

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Dottorato di Ricerca in  
ONCOLOGIA E PATOLOGIA SPERIMENTALE  
-Progetto 1 Oncologia-

XXV CICLO

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D3

Settore Scientifico disciplinare: Med/06

**IDENTIFICAZIONE DI FATTORI TRASCRIZIONALI  
ASSOCIATI AL DIFFERENZIAMENTO NEURALE IN  
CELLULE DI SARCOMA DI EWING: RUOLO DI NF-kB**

Presentata da **Selena Ventura**

Coordinatore Dottorato

**Chiar.mo Prof.  
Sandro Grilli**

Relatore

**Chiar.mo Prof.  
Pietro Ruggieri**

Correlatore

**Chiar.ma Prof.ssa  
Katia Scotlandi**

**Esame finale anno 2013**



# SOMMARIO

INTRODUZIONE .....	1
1. IL SARCOMA DI EWING .....	1
2. LA MOLECOLA CD99 .....	11
3. MAPK E DIFFERENZIAMENTO NEURALE .....	16
4. NF-kB .....	21
SCOPO DELLA TESI.....	33
MATERIALI E METODI.....	34
RISULTATI.....	41
1. DATI PRELIMINARI.....	41
2. FATTORI TRASCRIZIONALI NEL MODELLO TC-CD99shRNA .....	45
3. MODELLO SPERIMENTALE CAR-CD99shRNA.....	49
4. FATTORI TRASCRIZIONALI NEL MODELLO CAR-CD99shRNA.....	53
5. SILENZIAMENTO DI CD99 E NF-kBp65 .....	56
6. SILENZIAMENTO DI EWS-FLI1 E NF-kBp65 .....	57
7. CD99 E EWS-FLI1 NELLA MODULAZIONE DELL' ATTIVITÁ TRASCRIZIONALE DI NF-kBp65 .....	58
8. CD99 E EWS-FLI1 NELLA MODULAZIONE DELL' ATTIVITÁ TRASCRIZIONALE DI NF-kBp65 E DEL DIFFERENZIAMENTO NEURALE.....	61
9. SILENZIAMENTO E OVERESPRESSIONE DI NF-kBp65 E DIFFERENZIAMENTO NEURALE .....	63
DISCUSSIONE.....	66
BIBLIOGRAFIA.....	72

# **INTRODUZIONE**

## **1. IL SARCOMA DI EWING**

### **1.1 Caratteristiche generali**

La prima definizione del sarcoma di Ewing (ES) risale al 1921 quando per la prima volta James Ewing lo classificò come “un diffuso endotelioma dell’osso di origine vascolare”, caratterizzato da piccole cellule rotonde (Ewing J, 1921). Ad oggi il sarcoma di Ewing è un tumore primitivo dell’osso inquadrato nella famiglia di tumori chiamati *Ewing’s sarcoma family tumors* (EFT) che comprende anche, ES atipico, ES extraosseo, il tumore di Askin della parete toracica e il tumore neuroectodermico primitivo periferico dell’osso (PNET).

Il sarcoma di Ewing è un tumore altamente maligno, particolarmente aggressivo, caratterizzato da piccole cellule rotonde scarsamente differenziate.

### **1.2 Epidemiologia e Fattori di rischio**

L’incidenza globale dei tumori primitivi dell’osso, che comprendono i sarcomi dell’osso e i sarcomi delle parti molli, è di circa 5 nuovi casi per 100.000 abitanti all’anno. Questa incidenza è simile in diversi paesi, con 3.000 nuovi casi per anno in Gran Bretagna e Italia (60 milioni di abitanti) e circa 12.000 nuovi casi in U.S.A (300 milioni di abitanti). Questa incidenza rispecchia non più dell’1% di tutti i tumori maligni. Nello specifico, i sarcomi dell’osso, hanno un’incidenza considerata 1/5 – 1/6 di tutti i sarcomi, con 0.8-1 nuovi casi/100.000 abitanti/anno (Jemal A et al. *CA Cancer J Clin*, 2007).

Nonostante il Sarcoma di Ewing sia una neoplasia rara, rappresenta il secondo tumore osseo primitivo che colpisce bambini e adolescenti dopo l'osteosarcoma (Stiller CA et al. *Eur J Cancer*, 2006).

Come riscontrato in altri tumori pediatrici, c'è una prevalenza nel genere maschile con un rapporto di circa 1,5:1. Il 90% dei casi insorge in pazienti tra 5 e 25 anni, con un picco tra 10 e 20 anni d'età.

I fattori etnici sono epidemiologicamente importanti. Per ragioni sconosciute, il sarcoma di Ewing colpisce principalmente soggetti di origine caucasica e sono estremamente rari i casi in soggetti afro-americani, africani e asiatici. Questo aspetto è ipotizzato essere in relazione ad un diverso polimorfismo delle sequenze Alu nell'introne 6 del gene EWS, coinvolto nella patogenesi del sarcoma di Ewing.

Il sarcoma di Ewing non risulta essere associato a nessuna sindrome familiare o congenita (Hartley AL et al. *J Natl Cancer Inst*, 1991; Buckley JD et al. *Cancer*, 1998), anche se una serie di casi riporta un eccesso di difetti congeniti mesenchimali nei pazienti affetti (McKeen EA et al, *N Engl J Med*, 1983) e un'altra riporta un aumento dei tumori neuroectodermici e cancro allo stomaco nelle famiglie dei pazienti con ES (Novakovic B et al. *J Natl Cancer Inst*, 1994).

Nessuna specifica esposizione ambientale è stata identificata come fattore di rischio (Buckley JD et al. *Cancer*, 1998; Yamamoto T and Wakabayashi T *Acta Pathol Jpn*, 1969). Raramente, ES si sviluppa dopo il trattamento di un tumore primitivo durante l'infanzia, ma la maggior parte dei casi non sembra correlare con i trattamenti di radioterapia (Tucker MA et al. *N Engl J Med*, 1987; Spunt SL et al. *Cancer*, 2006).

### **1.3 Localizzazione, Insorgenza e Istopatologia**

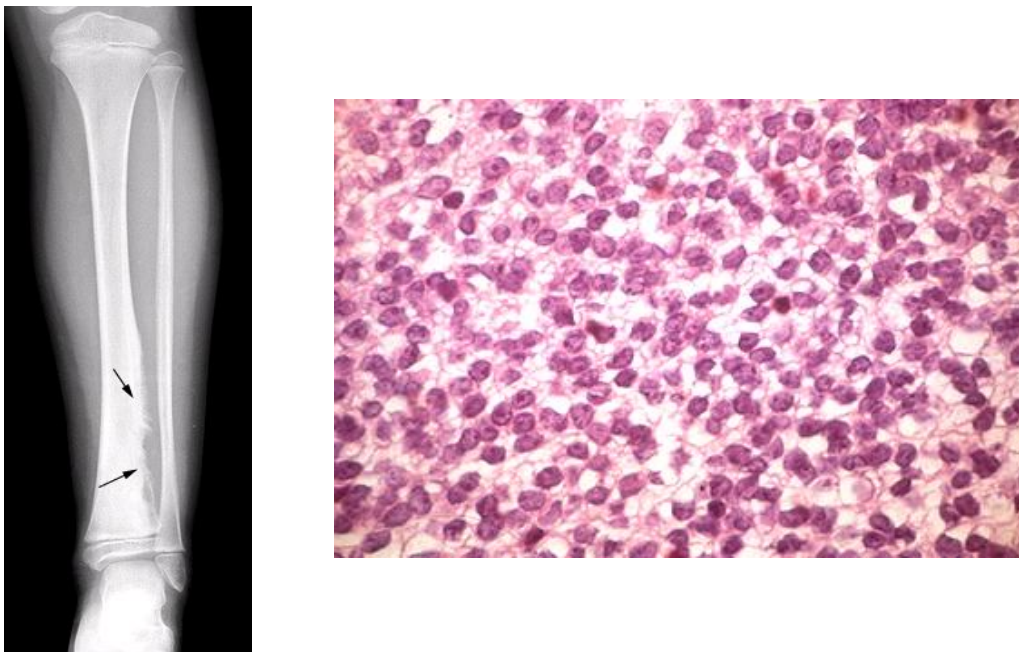
L'insorgenza del tumore può interessare qualsiasi segmento scheletrico, con nessuna differenza tra ossa lunghe, piatte o corte. Tra lo scheletro appendicolare, la più comune sede di localizzazione è il femore, seguita da tibia, omero, fibula e ossa dell'avambraccio. Nel tronco, la sede maggiormente interessata è la pelvi, seguita da vertebre e osso sacro, scapola, costole e clavicola. E' rara l'insorgenza del ES in mani, piedi e cranio. Nelle ossa lunghe, il tumore è comunemente presente nel

mediopeniene ma può coinvolgere una parte maggiore o addirittura l'intero osso.

Il sarcoma di Ewing penetra attraverso la corticale dell'osso e si espande nelle parti molli come una massa neoplastica grigia, molto soffice e spesso di struttura cistica; può essere iperemico o emorragico. La necrosi è molto comune ed estesa, in particolare al centro del tumore con un aspetto semiliquido. Nelle aree di necrosi l'infiltrazione leucocitaria può essere molto abbondante e non va confusa con osteomielite.

Microscopicamente il tumore è uniformemente composto da un fitto strato di piccole cellule rotondeggianti, la matrice è pressoché assente. Le cellule hanno un aspetto monotono, con contorni stentatamente definiti e uno scarso citoplasma granulare. I nuclei, rotondi - ovali hanno una ben distinta membrana nucleare, una cromatina fine e voluminosa e possiedono uno o più nucleoli. Le figure mitotiche sono solitamente rare.

