

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

Dottorato di Ricerca in Scienze Morfologiche Umane e Molecolari

XX Ciclo

Settore Disciplinare BIO/16

**TRASDUZIONE DEL SEGNALE
INOSITIDE-DIPENDENTE NEL CARCINOMA
DELLA MAMMELLA**

Presentata da: **DOTT.SSA CHIARA MOLINARI**

Coordinatore Dottorato

CHIAR.MO PROF. LUCIO COCCO

Relatore

CHIAR.MO PROF. LUCIO COCCO

Esame Finale 2008

INDICE

Introduzione	3
1. Carcinoma della mammella	4
1.1 Parametri di caratterizzazione biopatologica	6
1.2 Classificazione biomolecolare	10
1.3 Aneuploidie e carcinoma della mammella	11
2. Via di segnalazione inositide-dipendente: PI-PLC	12
2.1 PI-PLC β 1	14
2.2 Via di segnalazione fosfoinositide-dipendente e crosstalk con altri pathways	18
Scopo della ricerca	20
Materiali e Metodi	23
1. Caratteristiche dei pazienti	24
2. Analisi Immunoistochimica	24
3. Marcatura diretta della sonda per il gene PLCB1	25
4. Ibridazione in situ fluorescente	26
5. Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA	27
6. Real-Time PCR	28
7. Analisi statistica	29
Risultati	30
1. Caratteristiche dei pazienti	31
2. Studio dell'assetto genico della PI-PLC β 1 mediante FISH	34
3. Studio dell'espressione genica della PI-PLC β 1 mediante Real-Time PCR	37
4. Studio dell'espressione proteica della PI-PLC β 1 mediante immunoistochimica	41

5. Concoranza tra FISH, Real-Time PCR ed IIC	44
6. Correlazione tra la PI-PLC β 1 ed altri parametri clinico-patologici	45
7. PI-PLC β 1 e prognosi nel tumore mammario	47
Discussione	48
Bibliografia	54

INTRODUZIONE

1. Carcinoma della mammella

Il carcinoma della mammella è la più frequente neoplasia maligna nelle donne.

L'incidenza, più alta nei paesi industrializzati dell'Occidente, nelle aree urbane e nelle classi sociali più elevate (Wilson *et al*, 2004), negli ultimi anni è notevolmente aumentata grazie al miglioramento dei mezzi diagnostici che consentono una diagnosi precoce della neoplasia.

In Italia si stima che ogni anno si registrino 300.000 nuovi casi di tumore al seno: a causa di una incidenza così elevata, che rende questo tumore una malattia con un impatto sociale non trascurabile, e della sua elevata eterogeneità, vi è un forte stimolo mirato all'individuazione di nuovi marcatori, da affiancare a quelli già consolidati, per una più completa caratterizzazione molecolare della neoplasia.

L'evoluzione del carcinoma della mammella e la relazione tra fattori genetici predisponenti (ad esempio BRCA1/2) e cambiamenti somatici è molto complessa.

Analisi citogenetiche e di genetica molecolare hanno fatto emergere come lo sviluppo di un carcinoma primario della mammella, così come avviene anche per altre neoplasie, derivi da un processo *multistep* caratterizzato dall'accumulo di varie alterazioni genetiche (Beckmann *et al*, 1997). Tra i modelli esistenti, uno dei maggiormente riconosciuti è quello proposto da Wellings e Jansen (Figura 1), nel quale, a partire dall'epitelio normale, si può avere lo sviluppo di una iperplasia che, successivamente, può diventare lesione premaligna, carcinoma *in situ* ed infine carcinoma invasivo capace di metastatizzare (Wellings *et al*, 1973; Wellings *et al*, 1975).

Tale modello, inizialmente basato solo su evidenze istologiche, è rimasto valido anche alla luce delle più recenti scoperte. In particolare, queste ultime hanno mostrato come determinate alterazioni genetiche si mantengano durante l'evoluzione della lesione e come vi sia una forte correlazione tra il rischio di sviluppare un carcinoma invasivo e la tipologia della lesione precursore (Allred *et al*, 2004; Allred *et al*, 2008).

Questo implica che tutti i carcinomi invasivi inizialmente si sono sviluppati da lesioni *in situ* che, stocasticamente, hanno subito alterazioni genetiche ed epigenetiche che hanno influenzato la morfologia e le funzioni cellulari. Ciò tuttavia non significa che ogni carcinoma *in situ* progredirà a carcinoma invasivo (Peterse *et al*, 2003).

Il carcinoma *in situ*, generalmente intraduttale (DCIS), è per definizione un tumore che non supera la membrana basale del dotto, formato dunque da cellule dell'epitelio ghiandolare

proliferanti e con caratteristiche maligne, ma localizzate all'interno di una regione ben definita.

In era pre-mammografica il carcinoma intraduttale clinicamente evidente non era di frequente riscontro (<5% di tutti i tumori palpabili). Nell'ultimo ventennio la notevole diffusione dello screening mammografico ha mutato radicalmente la sua incidenza, permettendo di scoprire tali lesioni allo stadio preclinico. Pertanto, l'incidenza attuale dei DCIS è circa pari al 15-20% di tutti i carcinomi della mammella.

Successivamente, quando il tumore tende a superare la membrana basale, diventa microinfiltrante ed invasivo, acquistando così la capacità di diffondersi attraverso il sistema emo-linfatico ad altri organi.

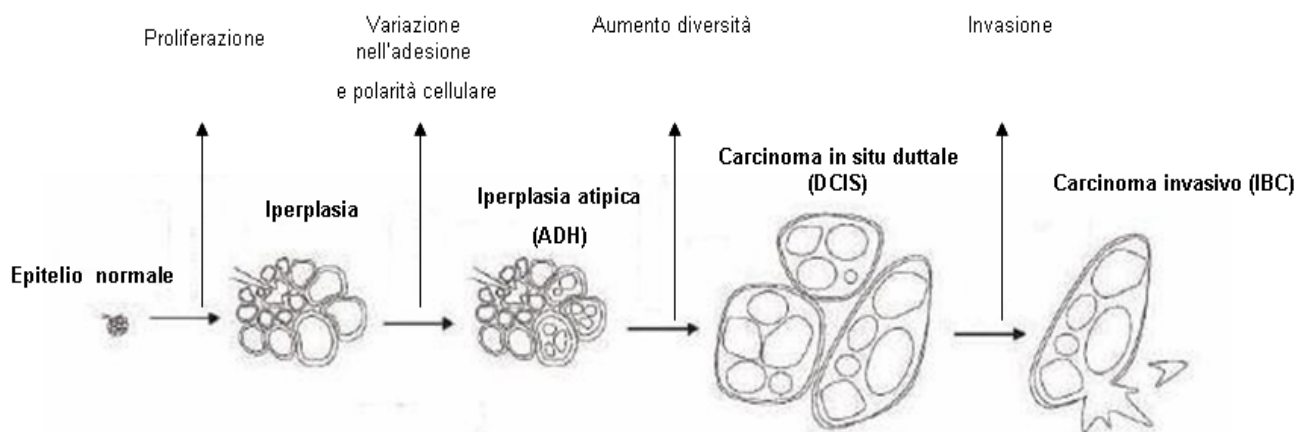
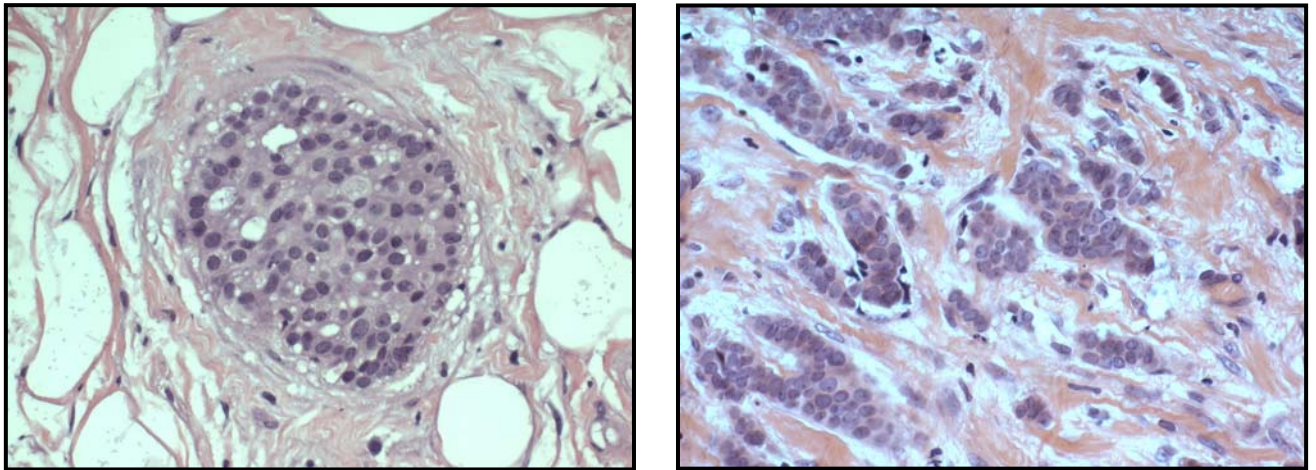


Figura 1. Modello di evoluzione del carcinoma mammario proposto da Wellings e Jensen . Il modello propone una progressione lineare continua, ma non obbligatoria, dall'epitelio normale al carcinoma invasivo.



A

B

Figura 2. Carcinomi della mammella.

A) Carcinoma duttale in situ (DCIS). B) Carcinoma infiltrante (IBC)

1.1 Parametri di caratterizzazione biopatologica

La classificazione dei tumori della mammella si basa prevalentemente su caratteristiche morfologiche (WHO 1981; Rosen *et al*, 1996; Tavassoli *et al*, 2003), quali il grado di differenziazione tumorale, la dimensione del tumore (T), la presenza o meno di metastasi linfonodali (N) o a distanza (M).

Nella mammella il sistema più comune di assegnazione del grado tumorale è quello di Bloom-Richardson (Tabella 1): in esso il grado è calcolato a partire da determinati *scores* che considerano la velocità di divisione cellulare, il pleomorfismo nucleare e la formazione di microtubuli.

Tuttavia, per i tumori *in situ*, la classificazione del grado è a sé stante (classificazione di Holland) e tiene conto di criteri diversi, quali l'atipia cellulare e la necrosi intraluminale.

Classificazione del grado secondo Bloom-Richardson				
Grado	Descrizione	Score	Sopravvivenza a 5 anni	Sopravvivenza a 7 anni
Grado 1 (basso)	Cellule di mammella ben differenziate, dall'aspetto normale e dalla crescita lenta. Tumore strutturato in piccoli tubuli	3, 4, 5	95%	90%
Grado 2 (intermedio)	Cellule di mammella moderatamente differenziate, con caratteristiche intermedie tra il grado 1 e il grado 3	6, 7	75%	63%
Grado 3 (alto)	Cellule di mammella poco differenziate, dall'aspetto anormale, con forte tendenza alla crescita e alla metastatizzazione	8, 9	50%	45%

Tabella 1. Classificazione del grado tumorale secondo Bloom-Richardson

Negli ultimi anni hanno acquisito sempre maggiore importanza una serie di nuovi parametri, non identificabili con l'istologia tradizionale, come lo sono invece il tipo istologico e il grado, ma comunque molto importanti per una corretta indicazione terapeutica e per una valutazione prognostica dei singoli casi.

- **Recettori ormonali**

Da oltre venti anni la determinazione immunocitochimica sui tessuti tumorali dei recettori ormonali (recettori per estrogeno e progesterone) è utilizzata per una corretta valutazione biologica di tali parametri, al fine di poter dare al clinico precise indicazioni terapeutiche.

Circa il 60-75% di tutti i tumori mammari esprime i recettori per gli estrogeni e circa il 55-70% quelli per il progesterone (Beckmann *et al*, 1997).

Una elevata concentrazione di tali recettori non solo è altamente predittiva della risposta alla terapia ormonale, ma, dato che in genere la loro presenza si accompagna ad una maggiore differenziazione, può essere utile anche nella stima della sopravvivenza libera da malattia (Mansour *et al*, 1994; Bast *et al*, 2001)

- **Indici di proliferazione**

Tra gli altri parametri routinariamente utilizzati in clinica per il tumore della mammella vi sono gli indici che misurano la proliferazione cellulare. I più diffusamente impiegati sono la valutazione in immunocitochimica dell'antigene nucleare Ki67, alla elevata concentrazione del quale si accompagna una maggiore aggressività della lesione; la determinazione della cinetica cellulare mediante captazione di timidina triziata (TLI: thymidine labeling index); la valutazione dell' INDICE DI ATTIVITA' MITOTICA (MAI). Quest'ultimo è uno dei criteri di determinazione del grading istologico nei carcinomi duttali infiltranti, è direttamente correlato alla dimensione del tumore, inversamente correlato ai recettori steroidei e non è in relazione con lo stato menopausale o l'età. Il MAI misura l'attività mitotica del tumore espressa come numero di mitosi presenti in 10 campi a forte ingrandimento (Figura 3): in linea di massima sembra che le pazienti con più di 4-5 figure mitotiche per 10 campi abbiano una probabilità quasi 3 volte maggiore di soccombere alla malattia (Medri *et al*, 2003).

Dunque, nonostante sia necessaria una standardizzazione degli *steps* analitici ed un buon controllo di qualità, l'indice di attività mitotica ha un ruolo nell'influenzare la sopravvivenza a lungo termine.

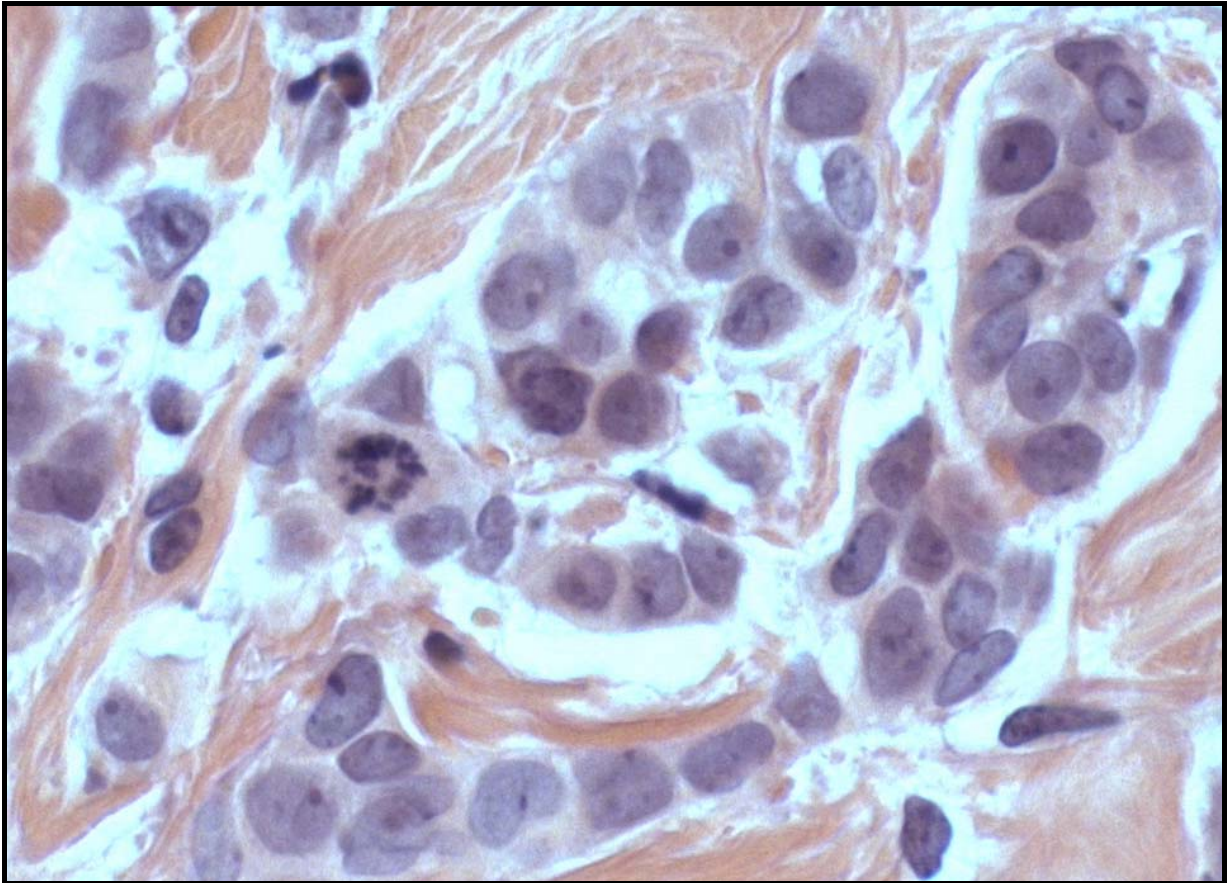


Figura 3. Cellule neoplastiche di mammella in mitosi

- **HER2-neu**

In questi ultimi anni un marcatore che si è rivelato molto importante per una corretta scelta terapeutica e per la valutazione prognostica dei pazienti affetti da neoplasia mammaria è HER2-neu: tale *marker* è un recettore tirosin chinasi appartenente alla famiglia degli EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), che risulta overespresso in circa il 25-30% dei carcinomi della mammella (Slamon *et al*, 1989).

