalla sua applicabilità *in vivo*. In contrapposizione, la facile somministrazione di NVP-AEW541 per via orale lo renderebbe un nuovo potenziale farmaco da usare in combinazione ai convenzionali chemioterapici nella terapia del sarcoma di Ewing. Gli effetti tossici sul peso corporeo e sui livelli di glucosio ematico degli animali trattati non sono però trascurabili. Tali effetti collaterali non sono stati precedentemente osservati negli studi condotti con anticorpi monoclonali, il cui utilizzo induce inoltre la down-modulazione del recettore necessaria per innescare il processo apoptotico. La maggiore efficacia di questo meccanismo d'inibizione associata al recente sviluppo di diversi anticorpi umanizzati diretti contro IGF-1R, già entrati in studi clinici di fase I su tumori solidi (Haluska, Shaw et al., 2007), riporta quindi l'attenzione su questo approccio terapeutico per il trattamento di pazienti affetti da sarcoma di Ewing. L'importanza dell'interazione tra insulina e IGF-I, mitogenesi e metabolismo del glucosio è però sempre più riconosciuta vista la lieve iperglicemia IGF-1R dipendente osservata nell'unico studio clinico di fase I ad oggi pubblicato in circa il 40% dei casi trattati. La caratterizzazione dell'azione di IGF-1R e del cross talk tra le due vie nel controllo del metabolismo del glucosio a livello fisiologico diventa quindi molto importante per poter meglio gestire trattamenti terapeutici diretti contro IGF-1R.

# BIBLIOGRAFIA

- Abbott AM, Bueno R, Pedrini MT, Murray JM, Smith RJ.** (1992) Insulin-like growth factor I receptor gene structure. *J Biol Chem*, 267(15):10759-63
- Ahlén J, Wejde J, Brosjö O, von Rosen A, Weng WH et al.** (2005) Insulin-like growth factor type 1 receptor expression correlates to good prognosis in highly malignant soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res*, 11(1):206-16
- Almeida A, Muleris M, Dutrillaux B, Malfoy B.** (1994) The insulin like growth factor I receptor gene is the target for the 15q26 amplicon in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 11:63-65
- Andrews DW, Resnicoff M, Flanders AE, Kenyon L, Curtis M et al.** (2001) Results of a pilot study involving the use of an antisense oligodeoxynucleotide directed against the insulin-like growth factor type I receptor in malignant astrocytomas. *J Clin Oncol*, 19:2189-200
- Armengol G, Knuutila S, Lluís F, Capella G, Miro R et al.** (2000) DNA copy number changes and evaluation of MYC, IGF1R, and FES amplification in xenografts of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 116:133-41
- Arteaga CL, Kitten LJ, Coronado EB, Jacobs S, Kull FC Jr et al.** (1989) Blockade of the type I somatomedin receptor inhibits growth of human breast cancer cells in athymic mice. *J Clin Invest*, 84:1418-23
- Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Rimondini S, Longhi A, et al.** (2000) Prognostic factors in nonmetastatic Ewing's sarcoma of bone treated with adjuvant chemotherapy: analysis of 359 patients at the Istituto Ortopedico Rizzoli. *J Clin Oncol*, 18:4-11
- Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK.** (2005) Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature Rev Cancer*, 5:921-929
- Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A.** (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, 75:73-82
- Bale LK, Conover CA.** (1992) Regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 messenger ribonucleic acid expression by insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, 131:608-14
- Barres BA, Hart IK, Coles HSR, Burne 3F, Voyvodic JT et al** (1992) Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*, 70:31-46
- Baserga R, Hongo A, Rubini M, Prisco M, Valentinis B.** (1997) The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1332:F105-26
- Baserga R, Rubin R.** (1993) Cell cycle and growth control. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 3:47-61
- Baserga R.** (1999) The IGF-I receptor in cancer research. *Exp Cell Res*, 253(1):1-6
- Baserga R.** (2000) The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Oncogene*, 19:5574-81

- Baudry A, Lamothe B, Bucchini D, Jami J, Montarras D et al.** (2001) IGF-1 receptor as an alternative receptor for metabolic signaling in insulin receptor-deficient muscle cells. *FEBS*, 488:174-8
- Baxter RC.** (2000) Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278(6):E967-76
- Beech DJ, Perer E, Helms J, Gratzer A, Deng N.** (2003) Insulin-like growth factor-I receptor activation blocks doxorubicin cytotoxicity in sarcoma cells. *Oncol Rep*, 10(1):181-4
- Beitner-Johnson D, LeRoith D.** (1995) Insulin-like growth factor-I stimulates tyrosine phosphorylation of endogenous c-Crk. *J Biol Chem*. 270(10):5187-90
- Belfiore A.** (2007) The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer. *Curr Pharm Des*, 13(7):671-86
- Benini S, Manara MC, Baldini N, Cerisano V, Serra M et al.** (2001) Inhibition of insulin-like growth factor I receptor increases the antitumor activity of doxorubicin and vincristine against Ewing's sarcoma cells. *Clin Cancer Res*, 7:1790-7
- Benini S, Manara MC, Cerisano V, Perdichizzi S, Stramiello R et al.** (2004) Contribution of MEK/MAPK and PI3-K signaling pathway to the malignant behavior of Ewing's sarcoma cells: therapeutic prospects. *Int J Cancer*, 108:358-66
- Benoliel Am, Kahn-Perles B, Imbert J, Verrando P.** (1997) Insulin stimulates haptotactic migration of human epidermal keratinocytes through activation of NF-kappa B transcription factor. *J Cell Sci*, 110(Pt17):2089-97
- Berns EM, Klijn JG, van Staveren IL, Portengen H, Foekens JA.** (1992) Sporadic amplification of the insulin-like growth factor 1 receptor gene in human breast tumors. *Cancer Res*, 52:1036-9
- Blakesley VA, Kalebic T, Helman LJ, Stannard B, Faria TN et al.** (1996) Tumorigenic and mitogenic capacities are reduced in transfected fibroblasts expressing mutant insulin-like growth factor (IGF)-I receptors. The role of tyrosine residues 1250, 1251 and 1316 in the carboxy-terminus of the IGF-I receptor. *Endocrinology*, 137:410-17
- Blum G, Gazit A, Levitzki A.** (2000) Substratecompetitive inhibitors of IGF-I receptor kinase. *Biochem*, 39(51):15705-12
- Blum G, Gazit A, Levitzki A.** (2003) Development of new insulin-like growth factor-1 receptor kinase inhibitors using catechol mimics. *J Biol Chem*, 278:40442-54
- Bohula EA, Salisbury AJ, Sohail M, Playford MP, Riedemann J, Southern EM, Macaulay VM.** (2003) The efficacy of small interfering RNAs targeted to the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) is influenced by secondary structure in the IGF1R transcript. *J Biol Chem* 278:15991-97
- Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA.** (2004) Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*, 29:233-42

- Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinger BR, Kley N.** (1995) Induction of the growth inhibitor IGF binding protein 3 by p53. *Nature*, 377:646-49
- Buckley DA, Cheng A, Kiely PA, Tremblay ML, O'Connor R.** (2002) Regulation of insulin-like growth factor type I (IGF-I) receptor kinase activity by protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) and enhanced IGF-I-mediated suppression of apoptosis and motility in PTP-1B-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 22:1998-2010
- Burtrum D, Zhu Z, Lu D, Anderson DM, Prewett M et al.** (2003) A fully human monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor blocks ligand-dependent signaling and inhibits human tumor growth in vivo. *Cancer Res*, 63:8912-21
- Butler AA, Yakar S, Gewolb IH, Karas M, Okubo Y, LeRoith D.** (1998) Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 121:19-26
- Cangir A, Vietti TJ, Gehan EA, Burgert EO Jr, Thomas P et al.** (1990) Ewing's sarcoma metastatic at diagnosis. Results and comparisons of two intergroup Ewing's sarcoma studies. *Cancer*, 66(5):887-93
- Cavazzana AO, Miser JS, Jefferson J, Triche TJ.** (1987) Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am. J. Pathol*, 127:507-18
- Chang Q, Li Y, White MF, Fletcher JA, Xiao S.** (2002) Constitutive activation of insulin receptor substrate 1 is a frequent event in human tumors: therapeutic implications. *Cancer Res*, 62:6035-38
- Cohen BD, Baker DA, Soderstrom C, Tkalcevic G, Rossi AM et al.** (2005) Combination therapy enhances the inhibition of tumor growth with the fully human anti-type 1 insulin-like growth factor receptor monoclonal antibody CP-751,871. *Clin Cancer Res*, 11:2063-73
- Coppola D, Ferber A, Miura M, Sell C, D'Ambrosio C et al.** (1994) A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol*, 14(7):4588-95
- Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, Jürgens HF, Voûte PA et al.** (2000) Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J Clin Oncol*, 18:3108-14
- Crooke ST.** (1999) Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta*, 1489:31-44
- Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, Hutcheon DF, Kafonek DR et al.** (2003) Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science*, 299:1753-55
- D'Ambrosio C, Ferber A, Resnicoff M, Baserga R.** (1996) A soluble insulin-like growth factor I receptor that induces apoptosis of tumor cells in vivo and inhibits tumorigenesis. *Cancer Res*, 56:4013-20

- D'Ambrosio C, Keller SR, Morrione A, Lienhard GE, Baserga R et al. (1995)** Transforming potential of the insulin receptor substrate 1. *Cell Growth Differ*, 6(5):557-62
- de Alava E, Panizo A, Antonescu CR, Huvos AG, Pardo-Mindán FJ et al. (2000)** Association of EWS-FLI1 Type 1 Fusion with Lower Proliferative rate in Ewing's Sarcoma. *Am J Pathol*, 156:849-55
- DeAngelis T, Ferber A, Baserga R. (1995)** Insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the platelet-derived growth factor receptor. *J Cell Physiol*, 164(1):214-21
- Deneen B, Denny CT. (2001)** Loss of p16 pathways stabilizes EWS/FLI1 expression and complements EWS-FLI1 mediated transformation. *Oncogene*, 20:6731-41
- Di Cola G, Cool MH, Accili D. (1997)** Hypoglycemic effect of insulin-like growth factor-1 in mice lacking insulin receptors. *J Clin Invest*, 99:2538-44
- Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. (1998)** Glycogen synthase kinase-3 regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*, 12:3499-511
- Dominici FP, Argentino DP, Muñoz MC, Miquet JG, Sotelo AI et al. (2005)** Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. *Growth Horm IGF Res*, 15(5):324-36
- Dong AQ, Kong MJ, Ma ZY, Qian JF, Xu XH. (2006)** Down-regulation of IGF-IR using small, interfering, hairpin RNA (siRNA) inhibits growth of human lung cancer cell line A549 in vitro in nude mice. *Cell Biol Int*, 31(5):500-7
- Dunn SE, Ehrlich M, Sharp NJ, Reiss K, Solomon G et al. (1998)** A dominant negative mutant of the insulin-like growth factor-I receptor inhibits the adhesion, invasion, and metastasis of breast cancer. *Cancer Res*, 58:3353-61
- Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. (2004)** CEACAM6 gene silencing impairs anoikis resistance and in vivo metastatic ability of pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene*, 23:465-73
- Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. (2003)** Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Mol Cell Biol*, 4:457-67
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K et al. (2001)** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411:494-98
- Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D et al. (2000)** SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem*, 275(21):15985-91
- Engelman JA, Luo J, Cantley LC. (2006)** The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Rev*, (7):606-19
- Esposito DL, Blakesley VA, Koval AP, Scrimgeour AG, LeRoith D. (1997)** Tyrosine residues in the C-terminal domain of the insulin-like growth factor-I receptor mediate mitogenic and tumorigenic signals. *Endocrinology*, 138(7):2979-88