Il tumore permea diffusamente il canale midollare prima di iniziare il processo di distruzione ossea. A questi processi segue un'ampia risposta neovascolare e infiammatoria, mentre la reazione fibro - ossea non è in grado di provvedere a un' efficace incapsulazione del tumore. Poiché è frequente l'estensione ai tessuti molli limitrofi da parte del sarcoma di Ewing osseo e l'infiltrazione nell'osso nel caso di tumori insorti nelle parti molli, è clinicamente difficile determinare la localizzazione originale del tumore primitivo.



**Figura 1.** Immagine radiografica e istologica del sarcoma di Ewing.

#### **1.4 Decorso clinico e terapia**

Il sarcoma di Ewing generalmente ha una crescita molto aggressiva e il decorso clinico è generalmente più rapido di quello di altri tumori primitivi dell'osso, aggravato dalla forte tendenza a dare metastasi multiple a polmoni, apparato scheletrico, linfonodi e cervello. In alcuni casi, in presenza di lesioni multiple dell'osso riscontrate alla diagnosi, distinguere se esse rappresentino metastasi o un'origine multicentrica del tumore primitivo può essere complesso.

Alla diagnosi circa il 20% dei pazienti presenta metastasi al midollo osseo, all'osso o al polmone; per questi pazienti la sopravvivenza a 5 anni si riduce al 20% circa, a differenza dei tumori primitivi localizzati che raggiungono il 60% di sopravvivenza. Fenomeno frequente è l'insorgenza di neoplasie secondarie, a carico di varie parti dello scheletro, soprattutto vertebre e cranio.

Il sarcoma di Ewing è sensibile alla chemioterapia e alla radioterapia ma la chirurgia gioca un ruolo fondamentale nel trattamento del tumore primitivo. L'approccio terapeutico comprende il trattamento locale del tumore (chirurgia e/o radioterapia) e cicli di chemioterapia sistemica (pre- e post-operatoria).

La sopravvivenza del sarcoma di Ewing in bambini e adulti non sembra differire in modo sostanziale e il trattamento clinico segue gli stessi principi base in entrambe le categorie di pazienti. Attualmente, la maggior parte dei piani di trattamento utilizza chemioterapia neoadiuvante con lo scopo di ridurre la massa tumorale, facilitare gli approcci conservativi in chirurgia e aumentare le probabilità di controllo locale della malattia.

Il trattamento standard di chemioterapia prevede l'utilizzo di una combinazione di 6 farmaci: vincristina, actinomicina D, adriamicina, ciclofosfamide, ifosfamide e etoposide. Pazienti con metastasi alla diagnosi trattati con lo stesso regime di chemioterapia dei pazienti con malattia localizzata hanno mostrato una peggiore prognosi. Per questi pazienti, risultati promettenti sono stati ottenuti con un approccio chemioterapico più massiccio, con cicli più ravvicinati nel tempo e con dosi più alte, seguito da ablazione midollare seguita da reinfusione delle cellule staminali periferiche e trapianto autologo del midollo osseo.

In casi di ricaduta, i regimi chemioterapici non sono standardizzati e sono comunemente basati su agenti alchilanti (ciclofosfamide e alte dosi di

ifofosfamide) in combinazione con inibitori delle topoisomerasi (etoposide e topotecano) o irinotecano con temozolomide.

Il sarcoma di Ewing è un tumore estremamente radiosensibile, ma richiede dosi elevate di radiazioni, comprese tra 40 e 60 G per essere adeguatamente trattato.

L'attuale trattamento multidisciplinare del sarcoma di Ewing, basato sulla combinazione di polichemioterapia pre- e post-operatoria, chirurgia e radioterapia, ha portato ad un significativo aumento della sopravvivenza da meno del 10% a circa il 60%. Nonostante questi miglioramenti, la prognosi per pazienti colpiti da sarcoma di Ewing resta infausta, soprattutto nel caso di metastasi alla diagnosi. Oltre a ricadute della malattia e formazione di metastasi, è stata osservata l'insorgenza di patologie derivate da tossicità dei chemioterapici o da alte dosi di radiazioni.

La possibilità di sviluppo di nuovi e più efficaci approcci terapeutici è strettamente correlata alla conoscenza dei meccanismi molecolari e biologici dell'induzione e della progressione tumorale.

### **1.5 Marcatori biologici e molecolari**

Le recenti scoperte di alterazioni molecolari associate con specifici sottotipi istologici di sarcoma hanno portato ad una classificazione genetica molto diversa dalla ripartizione convenzionale che raggruppava i sarcomi muscolo-scheletrici sulla base del sito d'insorgenza in sarcomi dell'osso e delle parti molli. Ad oggi i sarcomi sono suddivisi in due gruppi distinguibili a livello citogenetico. Un gruppo è caratterizzato da un cariotipo relativamente semplice, simile a quello diploide con piccoli riarrangiamenti cromosomici, mentre l'altro gruppo possiede un cariotipo complesso caratterizzato da gravi disturbi legati all'instabilità genomica (Helman LJ and Meltzer P *Nat Rev Cancer*, 2003). I sarcomi con ricorrenti mutazioni molecolari, tipicamente possiedono specifiche traslocazioni che frequentemente comportano l'espressione di fattori di trascrizione chimerici ad attività oncogenica come ad esempio EWS-FLI1 nel sarcoma di Ewing.

Nel sarcoma di Ewing, a scopo diagnostico oltre alle comuni colorazioni istologiche e alle reazioni istochimiche ed immunoistochimiche per diversi marcatori (Tabella 1), vengono oggi utilizzate tecniche complementari di



microscopia elettronica, citogenetica e biologia molecolare per individuare i due principali marcatori del sarcoma di Ewing, ovvero l'espressione della glicoproteina di membrana coinvolta nei fenomeni di adesione, p30/32MIC2 (nota anche come CD99) e la traslocazione cromosomica che porta alla formazione di una proteina chimerica, EWS/Ets, ottenuta dalla fusione della porzione N-terminale della proteina EWS con la porzione C-terminale di un fattore di trascrizione della famiglia Ets.

Nel 90-95% dei casi di sarcoma di Ewing è presente la traslocazione t(11;22)(q24;q12), che porta alla formazione del prodotto chimerico EWS-FLI1. Circa il 5-10% dei casi presenta la traslocazione (21;22)(q22;q12) che dà origine al trascritto EWS-ERG e molto più raramente sono presenti altre traslocazioni cromosomiche (Tabella 2).

MARCATORI IMMUNOISTOCHEMICA	
▪ VIM	+
▪ CD99	+
▪ Caveolina-1	+
▪ Fli1	+
▪ CAM 5.2	+/-
▪ S100	+/-
▪ LAC	-
▪ TdT	-

**Tabella 1.** Pannello dei marcatori utilizzati in immunohistochimica per la diagnosi di EFT

TRASLOCAZIONE	GENI COINVOLTI	FREQUENZA
t(11;22)(q24;q12)	<b>EWS-FLI1</b>	<b>90-95%</b>
t(21;22)(q22;q12)	<b>EWS-ERG</b>	<b>5-10%</b>
t(2;22)(q33;q12)	<b>EWS-FEV</b>	<b>Raro</b>
t(7;22)(q22;q12)	<b>EWS-ETV1</b>	<b>Raro</b>
t(17;22)(q12;q12)	<b>EWS-E1AF</b>	<b>Raro</b>
t(2;16)	<b>FUS-FEV</b>	<b>Raro</b>
t(21;16)	<b>FUS-ERG</b>	<b>Raro</b>

**Tabella 2.** Riarrangiamenti genici coinvolti in EFT

EWS è una proteina la cui funzione non è ancora stata chiarita. Sembra però essere coinvolta nella trascrizione in quanto è stata vista essere un fattore associato a subunità e prodotti della RNA-polimerasi.

Le proteine della famiglia Ets sono invece dei fattori trascrizionali con funzione di attivazione o repressione della trascrizione, regolati sulla base della specifica interazione col DNA e con altre proteine. Il dominio di legame al DNA è trattenuto nel prodotto chimerico EWS-Ets, conferendogli un'attività trascrizionale anomala.

La proteina chimerica più frequente EWS-FLI1, è in grado di trasformare efficientemente fibroblasti murini NIH3T. Inoltre, quando, il dominio N-terminale di EWS-FLI1 è fuso al dominio di legame al DNA di Gal4, il prodotto chimerico si comporta da attivatore trascrizionale in maniera più potente della corrispondente porzione N-terminale di FLI1. Potenzialmente quindi, il prodotto di fusione EWS-FLI1 è in grado di deregolare l'espressione dei geni controllati da FLI-1 o agire sull'espressione di geni normalmente non responsivi ad esso. Tra i bersagli specifici di EWS-FLI1 si hanno numerosi geni coinvolti nella regolazione della proliferazione e tumorigenicità, ad esempio E2-C, coinvolto nel controllo di una ciclina, la stromelisin, una metalloproteasi importante nei fenomeni di migrazione e invasione, e MYCC, un fattore trascrizionale coinvolto in proliferazione e apoptosi.

La traslocazione più comune è caratterizzata dal legame dell'esone 7 del gene EWS con l'esone 5 (nella fusione di tipo 2) o 6 (fusione di tipo 1) del gene FLI1; esistono almeno 12 tipi diversi di fusione EWS-FLI1 e almeno 4 fusioni diverse in EWS-ERG.