Il fatto che l'overespressione di HER2 sia presente solo nella componente tumorale del tessuto mammario, specialmente nei DCIS e nelle forme più indifferenziate dei carcinomi infiltranti, fa di questa proteina un ottimo *target* terapeutico ed un buon marcatore di prognosi avversa.

Per la sua valutazione i metodi più comunemente usati sono l'immunoistochimica che rileva l'espressione della proteina a livello della membrana cellulare, e la FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), che evidenzia lo stato del gene HER2. I pazienti in cui

risulta l'amplificazione del gene o la overespressione della proteina sono buoni candidati per la terapia con Trastuzumab, anticorpo monoclonale diretto specificatamente contro questo recettore.

Oltre a tali parametri, nelle varie consensus (S.Gallen ecc.) sono stati considerati utili per una corretta caratterizzazione biopatologica ed importanti dal punto di vista della ricaduta clinica i seguenti marcatori:

- **EGFR** (recettore per il fattore di crescita epidermica):

Fa parte dei recettori cellulari sensibili alla tirosin kinasi ed è iperespresso nel 35-60% dei tumori mammari; il suo reale significato prognostico è ancora da valutare; sembra comunque certo che la sua sovra-espressione sia correlata con una resistenza alla terapia ormonale, anche nelle pazienti ER+PgR+.

- **P53:**

p53 è un gene oncosoppressore, localizzato sul cromosoma 17 (come EGFR) che appare alterato in molte malattie neoplastiche: nel carcinoma mammario la mutazione di questo gene è piuttosto frequente e riflette un andamento sfavorevole, specialmente nelle pazienti con linfonodi ascellari metastatizzati.

1.2 Classificazione biomolecolare

Le recenti analisi genomiche sul larga scala hanno focalizzato l'attenzione sul ruolo di interi programmi trascrizionali alternativi nel determinare la diversità fenotipica osservata nei tumori della mammella.

In particolare gli studi sui profili di espressione genica hanno condotto alla definizione di vari sottotipi di carcinoma mammario, che rappresentano distinte entità biologiche e possono richiedere differenti strategie terapeutiche (Sorlie *et al*, 2006; Perou *et al*, 2000; Tan *et al*, 2008; Van't Veer *et al*, 2002).

I carcinomi "luminali" sono caratterizzati dall'espressione dei recettori estrogenici e dei geni a questi associati.

Una iperespressione di HER2-neu, frequentemente sottesa da amplificazione genica,

rappresenta il fondamentale stimolo proliferativo nel sottotipo “HER2 positivo”.

I carcinomi cosiddetti “tripli negativi” sono privi sia dei recettori ormonali che di HER2-neu, e comprendono come sottotipo principale i tumori “simil-basali”.

I vari sottotipi tumorali, risultanti da processi patogenetici diversi, riconoscono già ora indicazioni terapeutiche distinte, che vedono l’impiego di terapie selettive quali la endocrinoterapia nei tumori luminali e gli inibitori di HER2-neu nei carcinomi HER2 positivi.

Una migliore definizione delle caratteristiche biologiche dei tumori tripli negativi potrà consentire in futuro l’impiego di terapie selettive anche in questi sottotipi tumorali, per i quali, al momento, la chemioterapia rimane il solo trattamento standard.

1.3 Aneuploidie e carcinoma della mammella

Nel carcinoma della mammella, la frequenza dei tumori aneuploidi è piuttosto elevata e varia tra il 45% e il 70% dei casi. In generale l’aneuploidia è direttamente correlata ad una scarsa differenziazione, alla proliferazione cellulare, alla perdita dei recettori steroidei, ma non allo stadio della malattia (Silvestrini *et al*, 2000).

Aneusomie cromosoma specifiche sono spesso associate a fattori prognostici e alla progressione della malattia (Persons *et al*, 1996): in particolare, l’amplificazione genica è un importante e frequente meccanismo di iperespressione di determinati oncogeni e per questo gioca un ruolo fondamentale nella regolazione della crescita e sopravvivenza cellulare.

Analisi di *Comparative Genomic Hybridization* su DCIS hanno mostrato numerose amplificazioni (1q, 5p, 6q, 8q, 17q, 19q, 20p e 20q) e delezioni (2q, 5q, 6q, 8p, 9p, 11q, 13q, 1q, 16q, 17p, 22q), simili a quelle identificate nei carcinomi invasivi, ad ulteriore supporto dell’idea che i carcinomi *in situ* siano la lesione precursore (Reis-Filho *et al*, 2003; James *et al*, 1997).

Numerosi studi hanno focalizzato l’attenzione sulle alterazioni strutturali ed/o aneuploidie del cromosoma 20, frequentemente alterato anche in altre neoplasie (tumori dell’ovaio, della prostata, della vescica, del colon e del pancreas) e dimostratosi essere coinvolto nei meccanismi di iniziazione e progressione del tumore della mammella.

La polisomia di questo cromosoma è stata riscontrata in molti carcinomi duttali, con percentuali fino al 90%, contro il 4% di monosomia e il 6% di disomia (Nakopoulou *et al*,

2002). Oltre ad essere un' alterazione frequente, l'associazione di alti livelli di polisomia con una sopravvivenza peggiore, rende questo parametro un buon indicatore prognostico nel carcinoma mammario.

In particolare amplificazioni a livello del braccio lungo del cromosoma 20 (20q12-13), presenti nel 5-40% delle neoplasie mammarie, si associano ad immortalizzazione cellulare, instabilità genomica e fenotipo più aggressivo, nonostante il loro impatto sulla prognosi rimanga ancora non del tutto chiaro (Isola *et al*, 1995; Ginestier *et al*, 2006; Letessier *et al*, 2006; Tanner *et al*, 1995, Hodgson *et al*, 2003).

2. Via di segnalazione inositide-dipendente: PI-PLC

Il metabolismo dei fosfoinositidi riveste un ruolo fondamentale nella segnalazione cellulare e nel traffico di membrana (Berridge *et al*, 1989). Uno degli enzimi chiave di questo metabolismo è la fosfolipasi C fosfoinositide dipendente (PI-PLC), la quale, in risposta a molteplici stimoli che agiscono su specifici recettori della membrana plasmatica (ormoni, fattori di crescita, neurotrasmettitori), catalizza l'idrolisi del fosfatidil-inositolo 4,5-bisfosfato (PIP₂), inducendo la formazione di diacilglicerolo (DAG) e di inositolo-1,4,5-trisfosfato (IP₃). A loro volta, questi due secondi messaggeri intracellulari, attivando la PKC e il rilascio di Ca²⁺ dai depositi, hanno importanti conseguenze sui processi di comunicazione cellulare, secrezione, proliferazione e differenziazione (Rhee *et al*, 2001; Cocco *et al*, 2001).

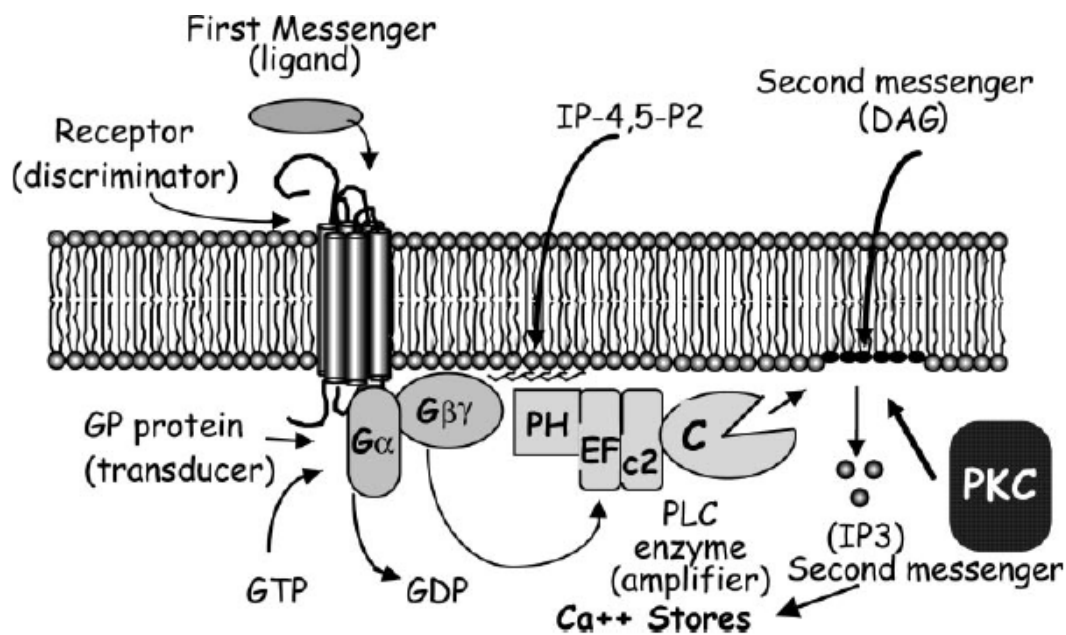


Figura 4. Via di segnalazione dei fosfoinositidi di membrana

Nei mammiferi la famiglia delle PI-PLC si compone di varie isoforme diverse nella struttura, nel meccanismo di attivazione e nella distribuzione tissutale e per questo raggruppate in 6 diverse classi: PLC β_{1-4} ; PLC γ_{1-2} ; PLC δ_{1-4} ; PLC ϵ ; PLC ζ ; PLC η_{1-2} . Tali enzimi agiscono come effettori a valle di recettori di membrana associati a proteine G (GPCR) o di recettori tirosin chinasi (Rhee *et al*, 2001; Rebecchi *et al*, 2000).

Evidenze indicano che nel carcinoma della mammella, così come in numerose altre neoplasie, vi sia una alterata espressione di alcune isoforme di PLC, nonostante il loro coinvolgimento nella trasformazione neoplastica non sia ancora del tutto chiaro.

Studi indicano, ad esempio, che l'iperregolazione della PLC γ_1 e la PLC δ_4 nel cancro della mammella gioca un ruolo importante nella migrazione cellulare, nella proliferazione e nella progressione tumorale guidata da EGFR (Kassis *et al*, 1999; Leung *et al*, 2004).

Anche l'isoforma PLC β_2 è iperespressa in un'alta percentuale di tumori mammari: la sua stretta correlazione con il grado istologico e l'indice proliferativo suggerisce che la PLC β_2 possa riflettere lo stato differenziativo delle cellule tumorali, influenzando negativamente la prognosi delle pazienti che la iperesprimono (Bertagnolo *et al*, 2006).

Negli ultimi anni, numerosi studi hanno evidenziato come a livello nucleare esista un metabolismo indipendente dei fosfoinositidi che non è semplicemente una duplicazione di ciò che avviene sulla membrana plasmatica, ma risponde a stimoli differenti e può modulare diversi processi cellulari (Irvine *et al*, 2003).

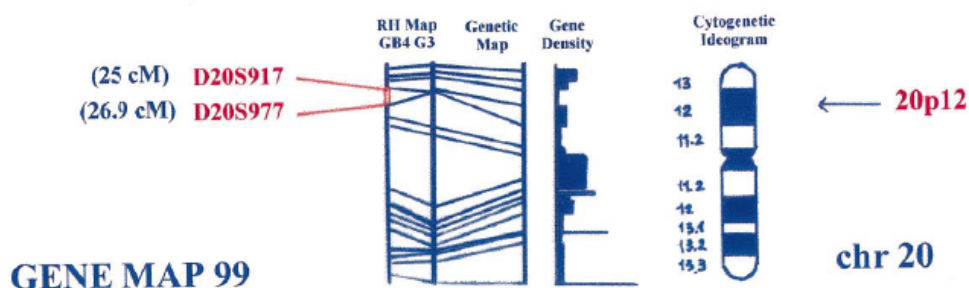
Il mediatore principale del ciclo nucleare dei fosfoinositidi è l' isoforma PLC β 1.

2.1 PI-PLC β 1

Il gene per la PLC β 1 è stato mappato, mediante metodica FISH, sul braccio corto del cromosoma 20, nel locus 20p12.3, noto per essere amplificato/deleto in molti tumori solidi. Il gene copre una regione sul genoma di 250 kbp ed è formato da 36 piccoli esoni e 35 introni molto grandi (Peruzzi *et al*, 2000). Nella regione 5'-UTR e nella regione 3'- UTR esistono 2 siti di splicing alternativo, che permettono la produzione di due isozimi, denominati a e b (Peruzzi *et al*, 2002).

Come mostrato in Figura 5, se il sito di splicing si trova nella regione 5'-UTR, nell'isozima 1b è presente un esone aggiuntivo contenente un codone di stop che induce la formazione di una proteina troncata che ha un peso molecolare di circa 140 kDa, mentre l'isozima 1a dà origine ad una proteina di circa 150 kDa. Invece, se il sito di splicing alternativo è presente nella regione 3'-UTR, si ha la formazione di una diversa regione 3'-UTR che dà origine ad un altro isozima 1b, che produce anch'esso una proteina più corta.

A



B

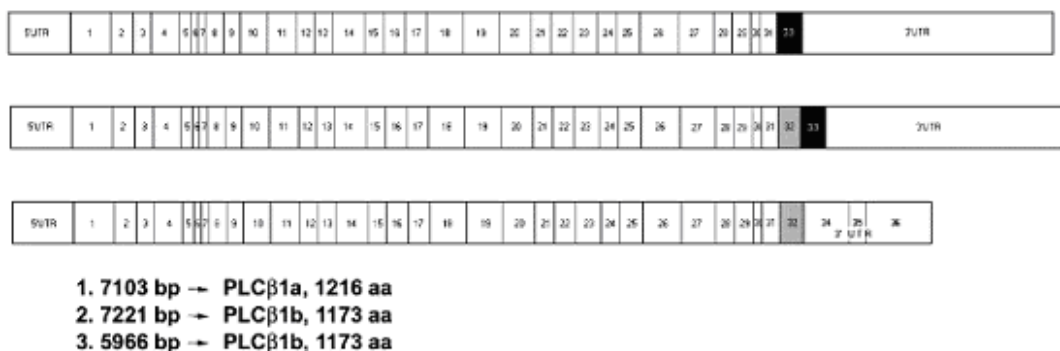


Figura 5. A) Rappresentazione schematica della localizzazione genica della PLCβ1; B) Struttura del cDNA della PI-PLCβ1: dall'alto al basso sono presenti il cDNA della PI-PLCβ1a, della PI-PLCβ1b e della PI-PLCβ1b derivante dallo splicing alternativo che coinvolge un diverso 3'UTR.

La PI-PLCβ1 esiste dunque sottoforma di due diversi polipeptidi di diverso peso molecolare: la PI-PLCβ1a (150 kDa) e PI-PLCβ1b (140 kDa).

Le loro sequenze proteiche condividono molto delle caratteristiche strutturali degli altri membri della famiglia di PI-PLC, compreso il dominio catalitico (X e Y), altamente conservato, le regioni di legame ai fosfolipidi di membrana, il dominio PH (Pleckstrin Homology) e C2 (Figura 6).

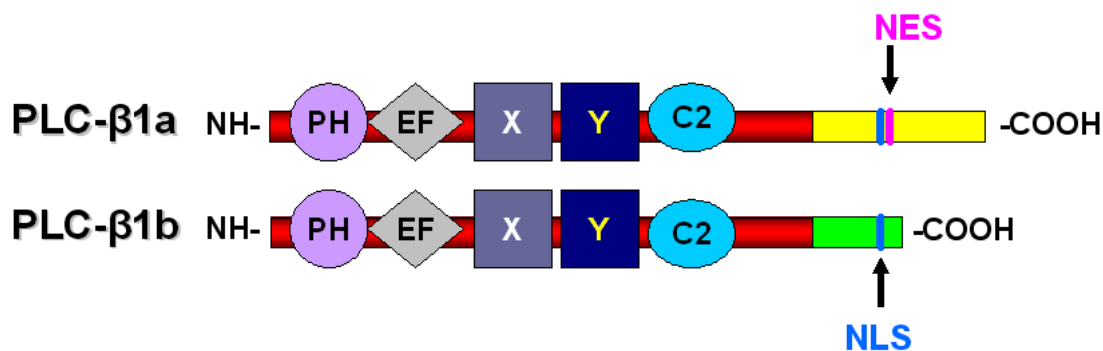


Figura 6. Domini funzionali delle proteine codificate dal gene della PI-PLC β 1

Nonostante ciò le isoforme b si distinguono per la presenza di una regione C-terminale, contenente i determinanti dell'interazione con G α q, le sequenze di localizzazione nucleare (NLS), di attivazione dell'enzima a livello nucleare e di terminazione dell'attivazione (Rhee *et al*, 2001; Rebecchi *et al*, 2000; Follo *et al*, 2005).