**Ewing J.** (1921) Diffuse endothelioma of bone. Proc NY Pathol Soc, 21:17-24

**Figuroa JA, De Raad S, Speights VO, Rinehart JJ.** (2001) Gene expression of insulin-like growth factors and receptors in neoplastic prostate tissues: correlation with clinico-pathological parameters. Cancer Invest, 19:28-34

**Filleur S, Courtin A, Ait-Si-Ali S, Guglielmi J, Merle C et al.** (2003) SiRNA mediated inhibition of vascular endothelial growth factor severely limits tumor resistance to antiangiogenic thrombospondin-1 and slows tumor vascularization and growth. Cancer Res, 63:3919-22

**Firth SM, Baxter RC.** (2002) Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. Endocr Rev, 23:824-54

**Frangioni JV, Beahm PH, Shifrin V, Jost CA, Neel BG.** (1992) The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. Cell, 68:545-60

**Frittitta L, Vigneri R, Papa V, Goldfine ID, Grasso G et al.** (1993) Structural and functional studies of insulin receptors in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat, 25:73-82

**Furlanetto RW, Dei BR, Lopaczynski W, Nissley SP.** (1997) 14-3-3 proteins interact with the insulin-like growth factor receptor but not the insulin receptor. Biochem J, 327(Pt3):765-71

**Furstenberger G, Senn HJ.** (2002) Insulin-like growth factors and cancer. Lancet, 3:298-302

**Furukawa M, Raffeld M, Mateo C, Sakamoto A, Moody TW et al.** (2005) Increased expression of insulin-like growth factor I and/or its receptor in gastrinomas is associated with low curability, increased growth, and development of metastases. Clin Cancer Res, 11(9):3233-42

**Garcia-Echeverria C, Pearson MA, Marti A, Meyer T, Mestan J et al.** (2004) In vivo antitumor activity of NVP-AEW541: A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. Cancer Cell, 5:231-39

**Giovannini M, Biegel JA, Serra M, Wang JY, Wei YH et al.** (1994) EWS-erg and EWS-Fli1 fusion transcripts in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors with variant translocations. J Clin Invest, 94(2):489-96

**Giovannini M, Selleri L, Biegel JA, Scotlandi K, Emanuel BS et al.** (1992) Interphase cytogenetics for the detection of the t(11;22)(q24;q12) in small round cell tumors. J Clin Invest, 90(5):1911-18

**Girnita A, All-Ericsson C, Economou MA, Astrom K, Axelson M et al.** (2006) The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor picropodophyllin causes tumor regression and attenuates mechanisms involved in invasion of uveal melanoma cells. Clin Cancer Res, 12:1383-91

**Girnita A, Girnita L, del Prete F, Bartolazzi A, Larsson O et al.** (2004) Cyclolignans as inhibitors of the insulin like growth factor-1 receptor and malignant cell growth. Cancer Res, 64:236-42



- Girnita L, Shenoy SK, Sehat B, Vasilcanu R, Girnita A et al.** (2005) Arrestin is crucial for ubiquitination and down-regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase. *J Biol Chem*, 280:24412-19
- Goetsch L, Gonzalez A, Leger O, Beck A, Pauwels PJ et al.** (2005) A recombinant humanized anti-insulin-like growth factor receptor type I antibody (h7C10) enhances the antitumor activity of vinorelbine and anti-epidermal growth factor receptor therapy against human cancer xenografts. *Int J Cancer*, 113:316-28
- Goldstein BJ, Bittner-Kowalczyk A, White MF, Harbeck M.** (2000) Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J Biol Chem*, 275:4283-89
- Goldwein JW.** (1991) Effects of radiation therapy on skeletal growth in childhood. *Clin Orthop*, 262:101-7
- Gronborg M, Wulff BS, Rasmussen JS, Kjeldsen T, Gammeltoft S.** (1993) Structure-function relationship of the insulin-like growth factor I receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 268(31):23435-40
- Gual P, Baron V, Lequoy V, Van Obberghen E.** (1998) Interaction of Janus kinases JAK-1 and JAK-2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-1 receptor. *Endocrinology*, 139:884-93
- Haluska P, Shaw HM, Batzel GN, Yin D, Molina JR et al.** (2007) Phase I dose escalation study of the anti-insulin-like growth factor-I receptor monoclonal antibody CP-751,871 in patients with refractory solid tumors. *Clin Cancer Res*, 13(19):5834-40
- Hamelers IH, van Schaik RF, Sipkema J, Sussenbach JS, Steenbergh PH.** (2002) Insulin-like growth factor I triggers nuclear accumulation of cyclin D1 in MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem*, 277:47645-52
- Hartog H, Wesseling J, Boezen MH, van der Graaf WTA.** (2007) The insulin-like growth factor 1 receptor in cancer: old focus, new future. *Euro J Cancer*, 43:1895-1904
- Hellawell GO, Turner GD, Davies DR, Poulson R, Brewster SF et al.** (2002) Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer Res*, 62:2942-50
- Heron-Milhavet L, Karas M, Goldsmith CM, Baum BJ, LeRoith D.** (2001) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor activation rescues UV-damaged cells through a p38 signaling pathway. Potential role of the IGFI receptor in DNA repair. *J Biol Chem*, 276:18185-92
- Heron-Milhavet L, LeRoith D.** (2002) Insulin-like growth factor I induces MDM2-dependent degradation of p53 via the p38 MAPK pathway in response to DNA damage. *J Biol Chem*, 277:15600-606
- Hu-Lieskovan S, Zhang J, Wu L, Shimada H, Schofield DE et al.** (2005) EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumor. *Cancer Res*, 65(11):4633-44