Le specifiche anomalie citogenetiche nel sarcoma di Ewing sono considerate come il marcatore genetico di questa neoplasia ed hanno un grandissimo valore diagnostico. Tale anomalia genetica viene oggi rilevata sia tramite ibridazione in situ su cellule in interfase (FISH) sia mediante la ricerca del riarrangiamento genico con PCR (Polymerase Chain Reaction) sia tramite la ricerca di mRNA del trascritto per le proteine chimeriche mediante RT-PCR (Retro-Transcriptase-PCR).

## 1.6 Origine

L'istogenesi del sarcoma di Ewing rimane ancora oggi uno degli aspetti più controversi nonostante i numerosi progressi compiuti nella definizione e caratterizzazione del tumore.

Molti studi presenti in letteratura hanno cercato di far luce sulla possibile origine di questo tumore studiando il prodotto di fusione EWS-FLI1, in diversi modelli cellulari.

Il primo studio usò come modello la linea cellulare di fibroblasti murini NIH3T. Queste cellule vengono trasformate facilmente da EWS-FLI1 e vennero considerate un sistema molto utile per studiare l'oncoproteina EWS-FLI1 e diversi geni da essa regolati (May WA et al. *Proc Natl Acad Sci*, 1993; May WA et al. *Mol Cell Biol*, 1993; Arvand A et al. *Oncogene*, 1998; Braun BS et al. *Mol Cell Biol*, 1995; Deneen B et al. *Mol Cell Biol*, 2003; May WA et al. *Nat Genet*, 1997; Thompson AD et al. *Oncogene*, 1996; Zwerner JP et al. *Oncogene*, 2001). Sfortunatamente, dati recenti hanno sollevato domande sull'utilità di queste cellule trasformate come possibile modello comparativo del sarcoma di Ewing. Ad esempio, il profilo di espressione genica delle NIH3T esprimenti EWS-FLI1 non è paragonabile al profilo globale dei campioni di sarcoma di Ewing derivati da pazienti (Braunreiter CL et al. *Cell Cycle*, 2006; Hancock JD and Lessnick SL *Cell cycle* 2008). Inoltre, geni chiave regolati da EWS-FLI1 e necessari per il fenotipo tumorigenico come NKX2.2 e NR0B1 non sono regolati da EWS-FLI1 nel modello murino (Gangwal K et al. *Proc Natl Acad Sci*, 2008; Owen LA and Lessnick SL *Cell Cycle*, 2006). Infine, geni che sono critici per la trasformazione oncogenica nel sistema NIH3T, come ad esempio PDGFC, non sembrano esserlo nel sarcoma di Ewing (Uren A et al. *Oncogene*, 2003; Zwerner JP et al. *Oncogene*, 2001).

Molti altri gruppi hanno quindi sviluppato sistemi nei quali EWS-FLI1 venisse espresso in diversi tipi cellulari umani, anziché murini. Questi modelli includono fibroblasti umani primitivi (hTERT), cellule mesenchimali staminali umane (MSCs), cellule umane di rhabdomyosarcoma e neuroblastoma (Hu-Lieskovan S et al. *Cancer Res*, 2005; Lessnick SL et al. *Cancer Cell*, 2002; Riggi N et al. *Cancer Res*, 2008; Rorie CJ et al. *Cancer Res*, 2004). In ogni modello analizzato, l'espressione genica, in presenza di EWS-FLI1, è molto simile a quella delle cellule di sarcoma di Ewing. Questa osservazione ha aumentato l'interessante possibilità che gli

effetti dell'espressione di EWS-FLI1 dipendano molto di più dal tipo di organismo (uomo *vs* topo) che non dallo specifico tipo cellulare interessato (tessuto normale *vs* tessuto patologico).

L'espressione di EWS-FLI1 in fibroblasti umani primitivi (hTERT) induce un arresto della crescita p53 dipendente (Lessnick SL et al. *Cancer Cell*, 2002) e questo aspetto suggerisce come EWS-FLI1 sia tossico quando espresso in un contesto cellulare inappropriato. Mutazioni di p53, o di altre componenti della pathway di p53, possono consentire l'espressione stabile di EWS-FLI1 in queste cellule, nonché la loro crescita e sopravvivenza. Sebbene mutazioni di p53 siano presenti solo nel 10-15% dei casi di sarcoma di Ewing, altre alterazioni del pathway di p53 (perdita di p14<sup>ARF</sup>/p16<sup>CDKN2A</sup> o amplificazioni di MDM2) possono essere presenti in diversi casi di Ewing (Huang HY et al. *J Clin Oncol*, 2005; Kovar H et al. *Oncogene*, 1993; Ladanyi M et al. *J Pathol*, 1995).

Un'altra importante lezione proviene dagli studi compiuti su cellule di rhabdomyosarcoma e neuroblastoma. In questi due modelli sperimentali, l'espressione dell'oncoproteina di fusione causa cambiamenti delle caratteristiche differenziative delle cellule. Le cellule di rhabdomyosarcoma indotte ad esprimere EWS-FLI1 adottano una morfologia simile a quella del sarcoma di Ewing e mostrano una *up*-regolazione dei geni tipicamente espressi nel sarcoma di Ewing (come il gene dei microtubuli neurone-specifico MAPT, il *marker* parasimpatico colecistochinina e il marker epiteliale cheratina-18); mentre mostrano un'inibizione del differenziamento muscolare (Hu-Lieskovan S et al. *Cancer Res*, 2005).

Anche nel caso di cellule di neuroblastoma, l'espressione di EWS-FLI1 promuove l'inibizione di marker specifici per il neuroblastoma e a un induzione di marker Ewing-specifici (Rorie CJ et al. *Cancer Res*, 2004).

Studi recenti hanno mostrato come in cellule mesenchimali staminali umane (MSCs), EWS-FLI1 induca l'espressione di geni presenti in cellule embrionali staminali quali OCT4, SOX2 e NANOG (Riggi N et al. *Genes Dev*, 2010). Questi dati suggeriscono che EWS-FLI1 può contribuire allo stato indifferenziato riscontrabile nel sarcoma di Ewing, *up*-regolando questi geni coinvolti nel determinare la staminalità delle cellule.

Per quanto concerne gli studi effettuati su cellule mesenchimali staminali umane (MSCs) si è evidenziata una permissività intrinseca di queste cellule, al potenziale oncogenico di EWS-FLI1. Inoltre, la migrazione delle MSCs in tutti i distretti del corpo durante lo sviluppo embrionale potrebbe

fornire una spiegazione riguardo i vari siti d'insorgenza del sarcoma di Ewing. L'osservata induzione di geni implicati nel differenziamento neurale e nel differenziamento della cresta neurale indicano che EWS-FLI1 può parzialmente dirigere il differenziamento neuroectodermico di cellule mesenchimali staminali, suggerendo inoltre che il sarcoma di Ewing non debba necessariamente originare da un precursore neuroectodermico per spiegare il suo fenotipo.

Inoltre, un lavoro di Ogawa e collaboratori, ha messo in luce come cellule staminali emopoietiche possano generare MSCs e questa potrebbe essere una potenziale spiegazione riguardo la similarità tra le cellule di sarcoma di Ewing e le cellule endoteliali (Ogawa M et al. *Blood*, 2006).

Due lavori seguenti hanno inoltre mostrato che una significativa porzione di MSCs può originare dal neuroepitelio e da cellule staminali della cresta neurale (NCSCs) *in vitro* e *in vivo* (Takashima Y. et al. *Cell*, 2007; Lee G et al. *Nat. Biotechnol*, 2007).

Queste informazioni, analizzate nel complesso, suggeriscono come il sarcoma di Ewing possa derivare da una cellula mesenchimale staminale di origine emopoietica o neuroectodermica, capace di mantenere una doppia plasticità e quindi in grado di spiegare la dualità fenotipica di questo tumore.

## 2. LA MOLECOLA CD99

### 2.1 Il gene MIC2 e la proteina CD99

La glicoproteina di membrana CD99 fu descritta per la prima volta nel 1979 come un antigene altamente espresso sulle cellule di leucemia linfoblastica acuta, riconosciuto dall'anticorpo monoclonale 12E7 (Levy R et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979).

Noto anche con il nome di E2, è trascritto dal gene MIC2, presente nella regione pseudo-autosomica di entrambi i cromosomi sessuali, X (Xp22.33-Xpter) e Y (Yp11-Ypter).

Il gene che si estende per 50 kb, è orientato verso il centromero e i 10 esoni che lo costituiscono risultano considerevolmente più piccoli rispetto alla media per i geni di mammifero. L'analisi della sequenza genica non colloca MIC2 in nessuna delle famiglie di geni noti anche se, mediante l'analisi di sequenza del cDNA e studi comparativi, sono stati individuati nella stessa regione pseudoautosomica due geni ad esso correlati: il gene funzionale PBDX, codificante per l'antigene Xg<sup>a</sup>, che presenta un'omologia amminoacidica del 48% con il CD99 (Ellis NA et al. *Nat. Genet*, 1994), e lo pseudogene MIC2R (Smith MJ and Goodfellow PN *Hum Mol Genet*, 1994).