Le isoforme PI-PLC β 1a e PI-PLC β 1b differiscono per la loro localizzazione cellulare, in quanto la 1b si trova prevalentemente nel nucleo, mentre la 1a è distribuita nei due compartimenti, con prevalente localizzazione citoplasmatica, possedendo anche un segnale di esportazione nucleare (NES) (Bahk *et al*, 1998).

Come evidenziato in precedenza, i meccanismi di attivazione dell'enzima nei due compartimenti è totalmente indipendente. A livello citoplasmatico la PI-PLC β 1 viene attivata grazie all'interazione con la subunità G α q attivata delle proteine G (Lee *et al*, 1992). Infatti, tale subunità interagisce con il dominio C2 e i residui della regione C-terminale (Park *et al*, 1993) della PI-PLC β 1 ancorata a livello della membrana plasmatica in seguito all'interazione del suo dominio PH con il fosfatidil-inositolo-3,4,5 trisfosfato (PIP3) (Razzini *et al*, 2000).

Nel nucleo, invece, l'attivazione avviene mediante un meccanismo fosforilativo (porzione C-Terminale, residui amminoacidici 980-983) operato dalla MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) in risposta ad uno stimolo mitogenico, innescato dall'attivazione di IGF1R (Martelli *et al*, 2000; Xu *et al*, 2001, Faenza *et al*, 2005).

A seguito dell'attivazione della PLC β 1 e della produzione di DAG si ha la traslocazione nel nucleo della proteina chinasi C (PKC), responsabile a sua volta della fosforilazione di molti bersagli nucleari e proteine critiche per la progressione attraverso i *checkpoint* del ciclo cellulare (Manzoli *et al*, 1997; Matteucci *et al*, 1998; Odom *et al*, 2000).

E' stato infatti dimostrato che in cellule di eritroleucemia murina, una iperespressione di PLC β 1 è sufficiente per provocare un aumento dell'espressione della ciclina D3 e della CDK4, della fosforilazione della pRB e l'attivazione di E2F1 (Faenza *et al*, 2000). Nonostante questo meccanismo non sia ancora del tutto chiaro, si potrebbe supporre un ruolo dei fosfoinositidi nel controllo dell'espressione genica (Martelli *et al*, 2004). Di conseguenza, l'alterazione della regolazione del ciclo lipidico della PI-PLC β 1 nucleare può avere effetti importanti sulla cancerogenesi e sulla progressione tumorale.

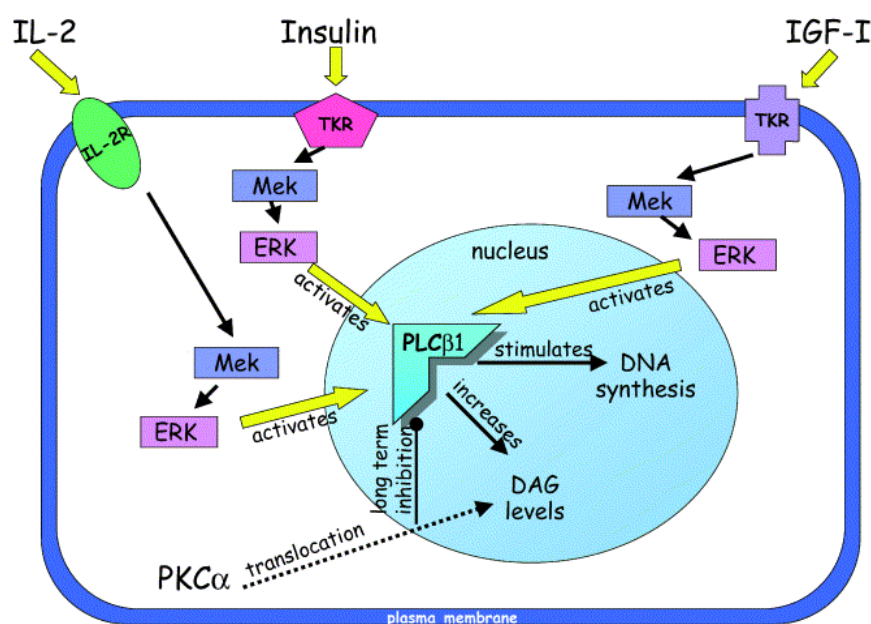


Figura 7. Meccanismo di regolazione del pathway nucleare della PLC β 1. In seguito all'attivazione dei recettori specifici per l'insulina, IL2 ed IGF1 si ha la propagazione dello stimolo mitogenico, via MAP chinasi, con conseguente fosforilazione ed attivazione della PLC β 1 nucleare. L'enzima attivato catalizza l'idrolisi del PIP2, con conseguente formazione di IP3 e DAG: il principale effetto è la traslocazione nucleare della PKC, responsabile a sua volta dell'attivazione di molti bersagli che favoriscono la progressione attraverso il ciclo cellulare. Tra i bersagli della PKC vi è la stessa PLC β 1, che viene deattivata, attraverso un meccanismo di *feedback* negativo.

2.2 Via di segnalazione fosfoinositide-dipendente e *crosstalk* con altri *pathways*

Il ruolo giocato dai fosfoinositidi nel carcinoma della mammella, emerge chiaramente, ad esempio, dall'iperegolazione dell'attività di enzimi chiave come le PI chinasi e le PLC, che attivano secondi messaggeri in grado di conferire vantaggi biologici selettivi alla neoplasia. Tuttavia, per poter comprendere i complessi meccanismi che regolano la crescita delle neoplasie, è essenziale poter decifrare il *crosstalk* che esiste tra le diverse vie di trasduzione del segnale.

Ricerche riguardanti il controllo della proliferazione nel tumore mammario, hanno più volte messo in luce l'interazione tra ormoni, EGF, HER2, IGF1, FGF, NGF ed ANGII (Ethier *et al*, 1995; Descamps *et al*, 1998; Xing *et al*, 1999; Dupont *et al*, 2001; Greco *et al*, 2003).

L'iperespressione di EGFR ed HER2, tipicamente riscontrata in molti tumori della mammella, promuove la sopravvivenza cellulare e la soppressione dell'apoptosi attraverso meccanismi che coinvolgono l'asse PI3K/Akt, nella quale frequentemente si osservano aberrazioni genomiche incluse amplificazioni, mutazioni e riarrangiamenti cromosomici.

Nelle cellule normali di mammella, Akt esiste in una forma ipoattiva, a causa di una ridotta espressione di EGFR/HER2 e/o dell'esistenza di una forma funzionale di PTEN.

L'attivazione di tale enzima contribuisce allo sviluppo di un fenotipo più aggressivo, attraverso la fosforilazione di p21, p27 e MDM2, che regolano la progressione nel ciclo e l'apoptosi (Lo *et al*, 2006).

La iper-regolazione della via di Akt, può essere uno dei principali fattori in grado di ridurre l'efficacia dei trattamenti antineoplastici ed è per questo motivo che Akt è un bersaglio molecolare per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

Il carcinoma della mammella è fortemente sotto il controllo ormonale ed, in particolare, gli estrogeni giocano un ruolo centrale nella stimolazione della proliferazione.

Dal punto di vista funzionale, si può parlare di due vie di segnalazione steroidee, una che origina nel nucleo ed una nella membrana (Beato *et al*, 1989): quest'ultima, nei tumori in cui si ha iperespressione di HER2 ed EGFR contribuisce in una maniera sostanziale alla crescita tumorale ed alla resistenza alla terapia endocrina (Osborne *et al*, 2005; Arpino *et al*, 2008).

Come mostrato in Figura 8, la via di segnalazione mediata dagli estrogeni, interagisce fortemente con le altre vie, in quanto i recettori di membrana specifici per questo ormone sono in grado, sia direttamente che indirettamente, di attivare i recettori tirosin chinasi,

che, a loro volta, attivano secondi messaggeri e *pathways* a valle come quello di ERK/MAPK e PI3K/AKT. Tali chinasi, infine, fosforilando ER, promuovono, anche direttamente, l'attività trascrizionale estrogeno dipendente (Tokunaga *et al*, 2006; Vestey *et al*, 2005).

Infine, va sicuramente menzionato il *pathway* di segnalazione mediato da IGF1, implicato fortemente nello sviluppo e progressione del tumore della mammella e nella resistenza a trattamenti chemioterapici a bersaglio molecolare (Valabrega *et al*, 2007).

Il potenziale tumorigenico de IGF1R risiede specialmente nella sua attività antiapoptotica e trasformante, tanto che una sua iperattivazione è stata correlata con una aumentata radioresistenza e possibilità di ricaduta di malattia (Song *et al*, 2007).

Come abbiamo già menzionato, non solo IGF1R è coinvolto nell'innesco del pathway nucleare della PLCβ1, ma la sua interazione con la via degli ER e dell'EGFR è ben documentata (Westley *et al*, 1998; Perks *et al*, 2003).

Figure 2

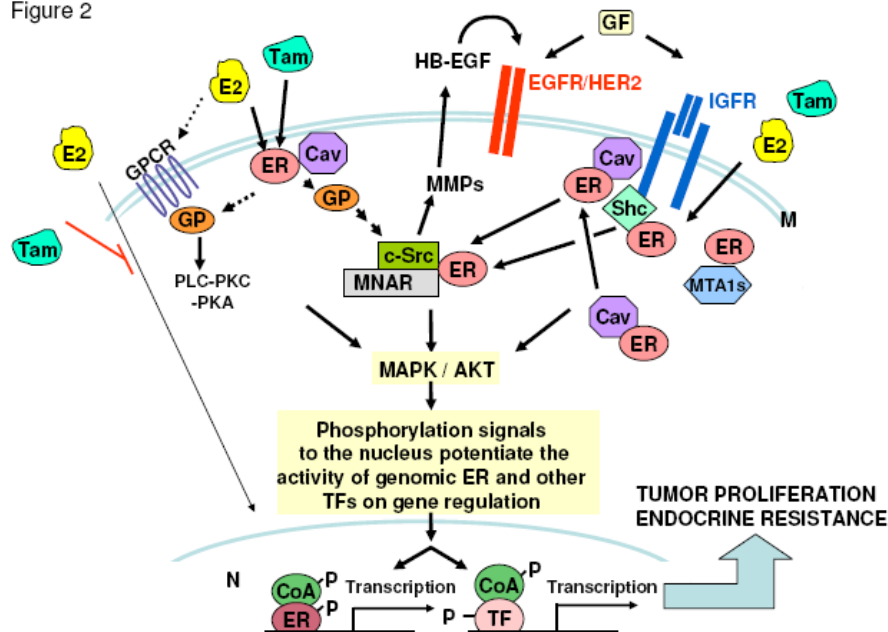


Figura 8. Modello di integrazione tra la segnalazione “genomica” e “non genomica” di ER e *crosstalk* con i *pathways* dei recettori tirosino chinasi (Arpino *et al*, 2008).

SCOPO DELLA RICERCA

Il carcinoma della mammella è una neoplasia ad alta eterogeneità che, come la maggioranza dei tumori umani, presenta numerose aberrazioni nelle vie di trasduzione del segnale.

Una caratterizzazione molecolare sempre più completa si rende necessaria per poter determinare l'aggressività di ogni singolo tumore ed individuare nuovi bersagli terapeutici.

Inoltre, dato che a livello fenotipico il tumore della mammella non sembra subire grandi cambiamenti nell'evoluzione da lesione *in situ* a carcinoma invasivo (Allred *et al*, 2008), l'individuazione di nuovi *target* molecolari, come ad esempio i componenti del meccanismo di segnalazione cellulare, potrebbe giocare un ruolo cruciale nella diagnosi precoce e nel monitoraggio di questa patologia.

In questo scenario, una deregolazione della via di segnalazione dei fosfoinositidi, in molti casi è un evento importante nel conferimento di vantaggi biologici selettivi alla neoplasia: uno degli enzimi chiave di questo *pathway*, specialmente a livello nucleare, è la PLC β 1, il cui gene risulta localizzato sul braccio corto del cromosoma 20 (Lo Vasco *et al*, 2004).

Diversi studi hanno rivelato che in tale cromosoma vi sono vari geni candidati che possono contribuire alla progressione tumorale e, nel caso specifico del carcinoma della mammella, aneuploidie e alterazioni strutturali a carico del 20 sembrano correlare in maniera significativa con la prognosi della malattia (Ginestier *et al*, 2006).

Muovendo da queste premesse, lo scopo dello studio è stato quello di caratterizzare, dal punto di vista biopatologico, una serie di pazienti diagnosticate per carcinoma della mammella, analizzando, in particolare, il ruolo dell'enzima PLC β 1.

Il primo obiettivo dello studio è stato dunque quello di analizzare l'assetto genico di tale isoforma in varie classi di carcinomi mammari, diversi per stato di invasività (carcinomi *in situ* e carcinomi invasivi) e per indice proliferativo (carcinomi a bassa ed ad alta proliferazione, categorizzati in base all'indice mitotico, parametro di significato prognostico già confermato).

A questo scopo è stato messo a punto un protocollo di ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) su nuclei interfasicici di sezioni paraffinate, utilizzando una sonda coniugata direttamente a fluorocromo.

Per verificare se allo stato di alterazione genica si accompagnasse una variazione di espressione della PLC β 1, sono stati effettuati esperimenti in Real-Time PCR per entrambe le isoforme della PLC β 1 (1a ed 1b), al fine di avere una quantificazione relativa dei due trascritti, ed esperimenti in immunistoichimica per determinarne i livelli proteici.

Infine è stato indagato se vi fossero correlazioni tra la PLC β 1 ed altri parametri clinicopatologici importanti per il carcinoma della mammella, quali l'attività proliferativa, il grado tumorale, i livelli recettoriali e lo stato di amplificazione del gene HER2.

MATERIALI E METODI

1. Caratteristiche dei pazienti

Lo studio è stato condotto su una casistica di 52 pazienti con tumore della mammella afferenti all'Ospedale Morgagni-Pierantoni di Forlì dal 1997 al 2006: in particolare le sezioni istologiche sono state allestite dall'U.O. di Anatomia Patologica, mentre i tessuti freschi sono stati raccolti e stoccati dal Laboratorio Biologico Oncologico.

Tutti i soggetti avevano dato il loro consenso informato, come richiesto dalle linee guida internazionali.

I pazienti sono stati diagnosticati secondo la classificazione istologica TNM; il grading è stato determinato in base ai criteri di Holland per i carcinomi duttali *in situ* e secondo i criteri di Bloom-Richardson, modificati dallo studio di Nottingham e Tenovus, per i tumori duttali infiltranti.

Dei 52 carcinomi mammari analizzati, 20 erano stati diagnosticati come carcinomi duttali *in situ* e 32 come carcinomi duttali infiltranti.

L'attività proliferativa è stata determinata mediante la valutazione dell'indice mitotico (MAI), espressa come numero di mitosi in 10 campi consecutivi, campi scelti nell'area di maggiore densità di mitosi.

Per differenziare le categorie proliferative sono stati usati gli stessi *cut off* adottati nelle analisi cliniche e cioè valori di MAI inferiori a 10, tra 10 e 19 e uguali o maggiori di 20 (Medri, *et al*, 2003).

2. Analisi Immunoistochimica

Le determinazioni in immunoistochimica sono state condotte su sezioni paraffinate di 5 µm montate su vetrini carichi positivamente.

Esse, dopo essere state deparaffinizzate con xilene e reidratate, sono state sottoposte ad un trattamento con perossido d'idrogeno per 10 min, al fine di bloccare l'attività perossidasi endogena.

In seguito i vetrini sono stati immersi in tampone citrato 10mM (pH 6) a 98,5°C per 40 min, raffreddati a temperatura ambiente per 20 min, lavati in PBS per 5 min e incubati per 30 min a temperatura ambiente con gli anticorpi riportati nella Tabella 2, diluiti in apposito diluente (Dako).

Successivamente, la rivelazione dei recettori ormonali è stata effettuata con Detector Kit

Polimer (Novocastra), mentre quella della PLC β 1 con il kit LSAB+ System-HRP (Dako), mediante reazione biotina-streptavidina.

Infine le sezioni sono state incubate con diaminobenzidina per 10 min, in modo da sviluppare la reazione con la perossidasi.

Dopo un lavaggio in acqua distillata, i nuclei delle cellule sono stati colorati con ematossilina, disidratati e preparati per la lettura al microscopio ottico (Axioskop, Zeiss).

Per la valutazione dei recettori ormonali, la positività è stata data solo quando si osservava una distinta marcatura nucleare in almeno il 10% di cellule tumorali.