- Hwang PH, Kim SY, Lee JC, Kim SJ, Yi HK et al.** (2005) PTEN/MMAC1 enhances the growth inhibition by anticancer drugs with down regulation of IGF-II expression in gastric cancer cells. *Exp Mol Med*, 37:391-98
- Imsumran A, Adachi Y, Yamamoto H, Li R, Wang Y et al.** (2007) Insulin-like growth factor-I receptor as a marker for prognosis and a therapeutic target in human esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 28(5):947-56
- Jones JI, Clemmons DR.** (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological action. *Endocr Rev*, 16:3-34
- Jones N, Dumont DJ.** (1999) Recruitment of Dok-R to the EGF receptor through its PTB domain is required for attenuation of Erk MAP kinase activation. *Curr Biol*, 9(18):1057-60
- Kalebic T, Tsokos M, Helman LJ.** (1994) In vivo treatment with antibody against IGF-I receptor suppresses growth in human rhabdomyosarcoma and down-regulate p34cdc2. *Cancer Res*, 54:5531-4
- Kaleko M, Rutter WJ, Miller AD.** (1990) Overexpression of the human insulin-like growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation. *Mol Cell Biol*, 10:464-73
- Kappel CC, Vele-Yanguas MC, Hirschfeld S, Helman L.** (1994) Human osteosarcoma cell lines are dependent on insulin-like growth factor I for in vitro growth. *Cancer Res*, 54:2803-807
- Krassas GE, Pontikides N, Kaltsas T, Dumas A, Frystyk J et al.** (2003) Free and total insulin-like growth factor (IGF)-I, -II, and IGF binding protein-1, -2, and -3 serum levels in patients with active thyroid eye disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 88:132-35
- Krause D, Lyons A, Fennelly C, O'Connor R.** (2001) Transient activation of Jun N-terminal kinases and protection from apoptosis by the insulin-like growth factor I receptor can be suppressed by dicumarol. *J Biol Chem*, 276:19244-52
- Kushner BH, Meyers PA.** (2001) How effective is dose-intensive/myeloablative therapy against Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumour metastatic to bone or bone marrow? The Memorial Sloan-Kettering experience and literature review. *J Clin Oncol*, 19:870-80
- Kuttesch JF, Wexler LH, Marcus RB, Fairclough D, Weaver-McClure L et al.** (1996) Second malignancies after Ewing's sarcoma: radiation dose-dependency of secondary sarcomas. *J Clin Oncol*, 14:2818-25
- Laviola L, Giorgino F, Chow JC, vaquero JA, Hansen H et al.** (1997) The adapter protein Grb10 associates preferentially with the insulin receptor as compared with IGF-I receptor in mouse fibroblasts. *J Clin Invest*, 99:830-37
- Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J.** (1996) Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem*, 271:20608-16

- Le Marchand L, Donlon T, Seifried A, Kaaks R, Rinaldi S et al.** (2002) Association of a common polymorphism in the human *GHI* gene with colorectal neoplasia. *J. Natl Cancer Inst*, 94:454-60
- Le Roith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr.** (1995) Molecular and cellular aspects of the insulin like growth factor I receptor. *Endocr Rev*, 16(2):143-63
- Lee CT, Park KH, Adachi Y, Seol JY, Yoo CG et al.** (2003) Recombinant adenoviruses expressing dominant negative insulin-like growth factor-I receptor demonstrate antitumor effects on lung cancer. *Cancer Gene Ther*, 10:57-63
- Lee YI, Lee S, Das GC, Park US, Park SM.** (2000) Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 19:3717-26
- Lessnick SK, Dacwag CS, Golub TR.** (2002) The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI1 induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. *Cancer Cell*, 1:393-401
- Li J, Sahagian GG.** (2004) Demonstration of tumor suppression by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor. *Oncogene*, 23:9359-68
- Li S, Ferber A, Miura M, Baserga R.** (1994) Mitogenicity and transforming activity of the insulin-like growth factor I receptor with mutations in the tyrosine kinase domain. *J Biol Chem*, 269(51):32558-64
- Ling Y, Maile LA, Lieskovska J, Badley-Clarke J, Clemmons DR.** (2005) Role of SHPS-1 in the regulation of insulin-like growth factor I-stimulated Shc and mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *Mol Biol Cell*, 16:3353-64
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A.** (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor-I (IGF-1) and type-1 IGF receptor (IGF1R). *Cell*, 75:59-72
- Ludwig T, Eggenschwiler J, Fisher P, D'Ercole AJ, Davenport ML et al.** (1996) Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in *Igf2* and *Igf1r* null backgrounds. *Dev Biol*, 177:517-35
- Maile LA, Badley-Clarke J, Clemmons DR.** (2003) The association between integrin-associated protein and SHPS-1 regulates insulin like growth factor-I receptor signaling in vascular smooth muscle cells. *Mol Biol Cell*, 14:3519-28
- Maile LA, Clemmons DR.** (2002) Regulation of insulin-like growth factor I receptor dephosphorylation by SHPS-1 and the tyrosine phosphatase SHP-2. *J Biol Chem*, 277:8955-60
- Mastick CC, Kato H, Roberts CT Jr, Le Roith D, Saltiel AR.** (1994) Insulin and insulin-like growth factor-I receptors similarly stimulate deoxyribonucleic acid synthesis despite differences in cellular protein tyrosine phosphorylation. *Endocrinology*, 135:214-22