Il gene MIC2 codifica per due isoforme proteiche, come risultato di splicing alternativo del trascritto primario, comunemente denominate CD99 tipo I o wild-type (wt) e CD99 tipo II. Studi comparativi di sequenza hanno rivelato che il cDNA del CD99 tipo II presenta un inserto di 18 bp tra l'esone 8 e l'esone 9 rispetto al CD99 tipo I. A dispetto delle sue maggiori dimensioni però, codifica per una forma troncata della proteina in quanto l'inserto di 18 bp, localizzato a livello proteico nella porzione citoplasmatica, introduce un codone di stop in-frame dando origine a una proteina di 160 residui amminoacidici invece di 185.

Studi biochimici hanno dimostrato come il CD99 subisca modifiche post-traduzionali, infatti il peso molecolare della proteina si riduce da 32 kDa iniziali, a 28 kDa e 18 kDa dopo processi di sialilazione e O-glicosilazione (Aubrit F et al. *Eur J Immunol*, 1989).

Analisi di sequenza del cDNA suggeriscono che la struttura del CD99 sia formata da un dominio extracellulare O-glicosilato di 100 amminoacidi

all'N-terminale, un putativo dominio transmembrana idrofobico di 25 residui e un'estremità C-terminale citosolica di 38 amminoacidi, supportando così l'immunolocalizzazione della proteina sulle membrane cellulari (Banting GS et al. *Mol Immunol*, 1989; Gelin C et al. *EMBO J*, 1989; Goodfellow PJ et al. *Science*, 1986).

Infine, studi di spettroscopia NMR multi-dimensionale hanno mostrato che la porzione citoplasmatica del CD99 possiede una struttura a forcina ancorata alla membrana con due loop flessibili; facendo sembrare quindi la proteina non fornita di alcun regolare elemento di struttura secondaria (Kim HY et al. *Mol Cells*, 2004).

## **2.2 Espressione del CD99 in tessuti normali e tumorali**

In cellule normali, studi immunocistochimici hanno evidenziato una distribuzione ubiquitaria dell'antigene CD99, in particolare, un elevato livello di espressione è stato riscontrato nelle cellule ependimali del cervello e del midollo spinale, nelle insule pancreatiche, nelle cellule del Sertoli e del Leyding del testicolo, nelle cellule della granulosa dell'ovaio e nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni (Ambros IM et al. *Cancer (Phila.)*, 1991). Il significato funzionale dell'espressione della molecola CD99 in queste cellule è pressochè sconosciuto, mentre si hanno maggiori conoscenze riguardo alla sua espressione nel sistema emopoietico.

L'antigene CD99 viene espresso in modo eterogeneo in funzione del tipo e del grado differenziativo della cellula (Dworzak MN et al. *Blood*, 1994; Choi EY et al. *J Immunol*, 1998; Bernard G et al. *J Immunol*, 1995). In particolare, cellule progenitrici del tessuto emopoietico CD34+ nel midollo presentano alti livelli di espressione dell'antigene CD99, che tendono a ridursi in modo progressivo con l'aumentare del grado di differenziamento e di maturazione verso la linea granulocitaria e linfocitaria di tipo B.

La modulazione dell'espressione del CD99 nei linfociti T appare un po' più complessa. E' riscontrabile un'abbondante presenza di CD99 in timociti immaturi, che decresce con il progredire dei processi differenziativi; e una eterogenea espressione anche in alcune sottopopolazioni di cellule T mature (Dworzak MN et al. *Blood*, 1994; Gelin C et al. *Eur J Immunol*, 1991). Infine, nel *lineage* differenziativo eritroide, l'espressione del CD99 è mantenuta nei globuli rossi ed esibisce un polimorfismo quantitativo co-

regolato con l'antigene ematico Xga, co-espressione presumibilmente controllata a livello trascrizionale (Ellis NA et al. *Nat Genet*, 1994; Goodfellow P et al. *Nature*, 1983; Goodfellow PJ et al. *Ann Hum Genet*, 1987).

Oltre al tessuto normale, l'espressione del CD99 è stata evidenziata in numerosi tipi cellulari tumorali. Un'alta espressione è stata riscontrata in alcune neoplasie pediatriche, quali la leucemia linfoblastica acuta (Levy R et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979) ed il rhabdomyosarcoma embrionale (Ambros IM et al. *Cancer (Phila.)*, 1991; Ramani P et al. *Histopathology*, 1993; Kovar H et al. *Oncogene*, 1990), nel sarcoma sinoviale (Fisher C *Ann Diagn Pathol*, 1998) e condrosarcoma mesenchimale (Granter SR et al. *Hum Pathol*, 1996; Brown RE et al. *Ann Clin Lab Sci*, 2003), nei tumori ependimali (Mahfouz S et al. *Medscape J Med*, 2008) e più recentemente è risultato altamente espresso in alcune forme di carcinoma gastrico (Jung KC et al. *J Korean Med Sci* 2002). Tuttavia, sono il sarcoma di Ewing e i tumori neuroectodermici primitivi ad esprimere i più alti livelli di CD99. L'espressione di questo antigene viene infatti utilizzata, insieme all'evidenza delle specifiche traslocazioni, come marker diagnostico per queste neoplasie (Ambros IM et al. *Cancer (Phila.)*, 1991; Kovar H et al. *Oncogene*, 1990).

Per l'isoforma di tipo II del CD99 ci sono minori informazioni a riguardo. È stato dimostrato che l'isoforma di tipo I, valutata mediante RT-PCR, su un pannello ristretto di tessuti normali e tumorali, viene espressa in maniera predominante rispetto alla forma di tipo II (Hahn MJ et al. *FEBS Lett*, 2000). Hahn e collaboratori, ipotizzano che l'espressione dell'isoforma tipo II venga regolata durante specifici stadi di differenziazione, in certe condizioni fisiologiche o in specifici distretti cellulari. A supporto di questa ipotesi infatti, i livelli di espressione proteica del CD99 decrementano quando i timociti immaturi si differenziano in cellule T mature e tale diminuzione è attribuibile ad una ridotta espressione dell'isoforma di tipo II (Alberti I et al. *FASEB J*, 2002).

Anche in cellule di sarcoma di Ewing indotte a differenziarsi in senso neurale, similmente a quanto accade nei timociti, si assiste a una riduzione del CD99 di tipo II, mentre quella di tipo I rimane invariata. L'isoforma tronca potrebbe quindi agire come regolatore negativo del differenziamento neurale, azione che si potrebbe spiegare durante lo sviluppo del sistema nervoso (Lee EJ et al. *Exp Mol Med*, 2003).



### 2.3 Ruolo funzionale del CD99

Le funzionalità fisiologiche della proteina CD99 sono tuttora scarsamente descritte in letteratura, soprattutto perché non è stato individuato il ligando dell'antigene e definita in modo esauriente la struttura della proteina. Inoltre, la comprensione del ruolo funzionale è resa ancora più complessa dall'espressione delle due differenti isoforme.

Numerosi studi condotti nell'ambito del sistema emopoietico attraverso l'utilizzo di anticorpi monoclonali (Mab) agonisti anti-CD99 hanno contribuito a chiarire alcune funzioni del CD99. In particolare, la stimolazione del CD99 con specifici MAb determina aggregazione omotipica e apoptosi solo su corticotimociti positivi per entrambe CD4+ e CD8+, suggerendo un suo coinvolgimento nel differenziamento verso linfociti maturi (Bernard G et al. *J Immunol*, 1995; Bernard G et al. *J Immunol*, 1997). L'antigene CD99, sembra avere un ruolo anche nelle cellule del tessuto emopoietico periferico inducendo il differenziamento di cellule T-helper e la proliferazione di linfociti CD4+ ancora immaturi (Wingett D et al. *Cell Immunol*, 1999). In aggiunta, la stimolazione del CD99 sulle cellule T attivate e della memoria favorisce l'adesione mettendo in rilievo una sua azione nel processo della extravasazione (Bernard G et al. *Eur J Immunol*, 2000). Alcuni lavori riportano l'espressione del CD99 anche sull'endotelio in corrispondenza dei contatti intercellulari a livello dei quali il CD99 sembrerebbe essenziale per la tras migrazione dei monociti (Schenkel AR et al. *Nat Immunol*, 2002).

Con l'obiettivo di analizzare la rilevanza fisiologica della glicoproteina anche *in vivo*, alcuni studiosi sono andati alla ricerca di un omologo murino. Le indagini hanno portato all'identificazione e al clonaggio di un gene codificante per una proteina che condivide caratteristiche strutturali e funzionali con l'antigene umano, dimostrato il ruolo di CD99 nella migrazione transendoteliale di linfociti T murini con l'utilizzo di MAb anti-CD99 (Bixel G et al. *Blood*, 2004).

Se le conoscenze circa il ruolo fisiologico della glicoproteina CD99 sono scarse e talvolta contrastanti, quelle relative alla sua funzione in ambito patologico risultano ancora più oscure.

Nelle cellule di sarcoma di Ewing, come per i corticotimociti, la stimolazione del CD99 con MAb induce due processi: una massiva apoptosi, che produce una elevata mortalità cellulare, e aggregazione

omotipica (Sohn HW et al. *Am J Pathol*, 1998; Scotlandi K et al. *Cancer Res*, 2000; Cerisano V et al. *Oncogene*, 2004), fenomeno degno di nota, dato che *in vivo* potrebbe ridurre la capacità migratoria delle cellule tumorali e inibire quindi le prime fasi del processo metastatico. In un recente lavoro è stata gettata nuova luce sul ruolo del CD99 nel sarcoma di Ewing (Rocchi A et al. *J Clin Inves*, 2010). La proteina CD99 sembra essere richiesta per il fenotipo oncogenico di questa neoplasia, infatti il suo silenziamento in linee cellulari porta a una riduzione della capacità tumorigenica e metastatica in topi nudi e in saggi *in vitro*; questo fenotipo è accompagnato dall'induzione del differenziamento neurale con un'aumentata crescita di prolungamenti *neurite-like* e l'espressione di marcatori neurali terminali come il neurofilamento pesante (H-NF) e la  $\beta$ III-tubulina. Emerge dunque un ruolo del CD99 nella modulazione del differenziamento e malignità cellulare.