Per ciò che concerne invece l'analisi semiquantitativa della PLC β 1, il risultato è stato calcolato come il prodotto della percentuale di cellule reattive sul totale delle neoplastiche, per l'intensità della marcatura (score 1: marcatura debole; score 2: marcatura moderata; score 3: marcatura forte).

Anticorpo primario	Company	Diluizione
PI-PLC β 1 (clone D8)	Santa Cruz Biotechnology	1:20
ER (clone 6F11)	Novocastra	1:200
PgR (clone 636)	Dako	1:200

Tabella 2. Anticorpi utilizzati per le analisi in immunoistochimica

3. Marcatura diretta della sonda per il gene PLC β 1

Al fine di poter avere una sonda specifica per la PI-PLC β 1 coniugata direttamente con fluorocromo da poter utilizzare per l'ibridazione in situ, 4 μ g del plasmide PAC Clone HS881E24 (*library* RPCI-5PAC) sono stati digeriti overnight a 37°C, utilizzando 80u dell'endonucleasi RSAI (Promega). Il giorno successivo, dopo l'inattivazione dell'enzima a 65°C per 20 min e la purificazione del digerito mediante QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN), metà del DNA è stata marcata utilizzando primers e nucleotidi coniugati ad Alexa Fluor 555 (BioPrime Plus ArrayCGH Genomic Labeling System, Invitrogen), secondo le istruzioni del produttore.

In breve, dopo una reazione di 2 ore a 37°C in cui si è avuta l'incorporazione del fluorocromo, la reazione è stata bloccata in ghiaccio mediante aggiunta di 5 µl di Stop Buffer (BioPrime kit, Invitrogen). Per verificare l'avvenuta marcatura 3 µl di DNA sono stati fatti correre su gel d'agarosio al 2% ed è stata verificata la presenza di frammenti lunghi da 100bp a 500bp.

Successivamente, dopo uno *step* di purificazione (Purification Module, Invitrogen), il DNA è stato precipitato mediante aggiunta di COT-1 DNA (ROCHE), 1/10 V di sodio acetato 3M pH 5.6 e 3V di etanolo assoluto, incubato a -80°C per 30 min e centrifugato a 13000 RPM per 30 min, in centrifuga refrigerata. La sonda così marcata era pronta per gli *steps* successivi di ibridazione.

4. Ibridazione in situ fluorescente

Gli esperimenti di ibridazione in situ fluorescente (FISH) sono stati condotti su sezioni fissate in formalina e paraffinate.

Per l'identificazione delle alterazioni geniche sono state utilizzate le seguenti sonde: Alexa Fluor 555-PLCβ1, preparata come già descritto, e sonda LSI_ HER2/neu-CEP17 (PathVysion™ HER-2 DNA Probe Kit).

Brevemente, i vetrini, dopo essere stati incubati overnight a 56°C, sono stati deparaffinati in xilene (30 min a 56°C e 10 min a temperatura ambiente) e deidratati in etanolo assoluto (2 passaggi da 5 min).

Per il pretrattamento delle sezioni paraffinate è stato utilizzato il Paraffin Pre-treatment kit (Vysis): brevemente, dopo un passaggio in HCl 0.2 M per 10 min a temperatura ambiente, un lavaggio in acqua deionizzata per 3 min ed un lavaggio di 3 min in Wash Buffer, i vetrini sono stati incubati per 30 min a 80°C nella soluzione di pretrattamento (1 M Na SCN).

In seguito le sezioni, dopo un lavaggio di 1 min in acqua deionizzata e di 5 min in Wash Buffer (per 2 volte), sono state sottoposte ad un trattamento con proteasi a 37° per 25 min e lavati nuovamente 2 volte in Wash Buffer per 5 min. Si è quindi proceduto con una incubazione di 5 min in formalina tamponata, con 2 lavaggi in Wash Buffer e una disidratazione in alcoli a concentrazione crescente (70, 85 and 100%, ciascuno per 1 min).

Ai vetrini sono stati successivamente aggiunti 10 µl di sonda per HER2 o la sonda specifica per la PLCβ1, preparata come precedentemente descritto, risospesa in 15 µl di

soluzione di ibridazione (50% Formammide/2X SSC/10% destran solfato) e incubata 5 min a 37°C.

Dopo aver sigillato il coprioggetto con mastice, i vetrini sono stati posti in Hybrite (Vysis), dove hanno subito una co-denaturazione con la sonda (85°C per 5 min) e una ibridazione per 18 ore a 37°C, in ambiente umido.

Il giorno seguente, dopo un passaggio a temperature ambiente in 2xSSC/0.3% Nonidet P-40, per rimuovere il coprioggetto, i vetrini sono stati lavati per 2 min a 73°C nella medesima soluzione; in seguito sono stati asciugati al buio per circa 15 min e i nuclei sono stati colorati con 10 µl of 0.2 µM 4,6 diamidino-2-phenylindole (DAPI) in antifade solution (Vysis). L'analisi è stata condotta utilizzando un microscopio Axioskop 40 (Zeiss), equipaggiato con un triplo filtro (DAPI/Green/Orange;Vysis).

Per ciò che concerne la determinazione di HER2, sono state lette almeno 60 cellule per ogni caso: una neoplasia è stata classificata amplificata quando il rapporto tra la somma dei segnali del gene HER2 e la somma sei segnali del centromero CEP17 è risultato maggiore di 2.

Per ciò che concerne invece la PLCβ1, per ogni vetrino sono state lette circa 150-200 cellule ed è stata determinata la percentuale di cellule con uno specifico assetto genico. Il caso è stato definito amplificato quando la percentuale di cellule con più di 2 segnali era almeno 1,5 volte superiore a quella delle cellule con 1 solo segnale (viceversa per definire un caso deleto). Ai restanti casi è stato attribuito lo stato di disomia, cioè di normalità.

5. Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA

L'RNA totale è stato isolato dalla linea cellulare di mammella SKBR3 e da campioni di tessuto di mammella opportunamente stoccati a -80°C. L'estrazione è stata condotta utilizzando il kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) secondo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. Le tracce di DNA genomico sono state eliminate trattando i campioni con DNAsi I (Qiagen).

Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 500 ng di RNA totale, usando il kit iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad), in un volume finale di 20 µl, secondo le indicazioni fornite. La reazione di retrotrascrizione è stata condotta a 42°C per 30 min, seguita da uno step di 5 min a 85°C, per bloccare l'enzima.

Real Time PCR

L'espressione genica delle due forme trascrizionali del gene della PI-PLC β 1 e della CDC25 è stata quantificata utilizzando il sistema MyiQ Single Color Real-Time PCR Detection System (BioRad) e la metodica del SYBR Green I.

Per controllare la qualità e la quantità dell'RNA iniziale, ed avere così una corretta normalizzazione, si è quantificata l'espressione di un pool di tre geni di riferimento endogeni (β ₂-microglobulina, ipoxantin ribosil transferasi-HPRT- e β -actina).

Tutti i primers utilizzati sono stati disegnati mediante il software Beacon Designer (version 4, BioRad).

In tabella 1 sono riportate le sequenze dei primers specifiche per i geni analizzati.

Target	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicone
β-actina	CGCCGCCAGCTCACCATG	CACGATGGAGGGGAAGACGG	120 bp
β2-microglobulina	CATTCCTGAAGCTGACAGCATTC	TGCTGGATGACGTGAGTAAACC	136 bp
HPRT	AGACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG	GTCTGGCTTATATCCAACACTTCG	101 bp
PLCβ 1a	TGGATAAAAAGAGGCAGGAGAAGA	GCAGCTTGGGCTTTTCATCC	213 bp
PLCβ 1b	GAAGAGGAGAAGACAGAGATG	TGGCAAGTTTCCGACAAG	188 bp
CDC25	CGTCTGAATCCTCCGAATC	ACTGGAAGCGTCTGATGG	153 bp

Tabella 3. Primers utilizzati per le reazioni di Real Time PCR

Per le reazioni di Real-Time PCR sono state usate le seguenti quantità di cDNA template: 100 ng per l'analisi delle PLC β 1a, PLC β 1b, 50 ng per CDC25 e 5 ng per i 3 geni *housekeeping*. Per ogni reazione, condotta in duplicato, al cDNA template è stata aggiunta la miscela contenente l'enzima (SYBR Green Mix 1 x) e 200 nM (o 400 nM per le isoforme di PLC β) di entrambi i primers.

Il protocollo consisteva in uno step a 95°C per 1 min e 30 sec, seguito da 40 cicli di amplificazione composti da un passaggio di 30 sec a 95°C e: 30 sec a 58°C (CDC25), 30 sec o 45 sec a 60°C (rispettivamente per i 3 geni *housekeeping* e le isoforme della PLC β 1). Dati i bassi livelli di mRNA, per le PLC β era previsto anche un passaggio di elongazione a

72°C per 45 sec.

Per verificare la specificità del prodotto è stata sempre effettuata una curva di *melting* ed una corsa su gel d'agarosio del prodotto di amplificazione.

L'analisi semi-quantitativa è stata effettuata tramite il metodo del $\Delta\Delta C_t$, utilizzando il *software* Gene Expression Macro Software (Version 1.1) (BioRad).

I livelli di mRNA dei vari geni sono stati normalizzati sui 3 geni di controllo e sono stati espressi come *n*-volte i livelli di mRNA di un calibratore. Come calibratore, analizzato in ogni esperimento, è stato scelto cDNA della linea cellulare di carcinoma della mammella SKBR3, a concentrazione nota.

In ogni esperimento veniva fatta anche una curva standard, utilizzando diluizioni seriali di cDNA di SKBR, usata per calcolare l'efficienza di reazione.

6. Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL) implementato in un PC Windows XP.

La differenza tra le variabili dicotomiche è stata valutata mediante il test del Chi-quadrato, utilizzando il Chi-quadrato di Pearson quando la numerosità delle categorie lo permetteva o, in alternativa, il test esatto di Fisher.

L'analisi multivariata è stata condotta mediante un modello di regressione logistica (analisi *backward* con probabilità di rimozione *stepwise* pari a 0,05).

L'associazione tra i dati di FISH e i dati di sopravvivenza libera da malattia è stata analizzata mediante Log Rank Test.

RISULTATI

1. Caratteristiche dei pazienti

In questo studio sono stati analizzati i campioni provenienti da 52 pazienti affetti da carcinoma della mammella.

I tumori sono stati suddivisi in base al loro indice di attività mitotica e allo stato di invasione, in modo da poter avere le seguenti categorie: carcinomi *in situ* a bassa proliferazione (n=10); carcinomi *in situ* ad alta proliferazione (n=10); tumori infiltranti a bassa proliferazione (n=16); tumori infiltranti ad alta proliferazione (n=16). Per accentuare la differenza tra le categorie proliferative sono state scelte le classi estreme, cioè casi con MAI minore di 10 (bassa proliferazione) e maggiore o uguale a 20 (alta proliferazione).

Nella Tabella 4 si possono osservare i principali dati clinico-patologici dei casi, raggruppati per categoria, mentre le caratteristiche dei singoli pazienti sono presentate nella Tabella 5. In quest'ultima è riportato anche il sottotipo di carcinoma (triplo negativo, HER2 positivo e luminale).

Più della metà dei casi era riconducibile alla categoria di tumori luminali (56%), il 33% dei casi al sottotipo HER2-neu positivo, mostrando l'amplificazione del suddetto gene ed infine l'11% dei pazienti potevano essere definiti tripli negativi.

L'età mediana, al momento della diagnosi, era di 61 anni (range 41-86); i dati di *follow up* erano disponibili per 41 pazienti, seguiti per un periodo mediano di 29 mesi. Durante il tempo di osservazione solo 6 pazienti hanno avuto progressione di malattia o recidiva e 2 sono deceduti dopo aver progredito.

Classificazione	Età mediana (anni)	Grado*			ER+ (%)	PgR+ (%)	HER2+ (%)
		I	II	III			
DCIS bassa proliferazione (n= 10)	60	/	70	30	90	80	30
DCIS ad alta proliferazione(n= 10)*	56	/	/	100	30	10	60
IBC a bassa proliferazione(n= 16)*	69	40	60	/	94	56	6
IBC ad alta proliferazione(n= 16)*	60	7	27	66	50	31	44

* Il grado non era disponibile per tutti i casi

Tabella 4. Principali caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti, raggruppati per classe

DCIS = Ductal carcinoma in situ ; IBC= Invasive Breast Cancer

	Età	ISTOTIPO	GRADO	MAI	Stato linfonodale	Recettori per ESTROGENI	Recettori per PROGESTERONE	HER2	Sottotipo	Follow up
1	43	DCIS	2	1	1	95	100	N.A.	Luminale	NED
2	83	DCIS	3	1	0	0	0	A	HER2+	NA
3	59	DCIS	2	4	0	90	90	N.A.	Luminale	NED
4	57	DCIS	2	4	1	75	40	A	HER2+	NA
5	51	DCIS	3	3	1	90	100	A	HER2+	NED
6	68	DCIS	2	0	1	80	45	N.A.	Luminale	NED
7	60	DCIS	2	3	1	95	60	N.A.	Luminale	NA
8	65	DCIS	3	0	0	60	0	N.A.	Luminale	NED
9	71	DCIS	2	0	0	95	30	N.A.	Luminale	NED
10	46	DCIS	2	0	1	90	30	N.A.	Luminale	NED
11	61	DCIS	3	20	1	95	5	N.A.	Luminale	NED
12	52	DCIS	3	20	1	10	0	A	HER2+	NED
13	67	DCIS	3	21	1	0	0	A	HER2+	NED
14	50	DCIS	9	24	1	80	0	N.A.	Luminale	NA
15	60	DCIS	3	34	1	0	0	A	HER2+	NA
16	42	DCIS	3	31	9	0	0	N.A.	Triplo neg	NA
17	61	DCIS	3	28	1	5	0	A	HER2+	PD (M)
18	52	DCIS	3	22	1	30	20	A	HER2+	NA
19	42	DCIS	3	27	1	0	0	N.A.	Triplo neg	PD (M)
20	65	DCIS	3	20	1	5	5	A	HER2+	NED
21	66	IBC	1	0	1	100	5	N.A.	Luminale	NED
22	80	IBC	1	0	1	95	100	N.A.	Luminale	NED
23	50	IBC	1	1	2	80	100	N.A.	Luminale	NED
24	41	IBC	1	1	1	90	100	N.A.	Luminale	NED
25	51	IBC	9	2	0	0	0	N.A.	Triplo neg	NA
26	72	IBC	2	4	2	95	40	N.A.	Luminale	NED
27	68	IBC	2	5	1	95	0	N.A.	Luminale	NED
28	78	IBC	2	5	1	100	100	N.A.	Luminale	NED
29	45	IBC	2	6	1	95	90	A	HER2+	NED
30	84	IBC	1	5	1	85	95	N.A.	Luminale	NED
31	46	IBC	2	5	0	70	0	N.A.	Luminale	PD (R)
32	84	IBC	2	6	1	70	65	N.A.	Luminale	NA
33	70	IBC	2	6	1	30	0	N.A.	Luminale	NED
34	70	IBC	2	1	0	85	5	N.A.	Luminale	NA
35	64	IBC	1	1	2	60	5	N.A.	Luminale	NED
36	79	IBC	2	4	1	95	85	N.A.	Luminale	NED
37	68	IBC	2	20	1	100	15	N.A.	Luminale	NED
38	60	IBC	3	21	1	100	0	N.A.	Luminale	NED
39	44	IBC	3	23	2	75	90	A	HER2+	PD (M)
40	54	IBC	9	23	1	0	0	A	HER2+	NED
41	86	IBC	2	23	2	100	60	N.A.	Luminale	NED
42	39	IBC	3	25	0	90	0	N.A.	Luminale	NED
43	43	IBC	3	27	1	90	5	A	HER2+	NED
44	71	IBC	2	28	1	90	15	N.A.	Luminale	NED
45	59	IBC	3	29	1	0	0	A	HER2+	NA
46	79	IBC	3	39	1	0	0	A	HER2+	NED
47	66	IBC	1	34	0	0	7	A	HER2+	NED
48	55	IBC	3	32	9	45	20	N.A.	Luminale	PD [†] (M)
49	67	IBC	3	22	0	0	0	A	HER2+	NED
50	51	IBC	3	37	9	0	0	N.A.	Triplo neg	NED
51	72	IBC	2	29	1	0	0	N.A.	Triplo neg	PD [†] (R)
52	50	IBC	3	24	0	0	0	N.A.	Triplo neg	NED

Tabella 5. Principali caratteristiche clinico-patologiche dei singoli pazienti.