- Mathieu MC, Clark GM, Allred DC, Goldfine ID, Vigneri R.** (1997) Insulin receptor expression and clinical outcome in node-negative breast cancer. *Proc Assoc Am Physicians*, 109:565-71
- May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC et al.** (1993) Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *PNAS USA*, 90:5752-56
- May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC et al.** (1993) The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol*, 13(12):7393-98
- Milazzo G, Giorgino F, Damante G, Sung C, Stampfer MR et al.** (1992) Insulin receptor expression and function in human breast cancer cell lines. *Cancer Res*, 52:3924-30
- Min Y, Adachi Y, Yamamoto H, Imsumran A, Arimura Y et al.** (2005) Insulin-like growth factor I receptor blockade enhances chemotherapy and radiation responses and inhibits tumour growth in human gastric cancer xenografts. *Gut*, 54:591-600
- Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R et al.** (2004) Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell*, 5:221-30
- Miura M, Surmacz E, Burgaud JL, Baserga R.** (1995) Different effects on mitogenesis and transformation of a mutation at tyrosine 1251 of the insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem*, 270(38):22639-44
- Moelling K, Schad K, Bosse M, Zimmermann S, Schweneker M.** (2002) Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *J Biol Chem*, 277:31099-106
- Morrione A, DeAngelis T, Baserga R.** (1995) Failure of the bovine papillomavirus to transform mouse embryo fibroblasts with a targeted disruption of the insulin-like growth factor I receptor genes. *J Virol*, 69(9):5300-303
- Morrione A, Valentinis B, Xu SQ, Yumet G, Louvi A et al.** (1997) Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor. *PNAS USA*, 94:3777-82
- Mounier C, Posner BI.** (2006) Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can J Physiol Pharmacol* 84:713-24
- Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tschlis PN et al.** (1998) Cyclin D expression is controlled post transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem*, 273:29864-72
- Mur C, Valverde AM, Kahn CR, Benito M.** (2002) Increased insulin sensitivity in IGF-I receptor-deficient brown adipocytes. *Diabetes*, 51:743-54
- Myers Jr MG, Mendez R, Shi P, Pierce JH, Rhoads R et al.** The COOH-terminal tyrosine phosphorylation sites on IRS-1 bind SHP-2 and negatively regulate insulin signaling. *J Biol Chem* 1998; 273:26908-26914

- Niki M, Di Cristofano A, Zhao M, Honda H, Hirai H et al.** (2004) Role of Dok-1 and Dok-2 in leukemia suppression. *J Exp Med*, 200(12):1689-95
- Noguera R, Navarro S, Peydro-Olaya A, Llombart-Bosch A.** (1994) Patterns of differentiation in extrasosseous Ewing's sarcoma cells. An in vitro study. *Cancer*, 73:616-24
- O'Connor R, Kauffmann-Zeh A, Liu Y, Lehar S, Evan GI et al.** (1997) Identification of domains of the insulin-like growth factor I receptor that are required for protection from apoptosis. *Mol Cell Biol*, 17(1):427-35
- Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R et al.** (2002) Insulin/Insulin like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem*, 277(42):39684-95
- Pandini G, Vigneri R, Costantino A, Frasca F, Ippolito A et al.** (1999) Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancer leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signalling. *Clin Cancer Res*, 5:1935-44
- Parrizas M, Gazit A, Levitzki A, Wertheimer E, LeRoith D.** (1997) Specific inhibition of the insulin-like growth factor-1 and insulin receptor tyrosine kinase activity and biological function by tyrphostins. *Endocrinology*, 138:1427-33
- Parrizas M, Saltiel AR, LeRoith D.** (1997) Insulin-like growth factor I inhibits apoptosis using the PI3-K and MAP-K pathways. *J Biol Chem*, 272:154-61
- Paulussen M, Ahrens S, Burdach S, Craft A, Dockhorn-Dworniczak B et al.** (1998) Primary metastatic (stage IV) Ewing tumor: survival analysis of 171 patients from the EICESS studies. European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies. *Ann Oncol*, 9(3):275-81
- Peruzzi F, Prisco M, Dews M, Salomoni P, Grassilli E et al.** (1999) Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Mol Cell Biol*, 19(10):7203-15
- Peyrat JP, Bonneterre J, Laurent JC, Louchez MM, Amrani S et al.** (1988) Presence and characterization of insulin-like growth factor 1 receptors in human benign breast disease. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 24:1425-31
- Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE.** (2004) Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nature Rev*, (4):505-18
- Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O.** (2004). EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol*, 24:7275-83
- Railo MJ, von Smitten K, Pekonen F.** (1994) The prognostic value of insulin-like growth factor-I in breast cancer patients. Results of a follow-up study on 126 patients. *Eur J Cancer*, 30A:307-11
- Reiss K, D'Ambrosio C, Tu X, Tu C, Baserga R.** (1998) Inhibition of tumor growth by a dominant negative mutant of the insulin-like growth factor I receptor with a bystander effect. *Clin Cancer Res*, 4(11):2647-55