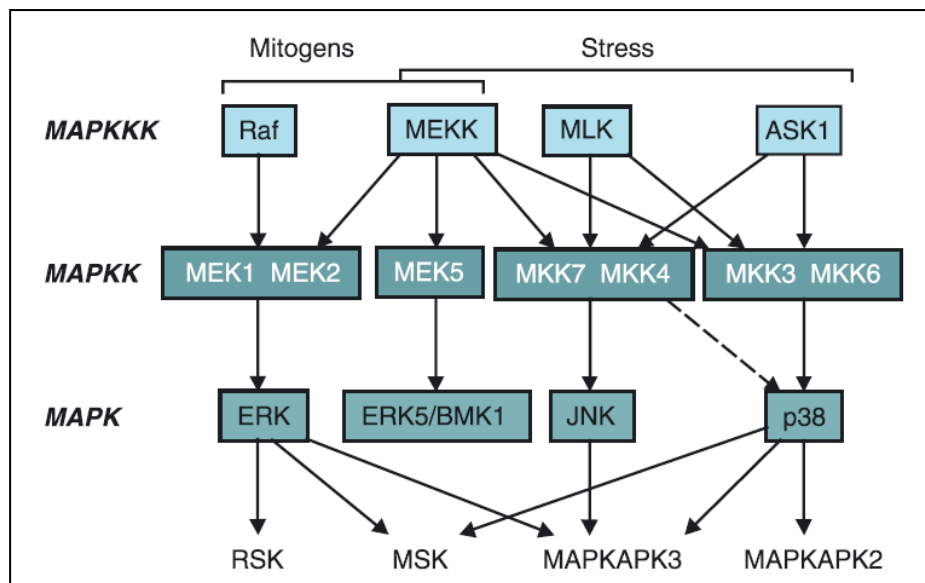
In questo lavoro, Rocchi e collaboratori hanno inoltre evidenziato un'alterazione del pathway di MAPK in assenza della proteina CD99; dato interessante visti i diversi lavori che descrivono il ruolo di MAPK anche nei processi di sviluppo e differenziamento neurale (Crespo P and Leon J *Cell Mol Life Sci*, 2000; Yang H et al. *Biol Chem*, 2008; Sweatt JD *Curr Opin Neurobiol*, 2004; Subramaniam S and Unsicker K *Neuroscience*, 2006; Grewal SS et al. *Curr Opin Neurobiol*, 1999).

### 3. MAPK e differenziamento neurale

Nelle cellule di mammifero sono presenti quattro maggiori vie di segnalazione di MAPK: ERK (extracellular signal regulated kinase), JNK (c-Jun-N terminal kinase), p38 e ERK5 (extracellular signal regulated kinase-5). Queste vie sono composte da vari prodotti genici e isoforme generate da splicing alternativo dei pre-mRNA.

ERK è solitamente attivato da stimoli mitogenici come fattori di crescita e ormoni, JNK e p38 sono prevalentemente attivati da stress (Lewis TS et al. *Adv Cancer Res*, 1998; Kyriakis JM and Avruch J *Physiol Rev*, 2001), mentre ERK5 è attivato da entrambi gli stimoli (Kyriakis JM and Avruch J *Physiol Rev*, 2001).

Le proteine MAPKs fanno parte di vie di segnalazione che dispongono di una cascata chinasi tripla. Le MAPKs sono attivate dalla fosforilazione su Thr/Tyr da MAPKK, che a sua volta viene fosforilata in Ser/Thr da MAPKKK in risposta a stimoli mitogenici o stress (Figura 2).



**Figura 2:** Organizzazione delle vie di segnale di MAPK (Modificato da Yang SH *Gene*, 2003)

A monte del signaling di ERK, ritroviamo la proteina Raf, descritta in letteratura come primo effettore di Ras.

Le proteine Ras comprendono un gruppo di molecole di 20-25kDa che ricoprono un ruolo cruciale nei processi che regolano la crescita cellulare e il differenziamento. Nei mammiferi, la superfamiglia di GTPasi Ras contiene oltre 65 membri, che sulla base delle loro funzioni e strutture,

sono stati suddivisi in sei famiglie rappresentate da Ras, Rho, Rab, Ran, Rad, e Arf (Barbacid M *Annu Rev Biochem* 1987).

Nei mammiferi, sono presenti tre geni ras, H-ras, K-ras e N-ras che sono espressi in tutti i tessuti e tipi cellulari, sebbene il pattern di espressione sia eterogeneo tra gli organi e nei diversi stadi dello sviluppo.

Stimoli extracellulari di diversa natura, mediati da diversi recettori di superficie convergono su Ras, che viene attivato transitoriamente dopo la ricezione di questi stimoli (Feig LA *Science*, 1993). Una volta attivato, Ras trasduce a valle i suoi segnali attraverso l'associazione di intermediari di segnalazione che interagiscono con Ras-GTP (Campbell SL et al. *Oncogene*, 1998).

Il primo effettore di Ras individuato fu Raf-1. Raf si lega a Ras in modo GTP-dipendente sia *in vitro* che *in vivo* (Moodie SA et al. *Science*, 1993; Warne PH et al. *Nature* 1993; Vojtek AB et al. *Cell*, 1993; Zhang X et al. *Nature*, 1993). Questa associazione comporta il reclutamento di Raf sulla membrana, dove viene attivato da meccanismi ancora poco conosciuti (Leevers SJ et al. *Nature*, 1994). Una volta attivato, Raf stimola attraverso la fosforilazione, MEK (Kyriakis JM et al. *Nature*, 1992), che a sua volta è in grado di attivare ERK1 e ERK2 (Gomez N and Cohen P *Nature*, 1991; Kosako H et al. *EMBO J*, 1992; Nakielny S et al. *EMBO J*, 1992). Le proteine ERKs possono poi agire su un ampio spettro di proteine target, in diverse localizzazioni cellulari, come le proteine citoplasmatiche SOS, MEK, Rsk, PHAS-1 o PLA2, e proteine nucleari, che vengono fosforilate dopo traslocazione nucleare di ERK, come i fattori di trascrizione Elk-1, Ets-2, C/EBP e SMAD (Whitmarsh AJ and Davis RJ *J Mol Med*, 1996; Treisman R *Curr Opin Cell Biol*, 1996; Robinson MJ and Cobb MH *Curr Opin Cell Biol*, 1997).

Nonostante l'enorme quantità di informazioni circa l'attività di Ras nella trasduzione del segnale, la sua funzione biologica nello sviluppo e nel differenziamento rimane in gran parte oscura.

La prima indicazione che Ras potesse promuovere il differenziamento cellulare è stata ottenuta nella linea neuronale PC12, derivante da un feocromocitoma di ratto. Introducendo in queste cellule le forme oncogeniche attivate di H-ras (Bar-Sagi D and Feramisco JR *Cell*, 1985; Noda M et al. *Nature*, 1985), K-ras (Noda M et al. *Nature*, 1985) e N-ras (Guerrero I et al. *J Cell Physiol*, 1986) si assiste a un'induzione del

differenziamento neurale accompagnato da arresto della crescita e formazione di neuriti.

Un altro lavoro ha poi mostrato che anche la sovraespressione di Ras *wild-type* induce differenziamento nella linea anche PC12 (Sato T et al. *Mol Cell Biol*, 1987). PC12 può essere facilmente indotta a differenziare attraverso l'utilizzo del fattore di crescita nervoso (NGF) e la differenziazione indotta da NGF è stata associata a una prolungata attività di Ras (Qui MS and Green S H *Neuron*, 1992; Nakafuku M and Kaziro Y *FEBS Lett*, 1993). Altri lavori inoltre, includono in questo signaling anche Raf (Wood KW et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993) e MAPK (Cowley S et al. *Cell*, 1994) e identificano in Raf l'effettore del differenziamento neurale mediato da Ras (Goi T et al. *Mol Cell Biol*, 1999).

Numerosi fattori di trascrizione e proteine co-regolatorie sono state identificate come target dei differenti meccanismi di trasduzione del segnale di MAPK. Un'efficiente trasduzione del segnale attraverso MAPK, richiede che i componenti della cascata colocalizzino all'interno della cellula e questo può accadere attraverso la diretta associazione dei componenti o attraverso il legame con proteine scaffold (Whitmarsh AJ and Davis RJ *Trends Biochem Sci*, 1998).

Il pathway di MAPK, attraverso la fosforilazione, può regolare l'attività di moltissimi fattori trascrizionali attraverso diversi meccanismi: (i) localizzazione intracellulare, (ii) livelli proteici, (iii) legame con il DNA, e (iv) interazioni con altre proteine regolatorie.