Legenda Tabella 5

Grado: 9 = mancante

Stato linfonodale: 0=non asportati; 1=reattivi; 2=metastatici; 9=dato mancante

HER2: N.A.= non amplificato; A= amplificato

Follow up: NED= No Evidence of Disease; NA= Not Available; PD= Progression Disease; R= Relapse; M= Metastasis

Sottotipo: triplo neg = triplo negative (ER-, PgR-, HER2-)

2. Studio dell'assetto genico della PI-PLC β 1 mediante FISH

Il primo obiettivo dello studio è stato quello di analizzare l'assetto genico dell'isoforma PLC β 1 nelle varie classi di carcinomi mammari.

A questo scopo è stato messo a punto un protocollo di ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) su nuclei interfasicci di sezioni paraffinate, utilizzando una sonda coniugata direttamente a fluorocromo, al fine di ridurre il segnale aspecifico dovuto ad una rivelazione indiretta.

Per confermare l'attendibilità del risultato in ogni vetrino si ricercava la presenza di eventuali cellule non tumorali (linfociti, cellule flogistiche e stromali), in cui ovviamente si attestava lo stato disomico della PLC β 1.

Gran parte dei tumori analizzati presentava alterazioni a livello del locus indagato ed, in particolare, la maggioranza delle cellule mostrava amplificazione del gene della PLC β 1 (Figura 9 e Figura10).

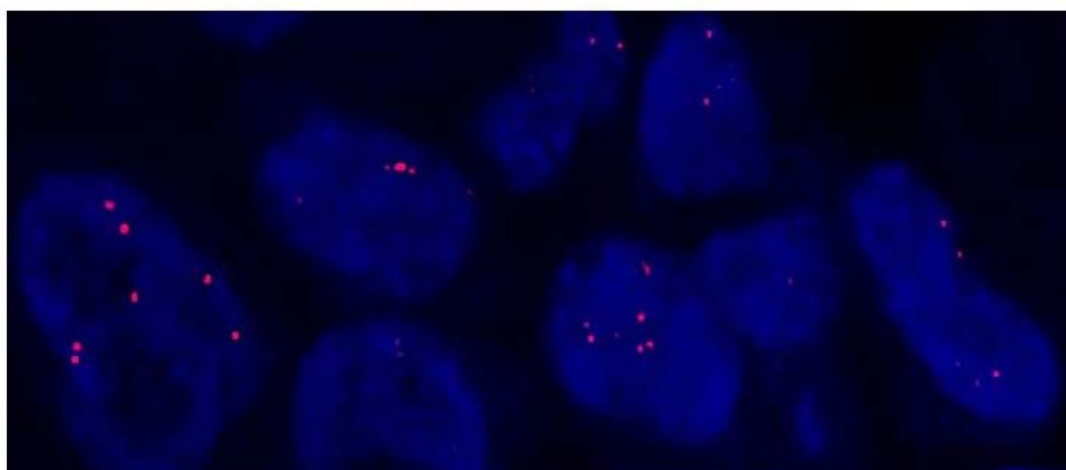


Figura 9. Analisi in FISH del gene della PLCβ1. Cellule neoplastiche con stato di disomia o evidente amplificazione del locus della PLCβ1.

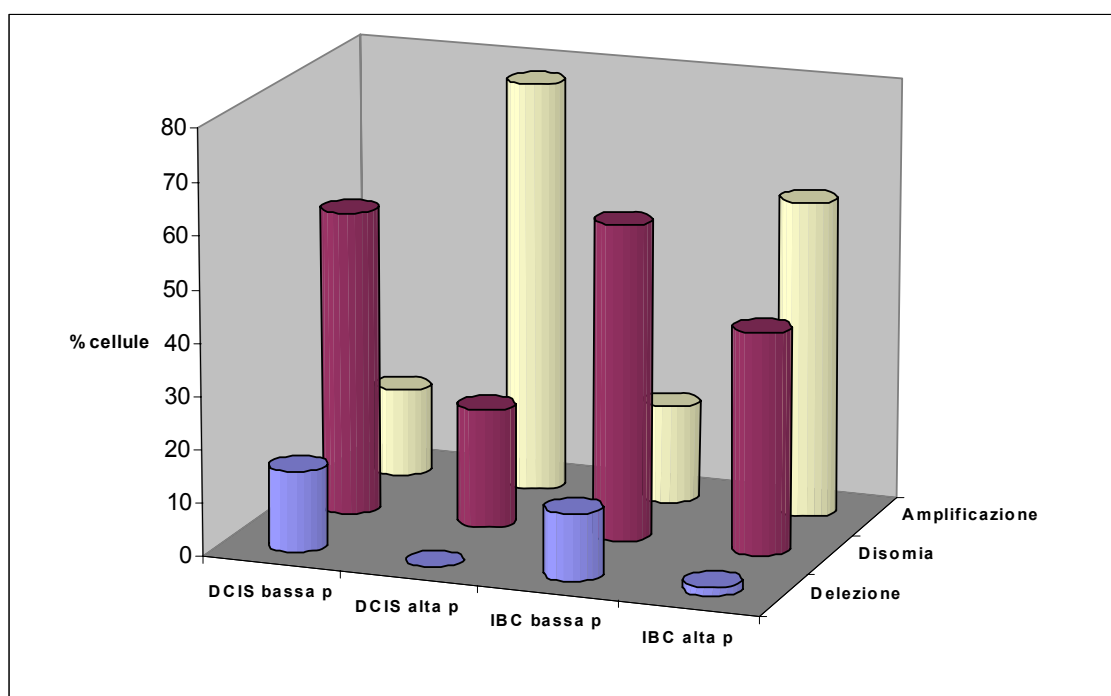


Figura 10. Analisi in FISH del gene della PLCβ1. Nel grafico sono riportati i valori medi dei percentuali di cellule con un determinato assetto genico per le diverse classi di tumori analizzati.

E' stato dunque scelto un *cut-off* per discriminare l'assetto genico della PLC β 1 caso per caso: un tumore è stato definito amplificato quando la percentuale di cellule con più di 2 segnali era almeno 1,5 volte superiore a quella delle cellule con 1 segnale (viceversa per definire se un tumore era deletato per la PLC β 1). Ai restanti casi è stato attribuito lo stato di disomia, cioè di normalità.

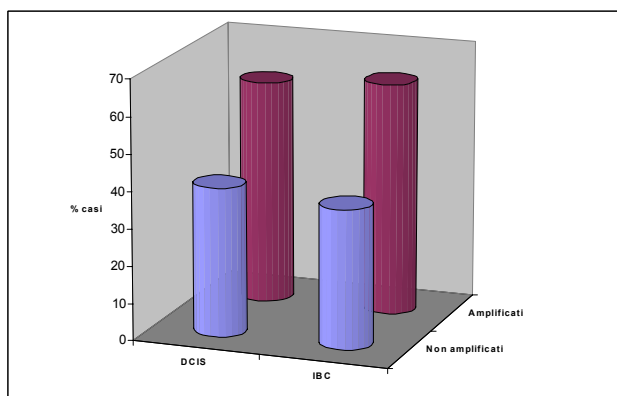
Le percentuali di casi sono riportate nella Tabella 6.

Come si può osservare, l' 83% dei tumori presenta aneusomie del locus considerato ed, in particolare, il 21% presenta delezione, mentre il 62% amplificazione.

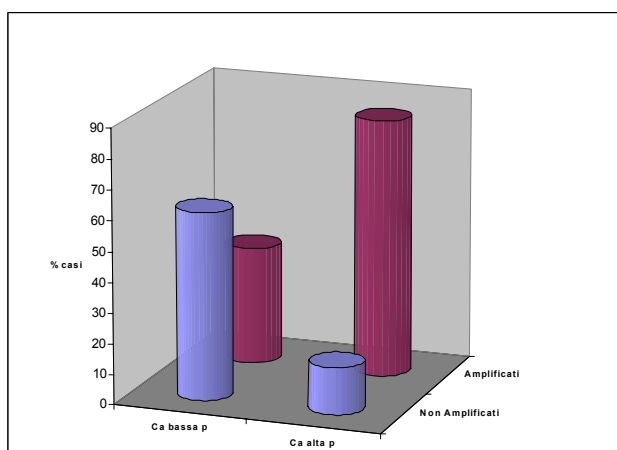
Se si osservano le percentuali delle singole classi, si nota che, sia per la delezione che per l'amplificazione, le frequenze di tumori con alterazione sono praticamente sovrapponibili nelle classi di tumori a bassa proliferazione, e molto simili in quelli ad alta proliferazione. Dunque, lo stato allelico della PLC β 1 sembra essere indipendente dall'invasività della neoplasia, date le scarse differenze tra DCIS ed IBC a parità di categoria proliferativa, mentre sembra correlare fortemente con l'indice proliferativo. In particolare, come si può dedurre anche dalla Figura 11, l'associazione tra amplificazione, alterazione più frequentemente riscontrata, ed indice proliferativo è statisticamente significativa ($p=0,001$).

	Delezione	Disomia	Amplificazione
DCIS bassa proliferazione	3 (30%)	3 (30%)	4 (40%)
DCIS alta proliferazione	2 (20%)	0	8 (80%)
IBC bassa proliferazione	5 (31%)	5 (31%)	6 (38%)
IBC alta proliferazione	1 (6%)	1 (6%)	14 (88%)
TOT	11 (21%)	9 (17%)	32 (62%)

Tabella 6. N° (%) di casi con i vari assetti genici della PLC β 1 nelle diverse classi di tumore



A Figura 11. Analisi in FISH del gene della PLC β 1. A) Correlazione tra l'amplificazione della PLC β 1 e lo stato di invasività del tumore. B) Correlazione tra l'amplificazione della PLC β 1 e lo stato di proliferazione del tumore ($p=0,001$).



B

3. Studio dell'espressione genica della PI-PLC β 1 mediante Real-Time PCR

La reazione di Real-Time PCR è stata condotta su pazienti con carcinoma invasivo della mammella a diversa proliferazione (6 tumori a bassa proliferazione e 6 tumori ad alta proliferazione).

La prima fase per una corretta analisi di espressione genica in Real-Time PCR è la scelta dello standard interno per la normalizzazione, essenziale specialmente quando si vogliono confrontare i livelli di espressione genica in biopsie provenienti da diversi individui.

A questo proposito è noto come l'utilizzo di più di un gene di riferimento endogeno

migliori l'attendibilità dei risultati, riducendo l'influenza delle variazioni d'espressione di un singolo *housekeeping* (Fisher *et al*, 2005; Tricarico *et al*, 2002; Vandesompele *et al*, 2002). Per questo, dopo aver testato una serie di geni *housekeeping*, è stato scelto di utilizzare, come fattore di normalizzazione, la media geometrica dell'espressione della β -actina, della β 2-microglobulina e dell' ipoxantin ribosil transferasi (HPRT).

Dato che l'amplificazione è stata condotta con metodica Syber Green, intercalante del DNA aspecifico, la specificità dei vari prodotti di PCR è sempre stata verificata mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio e mediante curva di *melting*.

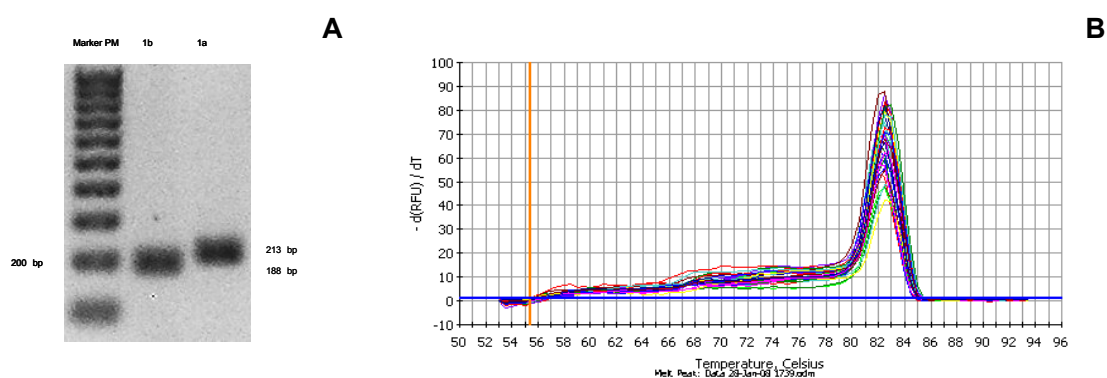


Figura 12. Specificità della reazione di amplificazione delle isoforme PLC β 1a ed 1b. A) Esempio di corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% di prodotti di amplificazione delle due isoforme della PLC β 1. B) Esempio di curva di *melting*, in un protocollo di amplificazione della PLC β 1a.

Per condurre l'analisi semi-quantitativa del trascritto dei geni d'interesse, è stato usato come calibratore cDNA a concentrazione nota, retrotrascritto a partire da RNA estratto da una linea cellulare di carcinoma della mammella (SKBR3).

Tra i casi analizzati, un solo campione è risultato non valutabile, probabilmente a causa della degradazione del materiale di partenza, dovuta ad uno stoccaggio non corretto del prelievo bioptico.

L'analisi d'espressione delle due isoforme PLC β 1a ed 1b (Tabella 7) mostra che, globalmente, l'isoforma 1b risulta la più espressa.

Se si considerano le due classi di proliferazione (bassa ed alta), ciò che emerge è che non vi sono grandi differenze tra di esse nei livelli di trascritti di entrambi gli isoformi, né la somma dell'espressione relativa delle due categorie è correlata in qualche modo con l'indice proliferativo.

Per ciò che concerne invece la correlazione tra espressione ed assetto genico, i risultati, mostrati in Tabella 7 e Figura 14, indicano che, tra i casi che hanno o non hanno l'amplificazione genica della PLC β 1, vi è una lieve differenza nei trascritti di entrambe le isoforme, differenza che si accentua se si considera la somma dell'espressione delle due.

	Exp PLCβ1a	Exp PLCβ1b	Somma exp
Carcinomi a bassa proliferazione	4,7	20,36	27,5
Carcinomi ad alta proliferazione	3,6	23,92	27,84
PLCβ1 Non amplificati	4,08	17,7	23
PLCβ1 Amplificati	5,9	23,5	31,08

Tabella 7. Valori mediani di espressione relativa dei trascritti della PLC β 1 nelle varie categorie di tumori della mammella.

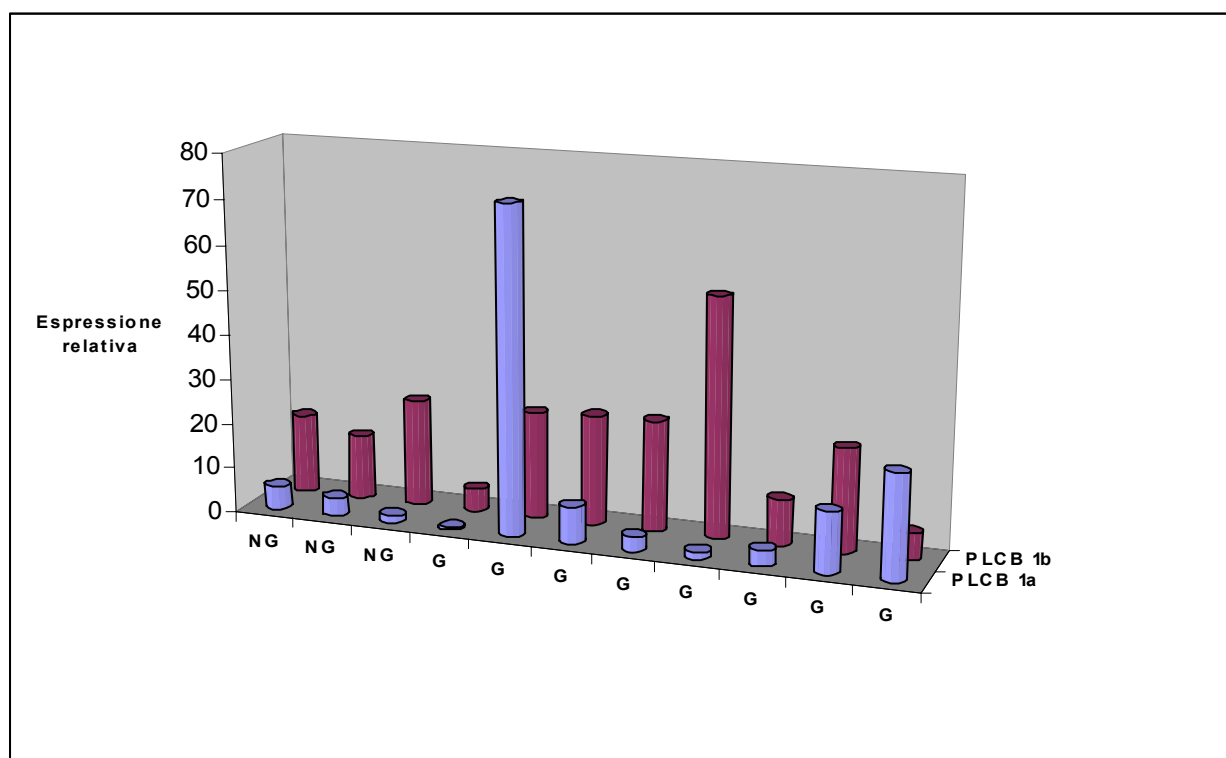


Figura 13. Analisi in Real-Time PCR dei livelli di trascritto della PLCβ1a e PLCβ1b. Nel grafico, i casi sono stati ordinati in base all'assetto genico della PLCβ1 ed, in particolare, a sinistra vi sono i casi che non mostravano amplificazione del gene (NG) e, a seguire, quelli amplificati (G).