- Reiss K, Tu X, Romano G, Peruzzi F, Wang JY et al.** (2001) Intracellular association of a mutant insulin-like growth factor receptor with endogenous receptors. *Clin Cancer Res*, 7(7):2134-44
- Riedemann J, Sohail M, Macaulay VM.** (2007) Dual silencing of the EGF and type 1 IGF receptors suggests dominance of IGF signalling in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 355:700-6
- Riggs N, Cironi L, Provero P, Suvà ML, Kaloulis K et al.** (2005) Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res*, 65:11459-68
- Riggs N, Stamenkovic I.** (2007) The biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett*, 254(1):1-10
- Rochester MA, Riedemann J, Hellowell GO, Brewster SF, Macaulay VM.** (2005) Silencing of the IGF1R gene enhances sensitivity to DNA-damaging agents in both PTEN wild-type and mutant human prostate cancer. *Cancer Gene Ther*, 12:90-100
- Rosen CJ, Pollak M.** (1999) Circulating IGF-I: new perspectives for a new century. *Trends Endocrinol Metab*, 10(4):136-41
- Rother KI, Imai Y, Caruso M, Beguinot F, Formisano P et al.** (1998) Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes. *J Biol Chem*, 273(28):17491-97
- Rubini M, Hongo A, D'Ambrosio C, Baserga R.** (1997) The IGF-I receptor in mitogenesis and transformation of mouse embryo cells: role of receptor number. *Exc Cell Res*, 230:284-92
- Sachdev D, Li SL, Hartell JS, Fujita-Yamaguchi Y, Miller JS et al.** (2003) A chimeric humanized single-chain antibody against the type I insulin-like growth factor (IGF) receptor renders breast cancer cells refractory to the mitogenic effects of IGF-I. *Cancer Res*, 63:627-35
- Sachdev D, Singh R, Fujita-Yamaguchi Y, Yee D.** (2006) Down-regulation of insulin receptor by antibodies against the type I insulin-like growth factor receptor: implications for anti-insulin-like growth factor therapy in breast cancer. *Cancer Res*, 66:2391-402
- Sachdev D, Yee D.** (2007) Disrupting insulin-like growth factor signalling as a potential cancer therapy. *Mol Cancer Ther*, 6(1):1-12
- Salisbury AJ, Macaulay VM.** (2003) Development of molecular agents for IGF receptor Targeting *Horm Metab Res*, 35:843-49
- Samani AA, Brodt P.** (2001) The receptor for the type I insulin-like growth factor and its ligands regulate multiple cellular functions that impact on metastasis. *Surg Oncol Clin N Am*, 10:289-312
- Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P.** (2007) The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev*, 28(1):20-47

**Sasaoka T, Ishiki M, Sawa T, Ishihara H, Takata Y et al.** (1996) Comparison of the insulin and insulin-like growth factor 1 mitogenic intracellular signaling pathways. *Endocrinology*, 137:4427-34

**Schaffer BS, Lin MF, Byrd JC, Park JH, MacDonald RG.** (2003) Opposing roles for the insulin-like growth factor (IGF)-II and mannose 6-phosphate (Man-6-P) binding activities of the IGF-II/Man-6-P receptor in the growth of prostate cancer cells. *Endocrinology*, 144:955-66

**Schernhammer ES, Hankinson SE, Hunter DJ, Blouin MJ, Pollak MN.** (2003) Polymorphic variation at the-202 locus in IGF1BP3: influence on serum levels of insulin-like growth factors, interaction with plasma retinol and vitamin D and breast cancer risk. *Int J Cancer*, 107:60-64

**Sciacca L, Mineo R, Pandini G, Murabito A, Vigneri R et al.** (2002) In IGF-I receptor-deficient leiomyosarcoma cells autocrine IGF-II induces cell invasion and protection from apoptosis *via* the insulin receptor isoform A. *Oncogene*, 21:8240-50

**Sciacchitano S, Orecchio A, Lavra L, Misiti S, Giacchini A et al.** (2002) Cloning of the mouse insulin receptor substrate-3 (mIRS-3) promoter, and its regulation by p53. *Mol Endocrinol*, 16:1577-89

**Scotlandi K, Avnet S, Benini S, Manara MC, Serra M et al.** (2002) Expression of an IGF-I receptor dominant negative mutant induces apoptosis, inhibits tumorigenesis and enhances chemosensitivity in Ewing's sarcoma cells. *Int J Cancer*, 101:11-16

**Scotlandi K, Benini S, Nanni P, Lollini PL, Nicoletti G et al.** (1998) Blockage of insulin-like growth factor-I receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice. *Cancer Res*, 58:4127-31

**Scotlandi K, Benini S, Sarti M, Serra M, Lollini et al.** (1996) Insulin-like growth factor I receptor-mediated circuit in Ewing's sarcoma/Peripheral Neuroectodermal tumor: a possible therapeutic target. *Cancer Res*, 56:4570-74

**Scotlandi K, Maini C, Manara MC, Benini S, Serra M et al.** (2002) Effectiveness of insulin-like growth factor I receptor antisense strategy against Ewing's sarcoma cells. *Cancer Gene Ther*, 9:296-307

**Scotlandi K, Serra M, Manara MC, Benini S, Sarti M et al.** (1996) Immunostaining of the p30/32MIC2 antigen and molecular detection of EWS rearrangements for the diagnosis of Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor. *Hum Pathol*, 27(4):408-16

**Sell C, Baserga R, Rubin R.** (1995) Insulin-like growth factor I (IGF-I) and the IGF-I receptor prevent etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res*, 55(2):303-6

**Sell C, Dumenil G, Deveaid C, Miura M, Coppola D et al.** (1994) Effect of a null mutation of the Type 1 IGF receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 14:3604-12