- (i) Molti fattori di trascrizione risiedono permanentemente nel nucleo, ma altri traslocano tra il citoplasma e il nucleo. Il signaling di MAPK può stimolare la traslocazione di fattori di trascrizione nel nucleo e promuoverne l'attività o contrariamente, stimolarne l'esportazione dal nucleo e indurne l'inattività. Il trasporto nucleo-citoplasmatico delle proteine è un processo attivo nel quale il macchinario di importazione/esportazione nucleare riconosce il segnale di localizzazione nucleare (NLS) e il segnale di esportazione (NES) presenti all'interno dei fattori di trascrizione (Hood JK and Silver PA *Curr Opin Cell Biol*, 1999). La fosforilazione o defosforilazione dei fattori di trascrizione può regolare direttamente l'accessibilità di

questi segnali NLS e NES mascherando o smascherando queste sequenze.

- (ii) Un secondo importante meccanismo è il controllo della quantità del fattore trascrizionale. Il pathway di MAPK può regolare infatti l'espressione proteica di molti fattori di trascrizione, tra cui i più studiati sono i membri della famiglia AP-1 (c-Jun e c-Fos) (Whitmarsh AJ and Davis RJ *J Mol Med*, 1996).
- (iii) MAPK può inoltre regolare il legame tra i fattori di trascrizione e i promotori, sia positivamente, sia negativamente attraverso la fosforilazione. La fosforilazione può essere diretta sul dominio di legame del DNA (Kasibhatla S et al. *Mol Cell Biol*, 1999; Stefanovsky VY et al. *Mol Cell*, 2001) o indiretta attraverso meccanismi allosterici (Yang SH et al. *EMBO*, 1999b).
- (iv) Molti fattori di trascrizione contengono domini con attività trascrizionale (TADs) fosforilazione-dipendenti e in alcuni casi, domini di repressione trascrizionale fosforilazione-dipendenti. Il preciso meccanismo attraverso cui la fosforilazione di questi domini moduli l'attività trascrizionale però è ancora scarsamente conosciuto. Sembra che la fosforilazione moduli altre attività intrinseche dei fattori trascrizionali come ad esempio l'affinità per co-attivatori e co-repressori. Questo processo si può compiere direttamente tramite il blocco dei legami da parte dei residui fosforilati o indirettamente attraverso i cambiamenti conformazionali indotti dalla fosforilazione. Un esempio di questo meccanismo è fornito dal fattore trascrizionale CREB e dai suoi co-attivatori CBP e p300. CREB è fosforilato sulla Ser133 da diverse proteine chinasi che ne aumentano l'attività trascrizionale. Tra queste chinasi ritroviamo MSK1 e MSK2, che sono a valle dei pathway di ERK e p38 (Deak M et al. *EMBO J*, 1998; Wiggin GR et al. *Mol Cell Biol*, 2002). CREB fosforilato recluta CBP e p300 che ne aumentano l'attività trascrizionale (Mayr B and Montminy M *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001).

Nel decennio successivo all'identificazione iniziale di Elk-1, come primo fattore trascrizionale target del pathway di MAPK, (Gille H et al. *Nature* 1992; Marais R et al. *Cell*, 1993; Janknecht R et al. *EMBO J* 1993; Hazzalin CA and Mahadevan LC *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002) sono stati identificati sempre più fattori di trascrizione come bersagli di MAPK, ad

esempio: CREB (Hazzalin CA and Mahadevan LC *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002; Tan Y et al. *EMBO J*, 1996), SMAD1, SMAD2 (Funaba M et al. *J Biol Chem*, 2002), E2F1 (Wang S et al. *EMBO J*, 1999), AP-1 (Whitmarsh AJ and Davis RJ *J Mol Med*, 1996) e la subunità p65 di NF- $\kappa$ B (Vermeulen L et al. *EMBO J*, 2003).

## 4. NF- $\kappa$ B

Nuclear factor (NF)- $\kappa$ B è un fattore trascrizionale che può sia indurre, sia reprimere l'espressione genica legando sequenze di DNA, note come elementi  $\kappa$ B, in promotori ed enhancer (Hayden MS and Ghosh S *Genes Dev*, 2004).

Nelle cellule di mammifero sono presenti cinque membri della famiglia NF- $\kappa$ B: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105(NF- $\kappa$ B1) e p52/p100 (NF- $\kappa$ B2), che possono complessarsi e formare omo- eterodimeri.

Nella maggior parte delle cellule, i complessi NF- $\kappa$ B sono sequestrati nel citoplasma da proteine inibitorie chiamate I $\kappa$ Bs. L'attivazione di NF- $\kappa$ B comporta tipicamente la fosforilazione di I $\kappa$ B tramite il complesso I $\kappa$ B chinasi (IKK) con la conseguente degradazione di I $\kappa$ B e la traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B.

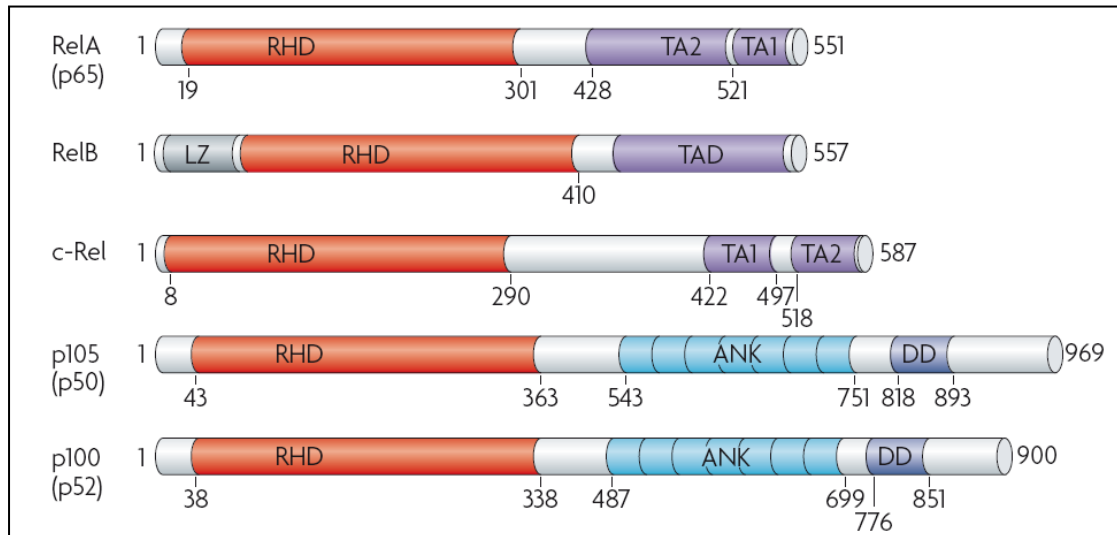
I geni regolati da NF- $\kappa$ B includono geni coinvolti nella morte cellulare programmata, adesione cellulare, proliferazione, risposta immunitaria innata e indotta, infiammazione, risposta a stress cellulari, rimodellamento cellulare e differenziamento. (Hayden MS and Ghosh S *Genes Dev*, 2004; Bonizzi G. and Karin M *Trends Immunol*, 2004; Gerondakis S et al. *Oncogene*, 1999; Pasparakis M et al. *Cell Death Differ*, 2006; Pahl H *Oncogene*, 1999).

Tuttavia, l'espressione di questi geni è strettamente coordinata con l'attività di molti altri signalling e pathway; pertanto, il risultato dell'attivazione di NF- $\kappa$ B dipende dal contesto cellulare.

### 4.1 I complessi NF- $\kappa$ B

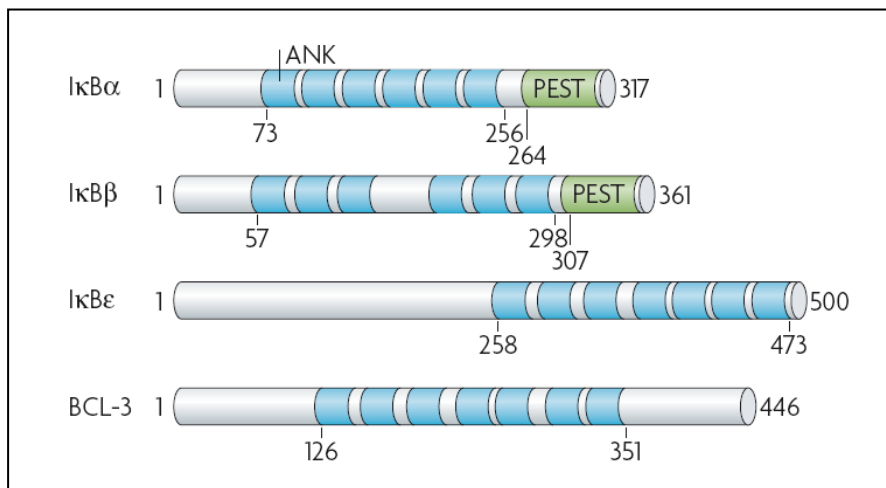
Tutti i membri della famiglia NF- $\kappa$ B contengono un dominio N-terminale di circa 300 aminoacidi chiamato RHD (Rel-homology domain), che media il legame con il DNA e la dimerizzazione e contiene il dominio di localizzazione nucleare. Inoltre, i membri della sottofamiglia Rel quali: RelA, RelB e c-Rel contengono domini con attività trascrizionale (TADs) (Figura 3). Nella maggior parte delle cellule di mammifero, in assenza di stimoli e in condizioni non patologiche, le subunità Rel si ritrovano soprattutto nel citoplasma legate ai membri inibitori della famiglia I $\kappa$ B (Figura 4).