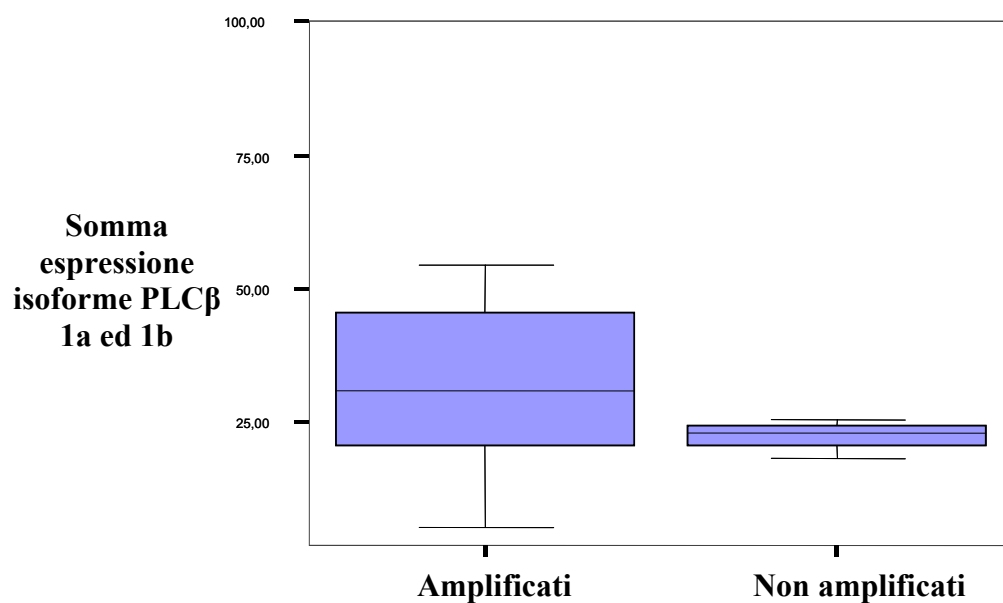


Figura 14. Analisi in Real-Time PCR dei livelli di trascritto della PLCβ1a e PLCβ1b. Il *box-plot* mostra i valori mediani ed i range di espressione del trascritto delle due isoforme della PLCβ1 sommate, nelle classi con amplificazione o meno del gene.

Infine, utilizzando come *cut off* il valore mediano di espressione e dividendo dunque in due categorie i tumori a seconda dei livelli di messaggero presenti, viene confermata la concordanza tra numero di copie geniche ed espressione. Nel 56% dei casi all'amplificazione del gene si accompagna una iperespressione dell'mRNA dell'isoforma PLC β 1a, nel 64% dei casi dell'isoforma PLC β 1b e nell'82% dei casi una iperespressione delle due isoforme insieme. In particolare, quest'ultima associazione risulta tendere alla significatività statistica ($p=0,061$), nonostante il numero esiguo dei tumori analizzati.

Al fine di capire se l'evento trainante dell'amplificazione genica osservata fosse realmente una deregolazione della PLC β 1 sono stati valutati in Real-Time PCR anche i livelli di mRNA di un altro gene molto importante nel tumore della mammella e localizzato in prossimità della PLC β 1: la CDC25. Dai risultati è emerso che la quantità del trascritto della CDC25 era praticamente sovrapponibile nei tumori con o senza amplificazione della PLC β 1.

4. Studio dell'espressione proteica della PI-PLC β 1 mediante immunisto chimica

Per 50 pazienti su 52 è stato possibile effettuare la valutazione dei livelli proteici della PLC β 1 mediante immunisto chimica.

In un primo momento, sono state fatte prove per individuare il miglior anticorpo, testando diversi prodotti (anticorpo policlonale S.Cruz; anticorpi monoclonali Usbiological, Upstate e S.Cruz -clone D8-). La migliore reattività e specificità si è avuta con l'anticorpo monoclonale S.Cruz, il quale, tuttavia, non distingue le due isoforme PLC β 1a ed 1b.

I livelli di proteina osservati nei campioni di tessuto neoplastico della mammella risultano mediamente molto più alti di quelli osservati nei campioni di tessuto sano mammario, nei quali si è invece osservata assenza di reattività (Figura 16).

Ciò che si è osservato è una reattività prevalentemente citoplasmatica e di membrana, come mostrato in Figura 15-16 ed indicato anche nel *datasheet* stesso dell'anticorpo.

I risultati sono stati espressi come prodotto della percentuale di cellule tumorali marcate per lo *score* relativo all'intensità di marcatura (Figura 15).

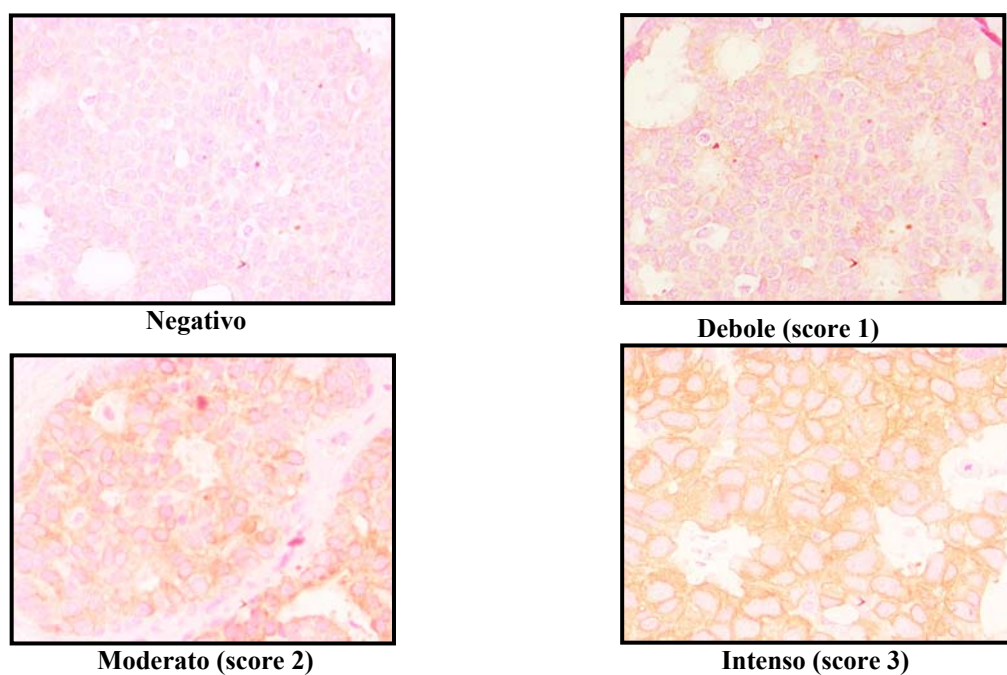


Figura 15. Analisi in immunohistochimica dell'espressione della PLC β 1 in sezioni di tessuto mammario sano e tumorale. Le immagini mostrano i diversi livelli d'intensità di marcatura dell'anticorpo anti-PLC β 1 con i rispettivi *scores* assegnati.

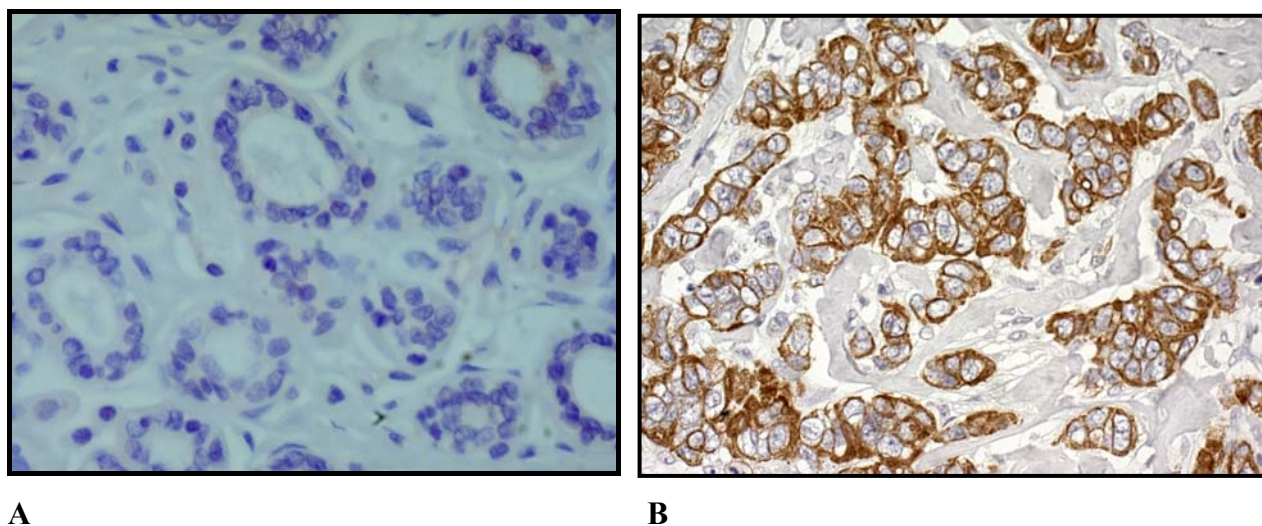
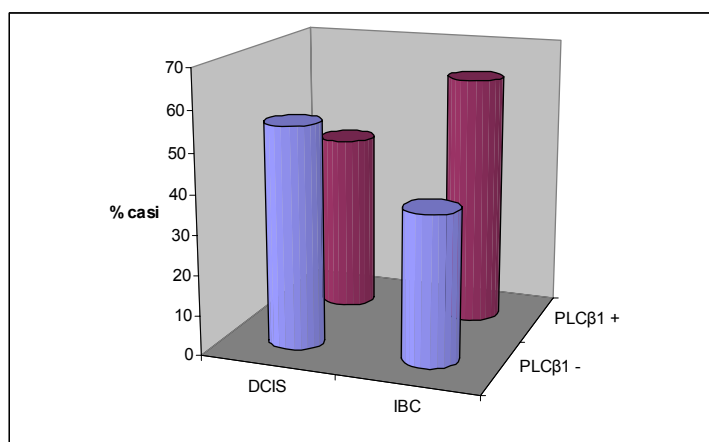
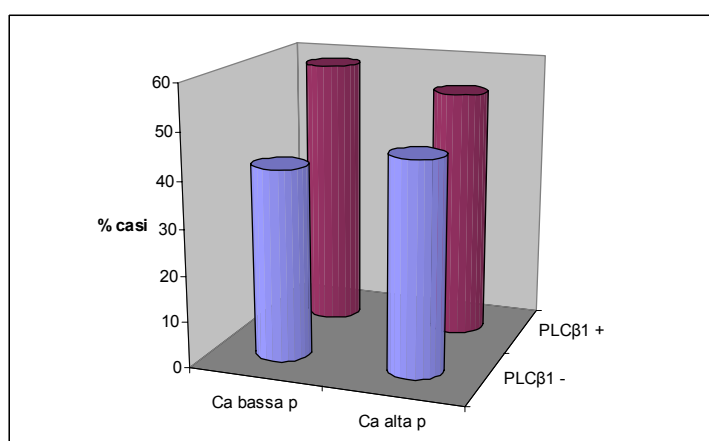


Figura 16. Analisi in immunohistochimica dell'espressione della PLC β 1. L'immagine mostra cellule di ghiandola mammaria sana negative all'anticorpo anti-PLC β 1 (A) e cellule tumorali di un carcinoma mammario infiltrante altamente reattive (B).

Se si assume come *cut off* per i livelli proteici di PLC β 1 il valore mediano del prodotto d'intensità per cellule marcate, ovvero 120, si possono individuare due classi: una categoria che esprime poco o moderatamente la proteina d'interesse (44% dei casi analizzati), ed un'altra che, invece, la esprime ad alti livelli (56% dei casi analizzati).



A **Figura 17. Analisi in IHC dell'espressione proteica della PLC β 1.** A) Correlazione tra l'espressione della PLC β 1 e lo stato di invasività del tumore. B) Correlazione tra l'iperespressione di PLC β 1 e lo stato di proliferazione del tumore.



B

Diversamente da quanto succede per lo stato genico, per il quale non si osservavano differenze nell'amplificazione della PLC β 1 tra tumori *in situ* ed infiltranti, mentre le differenze sono forti nelle categorie proliferative, l'espressione proteica sembra associarsi maggiormente con lo stato di invasività della neoplasia e non con la proliferazione, nonostante non si raggiungano differenze statisticamente significative. Come mostrato in Figura 17, infatti, il 62,5% dei tumori infiltranti analizzati mostra una iperespressione della PLC β 1 contro il 44,5% dei tumori *in situ*, mentre le percentuali nei tumori a bassa ed alta proliferazione sono praticamente sovrapponibili (58,4% e 53,8% rispettivamente).

5. Concordanza tra FISH, Real-Time PCR ed IIC

Per analizzare se vi fosse concordanza tra le metodiche FISH ed IIC è stata verificata la presenza di una associazione tra i livelli genici e proteici della PLC β 1. Come mostrato in Tabella 8, il 53% dei casi che non ha amplificazione genica non mostra neppure iperespressione e il 61% di quelli con amplificazione ha anche alti livelli proteici. Tuttavia, data la presenza di un'alta percentuale di casi in cui all'elevato numero di copie geniche non si associano livelli proteici proporzionali e viceversa (39% e 47%), il dato di associazione tra le due variabili non è significativo.

	PLC β 1 ipoespressa (IIC) (n=22)	PLC β 1 iperespressa (IIC) (n=28)
PLC β 1 Non Amplificata (n=19)	53% (10)	47% (9)
PLC β 1 Amplificata (n=31)	39% (12)	61% (19)

Tabella 8. Concordanza tra stato genico e livelli proteici della PLC β 1

Anche per ciò che concerne la correlazione tra livelli del trascritto e proteina, la concordanza è piuttosto bassa, facendo ipotizzare o delle limitazioni tecniche dovute all' anticorpo utilizzato, o possibili modificazioni post-trascrizionali che impediscono il corretto svolgimento del processo traduzionale.

6. Correlazione tra la PI-PLC β 1 ed altri parametri clinico-patologici

Come precedentemente osservato, l'assetto genico della PLC β 1 sembra essere indipendente dallo stato di invasività del tumore, mentre si associa fortemente con l'indice proliferativo ($p= 0,001$).

In analisi univariata è stata individuata anche una forte associazione tra amplificazione e grado tumorale ($p= 0,032$), con un aumento del numero di casi amplificati proporzionalmente all'aumento del grado tumorale. In particolare ben il 77% dei tumori ad alto grado mostrava un amplificazione della PLC β 1.

Si è poi proceduto ad analizzare l'associazione dell'amplificazione del gene d'interesse con altri parametri usati comunemente come fattori predittivi di risposta a terapia o prognostici nel carcinoma della mammella.

Come si osserva in Tabella 9, vi è una stretta correlazione tra numero di copie geniche e positività ai recettori ormonali, con valori al limite della significatività statistica (ER $p= 0,051$; PgR $p= 0,07$). La stretta relazione tra stato recettoriale e fosfolipasi è suggerita anche dalla associazione inversa tra livelli di recettori per il progesterone ed espressione delle due isoforme della PLC β 1, associazione che tende alla significatività ($p = 0,06$), nonostante non la si raggiunga, probabilmente a causa del numero esiguo di casi.

Anche per ciò che concerne HER2, nonostante non si raggiunga la significatività, la percentuale di casi con amplificazione della PLC β 1 che mostrano anche amplificazione di HER2 è pari al 76% contro il 54% dei casi in cui vi è l'amplificazione della sola PLC β 1.