**Sell C, Rubini M, Rubin R, Liu JP, Efstratiadis A et al.** (1993) Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *PNAS USA*, 90:11217-21

- Shefi-Friedman L, Wertheimer E, Shen S, Bak A, Accili D et al.** (2001) Increased IGF activity and glucose transport in cultured skeletal muscle from insulin receptor null mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281:E16-24
- Shimizu C, Hasegawa T, Tani Y, Takahashi F, Takeuchi M et al.** (2004) Expression of insulin-like growth factor 1 receptor in primary breast cancer: immunohistochemical analysis. *Hum Pathol*, 35:1537-42
- Soni P, Lakkis M, Poy MN, Fernstrom MA, Najjar SM.** (2000) The differential effects of pp120 (Ceacam 1) on the mitogenic action of insulin and insulin-like growth factor 1 are regulated by the nonconserved tyrosine 1316 in the insulin receptor. *Mol Cell Biol*, 20:3896-905
- Souza RF, Wang S, Thakar M, Smolinski KN, Yin J et al.** (1999) Expression of the wild-type insulin-like growth factor II receptor gene suppresses growth and causes death in colorectal carcinoma cells. *Oncogene*, 18:4063-68
- Spentzos D, Cannistra SA, Grall F, Levine DA, Pillay K et al.** (2007) IGF axis gene expression patterns are prognostic of survival in epithelial ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer*, 14(3):781-90
- Steller MA, Zou Z, Schiller JT, Baserga R.** (1996) Transformation by human papillomavirus 16 E6 and E7: role of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Cancer Res*, 56(21):5087-91
- Stramiello R, Benini S, Manara MC, Perdichizzi S, Serra M et al.** (2003) Impact of IGF-I/IGF-IR circuit on angiogenetic properties of Ewing's sarcoma cells. *Horm Metab Res*, 35:1-10
- Stromberg T, Ekman S, Girnita L, Dimberg LY, Larsson O et al.** (2006) IGF-1 receptor tyrosine kinase inhibition by the cyclolignan PPP induces G2/M-phase accumulation and apoptosis in multiple myeloma cells. *Blood*, 107:669-78
- Surmacz E, Sell C, Swantek J, Kato H, Roberts CT Jr et al.** (1995) Dissociation of mitogenesis and transforming activity by the C-terminal truncation of the insulin-like growth factor-I receptor. *Exp Cell Res*, 218(1):370-80
- Tanno B, Mancini C, Vitali R, Mancuso M, McDowell HP et al.** (2006) Down-regulation of insulin-like growth factor I receptor activity by NVP-AEW541 has an antitumor effect on neuroblastoma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*, 12(22):6772-80
- Tazzari PL, Tabellini G, Bortul R, Papa V, Evangelisti C et al.** (2007) The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells exhibiting autocrine insulin-like growth factor-I secretion. *Leukemia*, 21(5):886-96
- Tennant MK, Thrasher JB, Twomey PA, Drivdahl RH, Birnbaum RS et al.** (1996) Protein and messenger ribonucleic acid (mRNA) for the type 1 insulin-like growth factor (IGF) receptor is decreased and IGF-II mRNA is increased in human prostate carcinoma compared to benign prostate epithelium. *J Clin Endocrinol Metab*, 81:3774-82



- Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, Delorme B, Charbord P et al.** (2007) Mesenchymal Stem Cell Features of Ewing Tumors. *Cancer cell*, 11:421-29
- Toretsky JA, Kalebic T, Blakesley V, LeRoith D, Helman LJ.** (1997) The insulin-like growth factor-I receptor is required for EWS/FLI-1 transformation of fibroblasts. *J Biol Chem*, 272(49):30822-27
- Toretsky JA, Steinberg SM, Thakar M, Counts D, Pironis B et al.** (2001) Insulin-like growth factor type I (IGF-I) and IGF binding protein-3 in patients with Ewing sarcoma family of tumors. *Cancer*, 92:9241-47
- Toretsky JA, Thakar M, Eskenazi AE, Frantz CN.** (1999) Phosphoinositide 3-hydroxide kinase blockade enhances apoptosis in the Ewing's sarcoma family of tumors. *Cancer Res*, 59:5745-50
- Ueda S, Tsuda H, Sato K, Takeuchi H, Shigekawa T et al.** (2006) Alternative tyrosine phosphorylation of signaling kinases according to hormone receptor status in breast cancer overexpressing the insulin-like growth factor receptor type I. *Cancer Sci*, 97:597-604
- Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M et al.** (1986) Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J*, 5:2503-12
- Ushigome S, Machinami R, Sorensen PH.** (2003) Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor, in Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F (Eds), WHO Classification of tumors, pathology and genetics, tumors of soft tissue and bone
- Valentinis B, Morrione A, Taylor SJ, Baserga R.** (1997) Insulin-like growth factor 1 receptor signaling in transformation by src oncogenes. *Mol Cell Biol*, 17:3744-54
- Van Valen F.** (1999) Ewing's Sarcoma Family of Tumors. *Human Cell Culture*, Vol. 1, 55-85, Masters and B. Palsson (eds.)
- Vasilcanu D, Weng WH, Girnita A, Lui WO, Vasilcanu R et al.** (2006) The insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor PPP produces only very limited resistance in tumor cells exposed to long-term selection. *Oncogene*, 25 3186-95
- Vecchione A, Marchese A, Henry P, Rotin D, Morrione A.** (2003) The Grb10/Nedd4 complex regulates ligand-induced ubiquitination and stability of the insulin-like growth factor I receptor. *Mol Cell Biol*, 23:3363-72
- Vella V, Pandini G, Sciacca L, Mineo R, Vigneri R et al.** (2002) A novel autocrine loop involving IGF-II and the insulin receptor isoform-A stimulates growth of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol*, 87:245-54
- Wang L, Habuchi T, Tsuchiya N, Mitsumori K, Ohyama C et al.** (2003) Insulin-like growth factor-binding protein-3 gene-202 A/C polymorphism is correlated with advanced disease status in prostate cancer. *Cancer Res*, 63:4407-11
- Wang S, Souza RF, Kong D, Yin J, Smolinski KN et al.** (1997) Deficient transforming growth factor- $\beta$ 1 activation and excessive insulin-like growth factor II (IGFII) expression in IGFII receptor-mutant tumors. *Cancer Res*, 57:2543-46