**Figura 3:** Membri della famiglia NF-κB nei mammiferi. (Modificato da Perkins ND *Nature Reviews*, 2007)

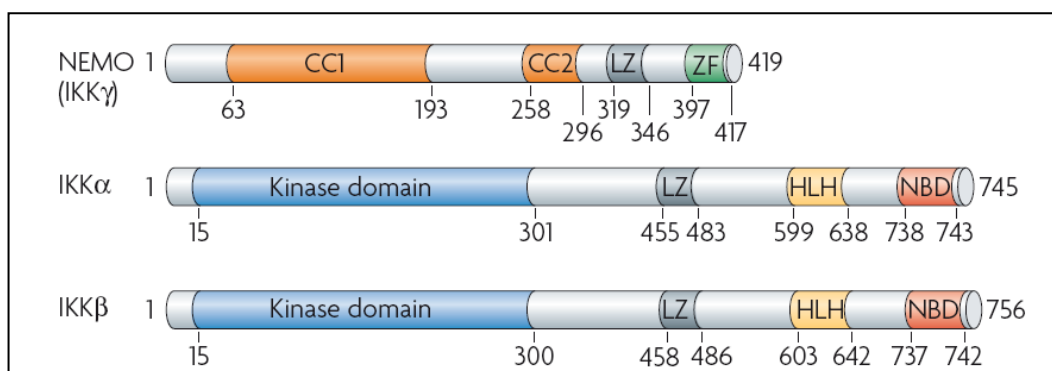
Nei mammiferi esistono tre principali tipi di IκB, IκBα, IκBβ e IκBε, la cui funzione è quella di mascherare la sequenza di localizzazione nucleare (NLS) presente nel dominio RHD delle subunità di NF-κB. Per IκBα, il mascheramento della sequenza di localizzazione nucleare è solo parziale e complessi NF-κB-IκBα possono traslocare nel nucleo anche in assenza di stimoli. Tuttavia, IκBα contiene una sequenza di esportazione nucleare (NES) che causa la rapida traslocazione di questi complessi nel citoplasma.



**Figura 4:** Membri della famiglia IκB, inibitori di NF-κB (Modificato da Perkins ND *Nature Reviews*, 2007)

Entrambe le subunità p50 e p52 sono sintetizzate da precursori proteici più lunghi, rispettivamente p105 e p100, che contengono al loro C-terminale motivi ripetuti ANK simili a quelli trovati nelle proteine IκB. p100 e p105 inoltre funzionano come gli inibitori IκB e trattengono le altre subunità dei complessi dimerici NF-κB nel citoplasma, inibendo la loro attività. Il processamento di p100 e p105 avviene attraverso diversi meccanismi e permette a p50 e p52 di funzionare come fattori di trascrizione nucleari. Entrambi gli omodimeri di p50 e p52 possono poi interagire con un altro membro della famiglia IκB, BCL-3, che a differenza delle altre IκB, è nucleare e funziona come co-attivatore trascrizionale (Hayden MS and Ghosh S *Genes Dev*, 2004).

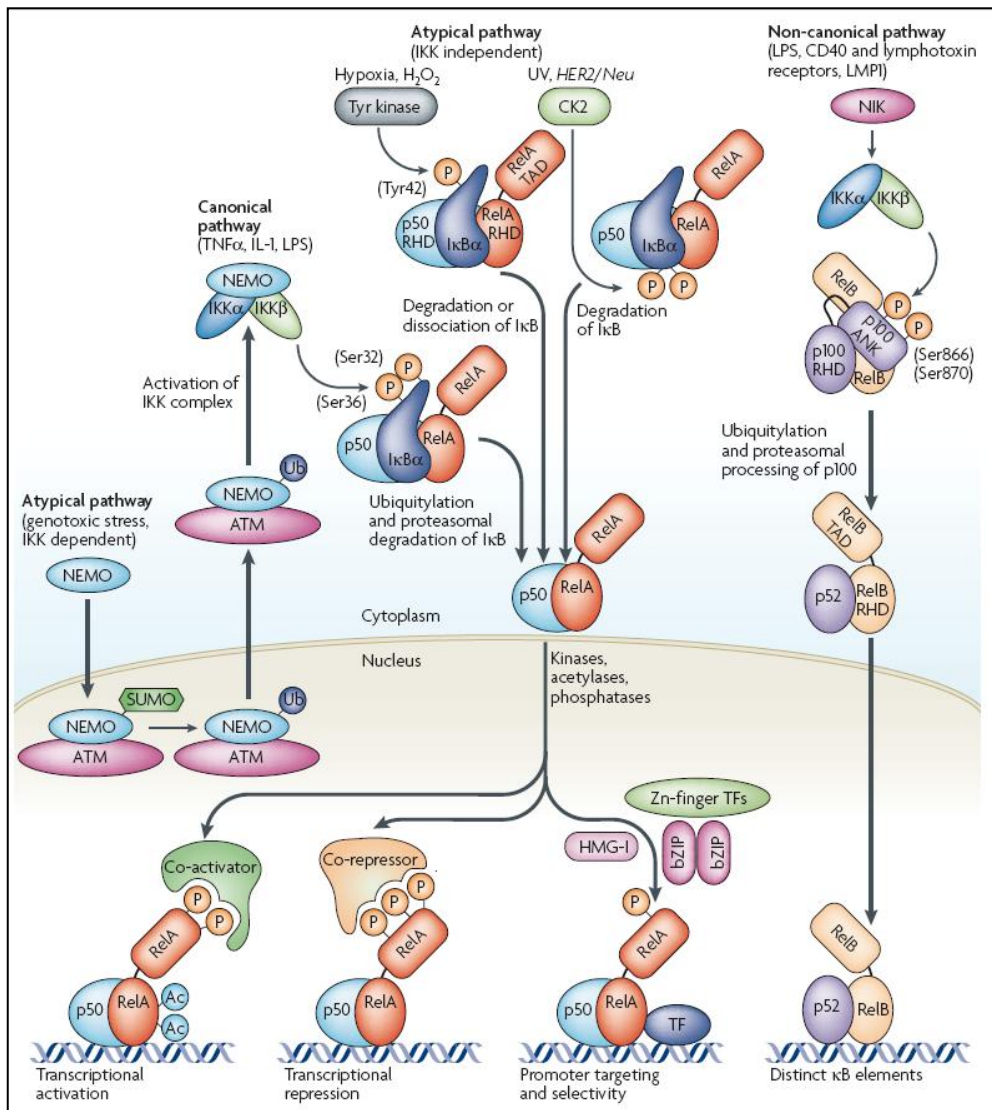
Esistono diversi pathway di attivazione di NF-κB (Figura 6) e il più frequentemente osservato è il pathway classico o canonico che è indotto in risposta a vari stimoli infiammatori, tra cui le citochine pro-infiammatorie TNFα (tumor necrosis factor-α) e IL-1 (interleuchina-1), il reclutamento di TCR (T-cell receptor) o l'esposizione a prodotti batterici come i liposaccaridi (LPS). Questo pathway è caratterizzato dalla rapida fosforilazione di IκBα sulla Ser32 e Ser36, conseguente ubiquitinazione e degradazione dal proteasoma 26S. In molti tipi cellulari, anche IκBβ e IκBε sono fosforilate e degradate, ma con una cinetica più lenta (Hayden MS and Ghosh S *Genes Dev*, 2004; Perkins ND *Oncogene*, 2006). Nel pathway canonico, la fosforilazione di IκB è mediata dall'attivazione del complesso IKK. Il complesso IKK è formato da tre subunità principali, le subunità catalitiche IKKα e IKKβ (chiamate anche IKK1 e IKK2) e diverse copie di una subunità regolatoria chiamata NEMO o IKKγ (NF-κB essential modifier) (Figura 5).



**Figura 5:** Membri del complesso IKK (Modificato da Perkins ND *Nature Reviews*, 2007)

Esperimenti genetici hanno mostrato che IKK $\beta$  è la chinasi predominante nel pathway canonico (Bonizzi G and Karin M *Trends Immunol*, 2004; Pasparakis M et al. *Cell Death Differ*, 2006).

Un sottoinsieme di stimoli induttori di NF-kB, come la stimolazione dei recettori CD40 e linfotossici- $\beta$ , liposaccaridi batterici e proteine virali attivano la pathway non canonica. In questo caso, l'attivazione di IKK $\alpha$  da parte di NIK (NF-kB inducing kinase) porta alla fosforilazione e degradazione da parte del proteasoma 26S di p100 e alla conseguente formazione di p52. Gli etero dimeri p52-RelB, che sono maggiormente attivati nel pathway non canonico, hanno un'alta affinità per precisi elementi kB e possono regolare un distinto sottogruppo di geni target.



**Figura 6:** Pathways che determinano l'attivazione di NF-kB (Modificato da Perkins ND *Nature Reviews*, 2007)

## 4.2 Modulazione delle subunità NF-kB

Le subunità di NF-kB sono oggetto di molte modificazioni e interazioni regolatorie che definiscono la loro attività trascrizionale e la loro specificità per i geni target. Queste interazioni costituiscono un'interfaccia cruciale con altri pathway nella cellula; modificazioni delle subunità di NF-kB attraverso strade indipendenti da IKK, possono determinare la loro abilità di interagire con co-attivatori o co-repressori, mentre il legame con fattori di trascrizione può determinare la loro abilità di legarsi specificamente a promotori o enhancer. Questi meccanismi di regolazione spiegano gli effetti specifici di NF-kB su diversi tipi cellulari o conseguenti a diversi stimoli, come ad esempio la capacità di inibire o favorire l'apoptosi (Perkins ND and Gilmore TD *Cell Death Differ*, 2006; Perkins ND *Oncogene*, 2006; Kucharczak J et al. *Oncogene*, 2003). Queste pathway inoltre forniscono un'importante via attraverso cui oncogeni e oncosoppressori possono modulare l'attività di NF-kB.