	PLCβ1 Non amplificata	PLCβ1amplificata	p-value
Invasività			0,857
DCIS	8 (40%)	12 (60%)	
IBC	12 (37%)	20 (63%)	
Grado			0,032
1	4 (57%)	3(43%)	
2	10 (50%)	10 (50%)	
3	5 (23%)	17 (77%)	
MAI			0,001
Bassa proliferazione	16 (62%)	10 (38%)	
Alta proliferazione	4 (15%)	22 (85%)	
ER			0,051
<10	3 (19%)	13 (81%)	
≥10	17 (47%)	19 (53%)	
PgR			0,07
<10	8 (28%)	21 (72%)	
≥10	12 (52%)	11 (48%)	
HER2			0,123
NA	16 (46%)	19 (54%)	
A	4 (24%)	13 (76%)	

Tabella 9. Correlazione tra l'assetto genico della PLCβ1 e parametri clinico-patologici del carcinoma della mammella

I dati di FISH sono stati infine anche rielaborati alla luce della suddivisione nei tre sottotipi (tripli negativi, HER2 positivi e luminali). Ciò che si è osservato è che la percentuale di casi amplificati per la PLCβ1 era via via maggiore nei tumori più aggressivi e precisamente 48% nel sottogruppo dei tumori luminali, 76% nel sottogruppo dei tumori HER2 positivi ed 83% nei tripli negativi. Nonostante tali differenze tra le classi, l'associazione tra amplificazione e sottotipi non raggiunge la significatività statistica, anche se emerge una certa tendenza ($p=0,081$).

Tuttavia, analizzando l'amplificazione del gene nei soli tumori luminali, il meno aggressivo fra i tre sottotipi, si osserva una associazione statisticamente significativa ($p=0,027$), in linea con quanto è stato notato per i recettori ormonali: in tale sottogruppo vi è la più bassa percentuale di tumori con amplificazione genica della PLCβ1, confermando l'ipotesi che questo fenomeno sia indice di aggressività.

Infine, è stata condotta una analisi multivariata per verificare quale fossero i parametri che più strettamente si associavano con l'aumento del numero di copie della PLC β 1: ciò che l'elaborazione ha fatto emergere, confermando i dati visti in analisi univariata, è che l'unica variabile indipendente è l'indice proliferativo ($p=0,003$).

Per ciò che concerne l'associazione dei livelli proteici della PLC β 1 con i medesimi parametri non si sono osservate correlazioni significative, ad ulteriore conferma che il dato genico, più che i livelli proteici della PLC β 1 correlano con l'aggressività nel carcinoma della mammella.

7. PI-PLC β 1 e prognosi nel tumore mammario

Come già menzionato, per la maggioranza dei pazienti (79%) è stato possibile recuperare le informazioni di *follow up* e valutare l'evoluzione o meno della malattia alla luce dei risultati dell'analisi della PLC β 1.

Tra questi pazienti, osservati per un periodo mediano di 29 mesi (range 8 mesi - 126 mesi) dopo l'intervento chirurgico (per lo più quadrantectomie e mastectomie), solo 6 pazienti hanno avuto progressione di malattia o recidiva e 2 sono deceduti dopo aver progredito.

E' interessante notare che tutti questi 6 pazienti (100%) in FISH presentavano l'amplificazione della PLC β 1. Tuttavia l'unica analisi statistica che è stato possibile condurre, cioè il Log Rank Test, non ha dato risultati significativi, forse a causa dello sbilanciamento delle classi. A causa di questo stesso motivo, ovvero una disomogenea ripartizione degli eventi (tutti gli eventi, cioè progressioni di malattia o recidive, mostravano amplificazione) non è stato possibile neppure effettuare un' analisi sulle curve di sopravvivenza libera da malattia mediante analisi di Kaplan-Meier.

DISCUSSIONE

Come la maggioranza delle neoplasie umane, il cancro della mammella presenta aberrazioni nelle vie di trasduzione del segnale che portano ad un aumento dell'attività proliferativa ed angiogenetica, all'inibizione dell'apoptosi e alla metastatizzazione. Nonostante l'identificazione di vari *markers* biologici, ad oggi non sono stati individuati validi marcatori prognostici né tantomeno è chiaro quali siano le molecole associate con la progressione da lesione *in situ* a carcinoma invasivo.

Infatti, sebbene l'incidenza dei DCIS stia aumentando, poter predire il loro reale potenziale maligno rimane ancora un mistero. Ad oggi, solo pochi fattori, come il grado nucleare e la necrosi consentono una classificazione più fine di questa categoria tumorale, ma, sfortunatamente, essa non permette sempre di predire correttamente se il tumore progredirà, diventando invasivo, o recidiverà (Maxhimer *et al*, 2005).

Per questo motivo nella casistica di tumori mammari considerata abbiamo incluso sia tumori infiltranti, sia tumori ben localizzati all'interno del dotto lattifero.

Lo studio si è focalizzato sull'analisi della via di trasduzione dei fosfoinositidi, la quale gioca un ruolo fondamentale nella trasformazione e progressione tumorale.

Alcuni studi hanno dimostrato una stretta correlazione tra grado di malignità e concentrazione di inositolo 1,4,5 trifosfato (Weber *et al*, 2005) e messo in evidenza come gli enzimi coinvolti nel *pathway* dei fosfoinositidi siano in grado di adattarsi al programma proliferativo del tumore, in particolare producendo, in base alle richieste, le forme fosforilate di fosfatidilinositolo e trasformandole prontamente in secondi messaggeri, attraverso un eccesso di fosfolipasi (Weber *et al*, 1999).

Nonostante il ruolo di alcune isoforme della fosfolipasi nel modulare la motilità e l'invasività delle cellule tumorali di mammella sia stata già documentata (Kassis *et al*, 1999), il ruolo delle differenti isoforme nella trasformazione tumorale e la loro correlazione con fattori prognostici non è stata del tutto esplorata.

L'isoforma al centro della nostra ricerca è stata la PLC β 1.

Gli esperimenti di ibridazione *in situ* fluorescente, condotti per determinare l'assetto del gene di nostro interesse, hanno messo in evidenza che la maggioranza (83%) dei pazienti in analisi presentava aneusomie del locus 20p12, dove mappa la PLC β 1, ed in particolare il fenomeno più frequentemente osservato era l'amplificazione di tale porzione cromosomica.

Ciò è in linea con quanto osservato in numerosi studi, ovvero l'alta frequenza di tumori con aneuploidie del cromosoma 20 tipicamente riscontrata in questa neoplasia (Persons *et*

al,1996; Ginestier *et al*, 2006).

Tuttavia, data l'eterogeneità delle cellule tumorali e la presenza di molteplici oncogeni/oncosoppressori candidati, nel carcinoma sporadico della mammella è molto difficile determinare se uno sbilanciamento cromosomico, riguardante un intero cromosoma o una porzione limitata, influenzi o no lo sviluppo del tumore (Beckmann *et al*, 1997).

Per rispondere a questo primo quesito è stata verificata l'associazione dell'amplificazione osservata con due tra i principali parametri clinico-patologici utilizzati per il carcinoma della mammella: lo stato di invasività e l'indice proliferativo.

Data la scarsa differenza nelle percentuali di casi amplificati tra tumori in situ ed infiltranti, a parità di categoria proliferativa, possiamo concludere che lo stato allelico della PLC β 1 sembra essere indipendente dall'invasività della neoplasia.

Ciò che invece si associa fortemente ($p= 0,001$) con l'amplificazione genica osservata è l'indice di attività mitotica (MAI), in linea con le osservazioni che indicano una stretta correlazione tra contenuto alterato di DNA ed una rapida proliferazione e/o scarsa differenziazione (Silvestrini *et al*, 2000).

Tra l'altro, nonostante il ruolo delle fosfolipasi durante il processo mitotico non sia ancora del tutto chiaro, alcuni studi hanno riportato la possibilità che essa sia regolata in un modo "ciclo-specifico" e possa essere coinvolta nella funzionalità del cinetocore e nel mantenimento del fuso mitotico. (Lin *et al*, 2000)

Al fine di verificare se l'amplificazione genica osservata avesse dirette implicazioni funzionali nei tumori considerati si è deciso, successivamente, di analizzare l'espressione della PLC β 1 mediante approccio di immunistochimica.

Un'alterata espressione della proteina in esame, altamente espressa nel tessuto neuronale (Hannan *et al*, 1998), è stata documentata in alcuni tumori solidi, come il carcinoma del polmone a piccole cellule (SCLC), dove gioca un ruolo importante nella stimolazione della proliferazione da parte di fattori di crescita neuroendocrini (Strasheim *et al*, 2000). Inoltre, studi sulle linee cellulari di epatoma di Morris hanno evidenziato la presenza della PLC β 1 sia nel nucleo che nel citoplasma di tali cellule tumorali, confermando il potenziale ruolo oncogenico di tale enzima (Santi *et al*, 2003).

Per ciò che concerne il tumore della mammella, il principale studio è stato condotto mediante immunocitochimica su linee cellulari di carcinoma mammario al fine di valutare l'espressione delle varie isoforme di PLC: in esso veniva mostrata una intensa positività alla isoforma β 2, correlata con l'invasività tumorale e prognosi avversa, mentre veniva

affermato che la PLC β 1 nelle linee cellulari analizzate non era espressa (Bertagnolo *et al*, 2006).

Tuttavia i nostri risultati indicano che le cellule neoplastiche esprimono la PLC β 1, con livelli proteici mediamente molto più elevati rispetto al tessuto mammario sano, che invece risulta negativo. La reattività risulta prettamente di membrana e citoplasmatica, mentre a livello nucleare non vi è evidenza di espressione. Ciò farebbe supporre una netta prevalenza dell'isoenzima 1a che, possedendo un dominio NES, si localizza prevalentemente nel citoplasma. Tuttavia ciò viene smentito dagli esperimenti in Real-Time-PCR dai quali emerge che, a livello di messaggero, l'isoforma prevalente è la 1b.

La seconda ipotesi è che l'anticorpo utilizzato non sia in grado di riconoscere l'isoforma nucleare 1b e dunque i livelli proteici rilevati siano solo parziali. Ciò spiegherebbe anche la concordanza scarsa tra le metodiche FISH ed IHC: infatti, nonostante le due tecniche individuino fenomeni diversi, in genere, ad uno stato di amplificazione genica si accompagna una iperespressione della proteina. Nel nostro studio invece il 39% dei casi amplificati risultano esprimere la PLC β 1 solo a livelli bassi e questo potrebbe trovare spiegazione nel fatto che l'anticorpo utilizzato individui preferenzialmente l'isoforma 1a.

Un'altra possibile spiegazione alla discordanza parziale osservata tra livelli genici e proteici potrebbe essere il fenomeno della polisomia. Infatti molti tumori possono avere uno stato di amplificazione dell'intero cromosoma 20, fenomeno frequentemente riscontrato nei tumori duttali della mammella, ma non mostrare alcun incremento della PLC β 1, in quanto, biologicamente, l'evento cardine dell'amplificazione osservata non è l'aumento del numero di copie del gene d'interesse.

Per far luce sul reale ruolo funzionale di questo enzima sono stati condotti alcuni esperimenti in Real-Time PCR, al fine di quantificare i livelli di messaggero. A causa delle difficoltà nel reperire materiale fresco da stoccare, data la dimensione sempre più ridotta delle lesioni operate, è stato possibile condurre l'analisi solo su un numero ristretto di campioni. Gli esperimenti mostrano che i livelli di mRNA dell'isoenzima 1b sono mediamente più elevati dell'isoenzima 1a, in accordo con quanto osservato anche nei pazienti affetti da sindromi mielodisplastiche (Follo *et al*, 2006). Non si osservano tuttavia associazioni significative tra l'espressione dei due isoenzimi singolarmente e le categorie proliferative o lo stato di amplificazione del gene.

Ciò che invece emerge, nonostante la casistica vada ampliata, è l'associazione statisticamente significativa tra amplificazione ed iperespressione del messaggero della PLC β 1, inteso come somma dell'espressione delle due isoforme insieme.

Per verificare ulteriormente che lo stato di amplificazione genica del locus 20p12 fosse dovuto ad un reale ruolo della PLC β 1, sono stati quantificati i livelli di trascritto di un altro gene, localizzato poco distante (20p13): la CDC25, isoforma B. Il ruolo di questo potenziale oncogene nel tumore della mammella, specialmente nelle fasi iniziali della progressione, è ben documentato (Ito *et al*, 2004; Ma *et al*, 2001). I nostri dati (dati non mostrati) indicano, tuttavia, che non vi sono differenze di espressione della CDC25 nei tumori con o senza amplificazione della PLC β 1, a supporto della tesi che vede la PLC β 1 come uno dei mediatori chiave dell'aggressività nei tumori della mammella.

Tale tesi viene avvalorata anche dai risultati che mostrano l'associazione dell'amplificazione del locus 20p12 con altri parametri clinico patologici importanti per questa neoplasia.

Ad esempio, tra i migliori predittori di *outcome* clinico ed indicatori di scelta terapeutica vi sono, oltre allo stato proliferativo, il grado tumorale e lo stato dei recettori ormonali. I risultati ottenuti evidenziano che la percentuale di cellule con l'amplificazione della PLC β 1 è via via maggiore all'aumentare del grado del tumore considerato ($p=0,032$) e, viceversa è inferiore per quei casi che mostrano positività ai recettori per estrogeni e progesterone (ER $p=0,051$; PgR $p=0,07$). Se si considera poi la classe dei tumori di tipo luminale, ovvero tutti i tumori positivi per i recettori ormonali e senza l'amplificazione di HER2, l'associazione con l'amplificazione diventa statisticamente ancora più significativa ($p=0,027$), con percentuali di tumori amplificati molto maggiori nei tumori negativi per i recettori ormonali.

Tutti questi dati insieme supportano l'ipotesi che la PLC β 1 sia un parametro in stretta relazione con l'aggressività della malattia.

A confermare ciò vi sono anche i dati di storia clinica dei pazienti.

Infatti, nonostante i dati di *follow-up* non fossero disponibili per tutti i pazienti e non tutti siano stati seguiti per un tempo sufficientemente lungo, i nostri risultati indicano che tutti gli eventi occorsi, ovvero i casi che hanno recidivato o con progressione di malattia, mostravano amplificazione nel locus in esame.

Tali considerazioni sono in apparente contrasto con quanto individuato in studi su sindromi mielodisplastiche, nelle quali delezioni monoalleleliche a carico del gene della PLC β 1 sembrano associarsi ad un decorso clinico peggiore (Lo Vasco *et al*, 2004, Lo Vasco *et al*, 2006).

Tuttavia, in questi pazienti affetti da MDS ad alto rischio con delezione della PLC β 1 è stata osservata una attivazione delle vie di segnalazione Akt-dipendente, con conseguente

sbilanciamento tra proliferazione ed apoptosi (Follo *et al*, 2008).

Non avendo affrontato nel nostro studio l'analisi di quest'ultima via di segnalazione, possiamo supporre che nel tumore della mammella gli stessi effetti sull'evoluzione della malattia siano raggiunti attraverso meccanismi diversi ed interazione tra *pathways* differenti.

In particolare è noto che le vie di segnalazione lipidica intranucleare, di cui la PLC β 1 è la principale protagonista, rivestono un ruolo importante nei processi di proliferazione e differenziamento cellulare che sono strettamente correlati alla trasformazione neoplastica (Martelli *et al*, 2005). Infatti, tale enzima, in risposta ad uno stimolo mitogenico innescato da IGF1R, può influenzare l'espressione della ciclina D3 ed agire quindi sulla progressione lungo la fase G1 del ciclo cellulare. Tra l'altro, nel caso specifico della mammella, diversi studi hanno mostrato come proprio la ciclina D3 abbia un ruolo importante nella tumorigenesi e sia responsabile dell'attivazione di pathway oncogenici distinti da quelli indotti dalla ciclina D1 (Wong *et al*, 2001; Murray *et al*, 2006)

Data l'importanza del *crosstalk* tra diverse vie di segnalazione tipicamente riscontrato nel carcinoma della mammella (Osborne *et al*, 2005), la PLC β 1 potrebbe giocare un ruolo nel mantenimento del *loop a feedback positivo* responsabile della sopravvivenza e proliferazione cellulare del carcinoma della mammella.

Dunque, nonostante siano risultati preliminari, i nostri dati suggeriscono che la PLC β potrebbe essere un marcatore di aggressività da considerare per poter raggiungere una attività terapeutica ottimale ed avere informazioni sulla prognosi del paziente.