- Wang YZ, Wong YC.** (1998) Sex hormone-induced prostatic carcinogenesis in the noble rat: the role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the development of prostate cancer. *Prostate*, 35:165-77
- Weber KL.** (2002) Current concepts in the treatment of Ewing's sarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2(6):687-94
- Webster NJ, Resnik JL, Reichart DB, Strauss B, Haas M et al.** (1996) Repression of the insulin receptor promoter by the tumor suppressor gene product p53: a possible mechanism for receptor overexpression in breast cancer. *Cancer Res*, 56:2781-88
- Werner H, Karnieli E, Rauscher FJ, LeRoith D.** (1996) Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *PNAS USA*, 93:8318-23
- Werner H, Shalita-Chesner M, Abramovitch S, Idelman G, Shaharabani-Gargir L et al.** (2000) Regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene by oncogenes and antioncogenes: implications in human cancer. *Mol Genet Metab*, 71:315-20
- Wu JD, Odman A, Higgins LM, Haugk K, Vessella R et al.** (2005) In vivo effects of the human type I insulin-like growth factor receptor antibody A12 on androgen-dependent and androgen-independent xenograft human prostate tumors. *Clin Cancer Res*, 11:3065-74
- Wu Y, Yakar S, Zhao L, Hennighausen L, LeRoith D.** (2002) Circulating insulin-like growth factor-1 levels regulate colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res*, 62:1030-35
- Xu YQ, Grundy P, Polychronakos C.** (1997) Aberrant imprinting of the insulin-like growth factor II receptor gene in Wilms' tumor. *Oncogene*, 14:1041-46
- Yamada T, De Souza AT, Finkelstein S, Jirtle RL.** (1997) Loss of the gene encoding mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is an early event in liver carcinogenesis. *PNAS USA*, 94:10351-55
- Yasuda T, Shirakata M, Iwama A, Ishii A, Ebihara Y et al.** (2004) Role of Dok-1 and Dok-2 in myeloid homeostasis and suppression of leukemia. *J Exp Med*, 200(12):1681-7
- Yeh AH, Bohula EA, Macaulay VM.** (2006) Human melanoma cells expressing V600E B-RAF are susceptible to IGF1R targeting by small interfering RNAs. *Oncogene*, 25:6574-81
- Yi HK, Kim SY, Hwang PH, Kim CY, Yang DH et al.** (2005) Impact of PTEN on the expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in human gastric adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 330:760-67
- Youngren JF, Gable K, Penaranda C, Maddux BA, Zavodovskaya M et al.** (2005) Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibits the IGF-1 and c-erbB2/HER2/neu receptors and suppresses growth in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 94:37-46
- Zhang D, Brodt P.** (2003) Type 1 insulin-like growth factor regulates MT1-MMP synthesis and tumor invasion via PI 3-kinase/Akt signaling. *Oncogene*, 22:974-82

- Zhang H, Pelzer AM, Kiang DT, Yee D.** (2007) Down-regulation of type I insulin-like growth factor receptor increases sensitivity of breast cancer cells to insulin. *Cancer Res*, 1:391-97
- Zhang J, Trent JM, Meltzer PS.** (1993) Rapid isolation and characterization of amplified DNA by chromosome microdissection: identification of IGF1R amplification in malignant melanoma. *Oncogene*, 8:2827-31
- Zhang L, Kashanchi F, Zhan Q, Zhan S, Brady JN et al.** (1996) Regulation of insulin-like growth factor II P3 promoter by p53: a potential mechanism for tumorigenesis. *Cancer Res*, 56:1367-73
- Zhang L, Zhan Q, Zhan S, Kashanchi F, Fornace Jr AJ et al.** (1998) p53 regulates human insulin-like growth factor II gene expression through active P4 promoter in rhabdomyosarcoma cells. *DNA Cell Biol*, 17:125-31
- Zhao H, Dupont J, Yakar S, Karas M, LeRoith D.** (2004) PTEN inhibits cell proliferation and induces apoptosis by downregulating cell surface IGF-IR expression in prostate cancer cells. *Oncogene*, 23:786-94
- Zia F, Jacobs S, Kull F, Cuttitta F, Mulshine JL et al.** (1996) Monoclonal antibody  $\alpha$ IR-3 inhibits non-small cell lung cancer growth in vitro and in vivo. *J Cell Biochem*, 24:269-75
- Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D et al.** (2006) RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441:111-14
- Zong CS, Chan J, Levy DE, Horvath C, Sadowski HB et al.** (2000) Mechanism of STAT3 activation by insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem*, 275:15099-105
- Zong CS, Zeng L, Jiang Y, Sadowski HB, Wang LH.** (1998) Stat3 plays an important role in oncogenic Ros- and insulin-like growth factor I receptor-induced anchorage-independent growth. *J Biol Chem*, 273:28065-72