BIBLIOGRAFIA

Allred DC, Hilsenbeck SG, Mohsin SK. **Biological features of human premalignant breast disease.** Diseases of the breast, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,; 2004; 512-3

Allred DC, Mao S, Nagtegaal ID, Lee S, Perou CM, Mohsin SK, O'Connell P, Tsimelzon A, Medina D. **Ductal carcinoma in situ and the emergence of diversity during breast cancer evolution.** Clin Cancer Res 2008; 14(2):370-378

Arpino G, Wiechmann L, Osborne C K, Schiff R. **Cross-talk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance.** Endocrine Reviews, 2008

Bahk YY, Song H, Baek SH, Park BY, Kim H, Ryu SH, Suh PG. **Localization of two forms of phospholipase C-beta1, a and b, in C6Bu-1 cells.** Biochim Biophys Acta. 1998;1389:76-80

Bast RC Jr, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H Jr, Jessup JM, Kemeny N, Locker GY, Mennel RG, Somerfield MR. American Society of Clinical Oncology Tumor Markers Expert Panel. **2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology.** J Clin Oncol. 2001;19(6):1865-78

Beato M. **Gene regulation by steroid hormones.** Cell 1989; 56:335-44

Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson B, Bender HG **Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumor heterogeneity.** J. Mol. Med. 1997; 75:429-439

Berridge MJ, Irvine RF. **Inositol phosphates and cell signalling.** Nature. 1989; 341(6239):197-205

Bertagnolo V, Benedusi M, Querzoli P, Pedriali M, Magri E, Brugnoli F, Capitani S. **PLC-beta2 is highly expressed in breast cancer and is associated with a poor outcome: a study on tissue microarrays.** Int. J. Oncol., 2006; 28, 863-872

Cocco L, Martelli AM, Gilmour RS, Rhee SG, Manzoli FA. **Nuclear phospholipase C and signaling.** Biochim Biophys Acta, 2001;1530:1-14

Descamps S, Lebourhis X, Delehedde M, Boilly B, Hondermarck H. **Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells.** J Biol Chem, 1998; 273(27):16659-62

Dupont J, Le Roith D. **Insulin-like growth factor 1 and oestradiol promote cell proliferation of MCF-7 breast cancer cells: new insights into their synergistic effects.** Mol Pathol, 2001; 54(3):149-54

Ethier SP. **Growth factor synthesis and human breast cancer progression.** J Natl Cancer Inst, 1995; 87(13):964-73

Faenza I, Billi AM, Follo MY, Fiume R, Martelli AM, Cocco L, Manzoli L. **Nuclear phospholipase C signaling through type 1 IGF receptor and its involvement in cell growth and differentiation.** Anticancer Res, 2005; 25(3B):2039-41

Faenza I, Matteucci A, Manzoli L, Billi AM, Aluigi M, Peruzzi D, et al. **A role for nuclear phospholipase C beta 1 in cell cycle control.** J Biol Chem, 2000; 275:30520-30524.

Fischer M, Skowron M, Berthold F. **Reliable transcript quantification by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction in primary neuroblastoma using normalization to averaged expression levels of the control genes HPRT1 and SDHA.** J Mol Diagn, 2005;7(1):89-96

Follo MY, Bosi C, Finelli C, Fiume R, Faenza I, Ramazzotti G, Gaboardi GC, Manzoli L, Cocco L. **Real-time PCR as a tool for quantitative analysis of PI-PLC β 1 gene expression in myelodysplastic syndrome.** Int J Mol Med. 2006;18:267-271

Follo MY, Finelli C, Bosi C, Martinelli G, Mongiorgi S, Bacarani M, Manzoli L, Blalock WL, Martelli AM, Cocco L. **PI-PLCbeta-1 and activated Akt levels are linked to azacitidine responsiveness in high-risk myelodysplastic syndromes.** *Leukemia.* 2008;22(1):198-200

Follo MY, Lo Vasco VR, Martinelli G, Palka G, Cocco L. **PLCB1 (phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)).** *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2005 .URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/PLCB1ID41742ch20p12.html>

Ginestier C, Cervera N, Finetti P, Esteyries S, Esterni B, Adélaïde J, Xerri L, Viens P, Jacquemier J, Charafe-Jauffret E, Chaffanet M, Birnbaum D, Bertucci F. **Prognosis and gene expression profiling of 20q13-amplified breast cancers.** *Clin Cancer Res.* 2006; 12(15):4533-44

Greco S, Muscella A, Elia MG, Salvatore P, Storelli C, Mazzotta A, Manca C, Marsigliante S. **Angiotensin II activates extracellular signal regulated kinases via protein kinase C and epidermal growth factor receptor in breast cancer cells.** *J Cell Physiol.* 2003;196(2):370-7

Hannan AJ, Kind PC, Blakemore C. **Phospholipase C-beta1 expression correlates with neuronal differentiation and synaptic plasticity in rat somatosensory cortex.** *Neuropharmacology.* 1998; 37(4-5):593-605

Hodgson JG, Chin K, Collins C, Gray JW. **Genome amplification of chromosome 20 in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 78(3):337-45

Irvine RF. **Nuclear lipid signalling.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4: 349-360

Isola JJ, Kallioniemi OP, Chu LW, Fuqua SA, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Waldman FM. **Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer.** *Am J Pathol.* 1995;147(4):905-11

Ito Y, Yoshida H, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kuma K, Miyauchi A. **Expression of cdc25A and cdc25B phosphatase in breast carcinoma.** *Breast Cancer.* 2004;11:295-300

James LA, Mitchell EL, Menasce L, Varley JM. **Comparative genomic hybridisation of ductal carcinoma in situ of the breast: identification of regions of DNA amplification and deletion in common with invasive breast carcinoma.** *Oncogene*. 1997;14(9):1059-65

Kassis J et al. **A role for phospholipase C-gamma-mediated signalling in tumor cell invasion.** *Clin Cancer Res*, 1999; 5: 2251–2260

Lee CH, Park D, Wu D, Rhee SG, Simon MI. **Members of the Gq alpha subunit gene family activate phospholipase C beta isozymes.** *J Biol Chem*. 1992; 267:16044-16047

Letessier A, Sircoulomb F, Ginestier C, Cervera N, Monville F, Gelsi-Boyer V, Esterni B, Geneix J, Finetti P, Zemmour C, Viens P, Charafe-Jauffret E, Jacquemier J, Birnbaum D, Chaffanet M. **Frequency, prognostic impact, and subtype association of 8p12, 8q24, 11q13, 12p13, 17q12, and 20q13 amplifications in breast cancers.** *BMC Cancer*. 2006; 6:245

Leung DW et al. **Phospholipase C delta-4 overexpression upregulates ErbB1/2 expression, Erk signaling pathway, and proliferation in MCF-7 cells.** *Mol. Cancer*, 2004; 13: 1- 15

Lin H, Choi JH, Hasek J, DeLillo N, Lou W, Vancura A. **Phospholipase C is involved in kinetochore function in *Saccharomyces cerevisiae*,** *Mol. Cell. Biol*. 2000 20: 3597–3607

Lo HW, Hsu SC, Hung MC. **EGFR signaling pathway in breast cancers: from traditional signal transduction to direct nuclear translocalization.** *Breast Cancer Res Treat*. 2006; 95(3):211-8

Lo Vasco VR, Calabrese G, Manzoli L, Palka G, Spadano A, Morizio E, Guanciali-Franchi P, Fantasia D and Cocco L: **Inositide-specific phospholipase c beta1 gene deletion in the progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia.** *Leukemia*. 2004;18:1122-1126

Lo Vasco VR, Follo MY, Cocco L. **Reply to Herens et al.** *Leukemia*. 2006;20:522-3

Ma ZQ, Liu Z, Ngan ES, Tsai SY. **Cdc25B functions as a novel coactivator for the steroid receptors.** *Mol Cell Biol*. 2001;21(23):8056-67

Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L. **Prognostic factors in early breast carcinoma.** *Cancer*, 1994; 74: 381-400

Manzoli L, Billi AM, Rubbini S, Bavelloni A, Faenza I, Gilmour RS, et al. **Essential role for nuclear phospholipase C beta1 in insulin-like growth factor I-induced mitogenesis.** *Cancer Res*.1997;57:2137-2139

Martelli AM, Billi AM, Gilmour RS, Neri LM, Manzoli L, Ognibene A. et al. **Phosphoinositide signaling in nuclei of Friend cells: phospholipase C beta down-regulation is related to cell differentiation.** *Cancer Res*. 1994;54:2536-2540

Martelli AM, Billi AM, Manzoli L, Faenza I, Aluigi M, Falconi M, et al. **Insulin selectively stimulates nuclear phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) beta1 activity through a mitogen-activated protein (MAP) kinase-dependent serine phosphorylation.** *FEBS Lett*. 2000;486:230-236

Martelli AM, Fiume R, Faenza I, Tabellini G, Evangelista C, Bortul R, et al. **Nuclear phosphoinositide specific phospholipase C (PI-PLC)-beta 1: a central intermediary in nuclear lipiddependent signal transduction.** *Histol Histopathol*. 2005;20:1251-1260

Martelli AM, Manzoli L, Cocco L. **Nuclear inositides: facts and perspectives.** *Pharmacol Ther*. 2004;101:47-64.

Matteucci A, Faenza I, Gilmour RS, Manzoli L, Billi AM, Peruzzi D, et al. **Nuclear but not cytoplasmic phospholipase C beta 1 inhibits differentiation of erythroleukemia cells.** *Cancer Res*.1998;58:5057-5060

Maxhimer JB, Pesce CE, Stewart RA, Gattuso P, Prinz RA, Xu X. **Ductal carcinoma in situ of the breast and heparanase-1 expression: a molecular explanation for more aggressive subtypes.** J Am Coll Surg. 2005 Mar;200(3):328-35

Medri L, Volpi A, Nanni O, Vecci AM, Mangia A, Schittulli F, Padovani F, Giunchi DC, Zito A, Amadori D, Paradiso A, Silvestrini R. **Prognostic relevance of mitotic activity in patients with node-negative breast cancer.** Mod Pathol. 2003;16(11):1067-75

Murray TJ, Yang X, Sherr DH. **Growth of a human mammary tumor cell line is blocked by galangin, a naturally occurring bioflavonoid, and is accompanied by down-regulation of cyclins D3, E, and A.** Breast Cancer Res. 2006;8(2):R17

Nakopoulou L, Tsirmpa I, Giannopoulou I, Trafalis D, Katsarou S, Davaris P. **Aneuploidy of chromosome 20 in invasive breast cancer correlates with poor outcome.** Cancer Genet Cytogenet. 2002;134(2):127-32

Odom AR, Stahlberg A, Wenthe SR, York JD. **A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control.** Science. 2000; 287(5460):2026-9.

Osborne CK, Shou J, Massarweh S, and Rachel Schiff. **Crosstalk between Estrogen Receptor and Growth Factor Receptor Pathways as a Cause for Endocrine Therapy Resistance in Breast Cancer.** Clinical Cancer Research 2005, 11: 865-870

Park D, Jhon DY, Lee CW, Lee KH, Rhee SG. **Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits.** J Biol Chem. 1993;268:4573-4576

Perks CM, Holly JM. **The insulin-like growth factor (IGF) family and breast cancer.** Breast Dis. 2003;18:45-60.

Perks CM, Holly JM. **The insulin-like growth factor (IGF) family and breast cancer.** Breast Dis. 2003;18:45-60

Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. **Molecular portraits of human breast tumours.** Nature. 2000; 406(6797):747-52

Persons DL, Robinson RA, Hsu PH, Seelig SA, Borell TJ, Hartmann LC, Jenkins RB. **Chromosome-specific aneusomy in carcinoma of the breast.** Clin Cancer Res. 1996; 2(5):883-8

Peruzzi D, Aluigi M, Manzoli L, Billi AM, Di Giorgio FP, Morleo M, et al. **Molecular characterization of the human PLC beta1 gene.** Biochim Biophys Acta, 2002;1584:46-54

Peruzzi D, Calabrese G, Faenza I, Manzoli L, Matteucci A, Gianfrancesco F, Billi AM, Stuppia L, Palka G and Cocco L: **Identification and chromosomal localisation by fluorescence in situ hybridisation of human gene of phosphoinositide-specific phospholipase C beta(1).** Biochim Biophys Acta, 2000;1484:175-182

Razzini G, Brancaccio A, Lemmon MA, Guarnirei S, Falasco M. **The role of the pleckstrin homology domain in membrane targeting and activation of phospholipase Cbeta1.** J Biol Chem. 2000;275:14873-14881

Rebecchi MJ and Pentylala SN **Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C.** Physiol Rev, 2000; 80: 1291-1335

Reis-Filho JS, Lakhani SR. **The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: genetic alterations in pre-invasive lesions.** Breast Cancer Res. 2003; 5(6):313-9

Rhee SG. **Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C.** Annu Rev Biochem. 2001;70:281-312

Rosen PP, Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S. **Invasive mammary carcinoma.** Lippincott-Raven, Philadelphia

Santi P, Solimando L, Zini N, Santi S, Riccio M, Guidotti L. **Inositol-specific phospholipase C in low and fast proliferating hepatoma cell lines.** Int J Oncol. 2003 May;22(5):1147-53

Shou J, Massarweh S, Osborne CK, et al. **Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu crosstalk in ER/HER2- positive breast cancer.** J Natl Cancer Inst 2004;96:926–35

Silvestrini R. **Relevance of DNA-ploidy as a prognostic instrument for solid tumors.** Ann Oncol. 2000 ;11(3):259-61

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. **Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.** Science. 1989;244(4905):707-12

Song RX, Zhang Z, Chen Y, Bao Y, Santen RJ. **Estrogen signaling via a linear pathway involving insulin-like growth factor I receptor, matrix metalloproteinases, and epidermal growth factor receptor to activate mitogen-activated protein kinase in MCF-7 breast cancer cells.** Endocrinology. 2007 Aug;148(8):4091-101

Sørli T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, Børresen-Dale AL **Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms.** BMC Genomics. 2006; 26;7:127

Strassheim D, Shafer SH, Phelps SH, Williams CL. **Small cell lung carcinoma exhibits greater phospholipase C-beta1 expression and edelfosine resistance compared with non-small cell lung carcinoma.** Cancer Res. 2000;60(10):2730-6

Tan BK, Tan LK, Yu K, Tan PH, Lee M, Sii LH, Wong CY, Ho GH, Yeo AW, Chow PK, Koong HN, Yong WS, Lim DT, Ooi LL, Soo KC, Tan P. **Clinical validation of a customized multiple signature microarray for breast cancer.** Clin Cancer Res. 2008 ;15;14(2):461-9

Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Holli K, Collins C, Kowbel D, Gray JW, Kallioniemi OP, Isola J. **Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: prognostic implications.** Clin Cancer Res. 1995;1(12):1455-61

Tavassoli FA and Devilee P **World Health Organization Classification of tumors: pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs.** WHO, IARC, Lyon, 2003

Tokunaga E, Kimura Y, Mashino K, Oki E, Kataoka A, Ohno S, Morita M, Kakeji Y, Baba H, Maehara Y. **Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast cancer.** Breast Cancer 2006; 13:137-144

Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C. **Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies.** Anal Biochem. 2002 Oct 15;309(2):293-300

Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. **Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer.** Ann Oncol. 2007;18(6):977-84

Van de Vijver MJ, He YD and Peterse HL. **Pathological diagnosis-problems with existing classifications.** Breast Cancer Res 2003;5:269-275

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** Genome Biol. 2002;3(7)

Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der KK, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. **Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.** Nature 2002, 415:530-536

Vestey SB, Sen C, Calder CJ, Perks CM, Pignatelli M, Winters ZE. **Activated Akt expression in breast cancer: correlation with p53, Hdm2 and patient outcome.** European Journal of Cancer 2005; 41:1017–1025

Weber G, Shen F, Yang H, Prajda N, Li W. **Amplification of signal transduction capacity and down-regulation by drugs.** Adv Enzyme Regul. 1999;39:51-66

Weber G. **Down-regulation of increased signal transduction capacity in human cancer cells.** Adv Enzyme Regul. 2005;45:37-51

Wellings RR, Jensen HM. **On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast.** J Natl Cancer Inst. 1973; 50:1111-8

Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG. **An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions.** J Natl Cancer Inst. 1975; 55:231-73

Westley BR, Clayton SJ, Daws MR, Molloy CA, May FE. **Interactions between the oestrogen and insulin-like growth factor signalling pathways in the control of breast epithelial cell proliferation.** Biochem Soc Symp. 1998;63:35-44

Westley BR, Clayton SJ, Daws MR, Molloy CA, May FE. **Interactions between the oestrogen and insulin-like growth factor signalling pathways in the control of breast epithelial cell proliferation.** Biochem Soc Symp. 1998;63:35-44

Wilson CM, Tobin S and Young RC **The exploding worldwide cancer burden: the impact of cancer on women.** Int. J. Gynecol. Cancer 2004; 14: 1-11

Wong SC, Chan JK, Lee KC, Hsiao WL. **Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast.** J Pathol. 2001;194:35–42

World Health Organization (1981) **Histological typing of breast tumors.** In: Second international histological classification of tumours. World Health Organization, Geneva

Xing C, Imagawa W. **Altered MAP kinase (ERK1,2) regulation in primary cultures of mammary tumor cells: elevated basal activity and sustained response to EGF.** *Carcinogenesis*. 1999; 20(7):1201-8

Xu A, Suh PG, Marmy-Conus N, Pearson RB, Seok OY, Cocco L, Gilmour RS. **Phosphorylation of nuclear phospholipase C beta1 by extracellular signal-regulated kinase mediates the mitogenic action of insulin-like growth factor I.** *Mol Cell Biol*. 2001;21:2981-2990