La reale portata delle modificazioni delle subunità di NF-kB è attualmente sconosciuta, e solo la subunità RelA è stata studiata abbondantemente nel dettaglio. RelA è fosforilata sulla Ser276 dalla subunità catalitica della proteina chinasi A (PKAc), MSK1 e MSK2 (MAPKs pathway); sulla Ser311 dalla PKC $\zeta$ , sulla Ser468 da IKK $\beta$ , IKK $\epsilon$  e GSK3 $\beta$ ; sulla Ser529 dalla CK2; e sulla Ser536 da IKK $\beta$ , IKK $\alpha$ , IKK $\epsilon$ , NAK (NF-kB activating kinase) e p90S6K (Perkins ND *Oncogene*, 2006). Queste possono essere generalmente descritte come modificazioni stimolatorie che aumentano l'attività trascrizionale di RelA e la sua abilità di interagire con co-attivatori, come p300 e CBP (Zhong H et al. *Mol. Cell*, 1998; Hoberg JE et al. *Mol. Cell Biol*, 2006; Chen LF and Greene WC *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2004). Per contro, la fosforilazione sulla Thr505 da parte di CHK1 in risposta all'induzione dell'oncosoppressore ARF o a danni al DNA dovuti a trattamento con cisplatino, inibiscono la transattivazione di RelA e ne aumentano l'associazione con HDAC1 (Rocha S et al. *Mol Cell*, 2003; Rocha S et al. *EMBO J*, 2005; Campbell KJ et al. *Cancer Res*, 2006). Questo induce all'inibizione dell'espressione di BCL-xL, un gene anti-apoptotico che è tipicamente attivato da NF-kB in risposta a stimoli infiammatori.

La fosforilazione di RelA sulla Ser536 da parte di IKK $\beta$  fornisce un meccanismo attraverso cui NF-kB interagisce con il pathway PI3K/AKT, il

quale è indotto da fattori di crescita, citochine e oncogeni come Ras (Thompson JE and Thompson CB *J Clin Oncol*, 2004). Questo pathway promuove la sopravvivenza cellulare e diverse evidenze indicano che la fosforilazione di RelA sulla Ser536 mediata da IKK $\beta$  richiede l'attività di PI3K/AKT (Madrid LV et al. *J Biol Chem*, 2001; Jeong SJ et al. *Oncogene*, 2005; Haller D et al. *J Biol Chem*, 2002).

Un altro meccanismo attraverso il quale NF-kB interagisce con altri pathway di segnalazione è attraverso il legame con altri fattori di trascrizione. La posizione e l'orientamento di molti siti di legame di NF-kB in promotori ed enhancer non è casuale e sia il contesto, sia la sequenza degli elementi kB può determinare la funzione delle subunità di NF-kB.

NF-kB può interagire con molti tipi di fattori di trascrizione, compresi i fattori trascrizionali bZIP come C/EBP $\beta$ , i membri delle famiglie Jun, ATF, CREB e Fos, e proteine zinc-finger come Sp1 e EGR1 (Perkins ND *Int J Biochem Cell Biol*, 1997; Natoli G et al. *Nature Immunol*, 2005; Chapman NR and Perkins ND *J Biol Chem*, 2000; Natoli G and De Santa F *Cell Death Differ*, 2006).

L'attivazione di NF-kB comporta la riprogrammazione dell'espressione genica in risposta a specifici stimoli o cambiamenti dell'ambiente cellulare. Infine, molti geni target di NF-kB generano feedback che influenzano la funzione di NF-kB e modificano profondamente anche altri pathway di segnalazione. Ad esempio, membri di AP-1 e della famiglia dei fattori di trascrizione ATF come JunB, JunD, B-ATF e ATF4, sono rapidamente indotti da NF-kB in cellule B in seguito a stimolazione con LPS (Krappmann D et al. *Mol Cell Biol*, 2004).

### 4.3 Ruolo di NF-kB nelle neoplasie

Il risultato fisiologico dell'attivazione di NF-kB, principalmente attraverso il *targeting* di diversi promotori e enhancers, differisce a seconda del tipo di cellula o di stimolo, così che NF-kB può avere funzioni apparentemente contraddittorie. Questo comporta importanti implicazioni nella comprensione del ruolo biologico di NF-kB e delle sue funzioni in ambito patologico. In letteratura, moltissimi lavori indicano che le subunità IKKs e NF-kB possono agire come promotori della tumorigenesi (Perkins ND *Trends Cell Biol*, 2004; Luo JL et al. *J Clin Invest*, 2005).

L'effetto pro-oncogenico di NF-kB si può schematizzare come sovrapproduzione dei suoi geni bersaglio in conseguenza alla sua attivazione cronica e localizzazione nucleare in cellule tumorali. Ad esempio, NF-kB può stimolare la sopravvivenza delle cellule tumorali attraverso l'induzione continua di geni anti-apoptotici come Bcl-xL, X-IAP, cIAP1, cIAP2 e A20 (Kucharczak J et al. *Oncogene*, 2003). Attraverso questa attività anti-apoptotica NF-kB può anche ridurre l'efficacia di molte terapie, che a loro volta attivano NF-kB stesso.

Attraverso la regolazione dell'espressione genica, NF-kB può anche promuovere altri processi oncogenici, tra cui: la proliferazione delle cellule tumorali attraverso la sua capacità di indurre proto-oncogeni come la ciclina D1 e c-Myc; metastasi attraverso la sua capacità di indurre l'espressione di molecole di adesione cellulare e metalloproteinasi della matrice; angiogenesi attraverso la regolazione del fattore di crescita vascolare endoteliale; e l'immortalità delle cellule attraverso la regolazione della telomerasi (Perkins ND *Trends Cell Biol*, 2004; Luo JL et al. *J Clin Invest*, 2005). Infine, in alcuni modelli, NF-kB fornisce il collegamento tra lo sviluppo del tumore e l'infiammazione cronica, un processo ritenuto alla base di circa il 20% dei tumori umani (Luo JL et al. *J Clin Invest*, 2005).

In contrasto con i suoi effetti di promotore tumorale, vi è una crescente evidenza che, in alcune circostanze, NF-kB può funzionare come soppressore tumorale. In molti casi, questo ruolo così diverso può essere attribuito ad alterazioni della funzionalità di NF-kB.

Diversi studi hanno collegato la funzione di NF-kB a p53, che costituisce una delle prime linee di difesa contro gli oncogeni o ai danni al DNA indotti dalla tumorigenesi. L'induzione di p53 in seguito a questi eventi può provocare l'arresto del ciclo cellulare per consentire la riparazione del

danno al DNA o morte cellulare attraverso l'induzione di geni pro-apoptotici. In entrambi i casi, questi effetti proteggono l'organismo dal potenziale evento tumorale. In linea con il loro ruolo di promotori tumorali, IKK e NF- $\kappa$ B possono contribuire alla soppressione dell'attività di p53 attraverso, per esempio, l'induzione dell'espressione di HDM2 (Tergaonkar V et al. *Cancer Cell*, 2002). In contrasto, in alcuni sistemi cellulari, RelA può aumentare la morte cellulare mediata da p53 (Ryan KM et al. *Nature*, 2000). Inoltre, p53 può aumentare l'associazione tra la subunità NF- $\kappa$ B p52 e HDAC1, con conseguente repressione della ciclina D1 e arresto del ciclo cellulare (Rocha S et al. *Mol Cell Biol*, 2003).

Coerentemente con il suo ruolo di promotore tumorale, NF- $\kappa$ B partecipa con oncoproteine, tra cui Bcr-Abl e Ras, all'induzione della trasformazione cellulare *in vitro* (Perkins ND *Trends Cell Biol*, 2004). E' interessante notare che queste oncoproteine sembrano aumentare la transattivazione di NF- $\kappa$ B e non la sua traslocazione nucleare.

Anche la regolazione della pathway di JNK da parte di NF- $\kappa$ B può avere un effetto sulla tumorigenesi. Un certo numero di meccanismi attraverso cui NF- $\kappa$ B sopprime l'attività di JNK sono stati identificati (Bubici C, et al. *Cell Cycle*, 2004). Questi includono l'induzione di Gadd45b, che agisce da inibitore della chinasi di JNK, MKK7 e l'induzione di XIAP, che oltre ad inibire le caspasi-3 e -7 può anche inibire JNK attraverso un meccanismo ancora indefinito. Tuttavia, in alcune circostanze, la perdita di Gadd45b o XIAP non sembra influenzare la via di segnalazione di JNK e specie reattive dell'ossigeno (ROS) hanno dimostrato giocare un ruolo nel *crosstalk* NF- $\kappa$ B/JNK. Infatti, la stimolazione con TNF $\alpha$ , in mancanza di NF- $\kappa$ B, porta alla generazione di ROS, che inducono l'attivazione di JNK e apoptosi (Bubici C, et al. *Cell Cycle*, 2004; Kamata H et al. *Cell*, 2005). Tuttavia, quando NF- $\kappa$ B viene attivato da TNF $\alpha$ , la produzione di ROS viene soppressa attraverso l'induzione di enzimi antiossidanti. Queste evidenze mostrano quindi come NF- $\kappa$ B inibisca la pathway di JNK, prevenendo così l'apoptosi e confermando in questo contesto il suo ruolo pro-tumorale.

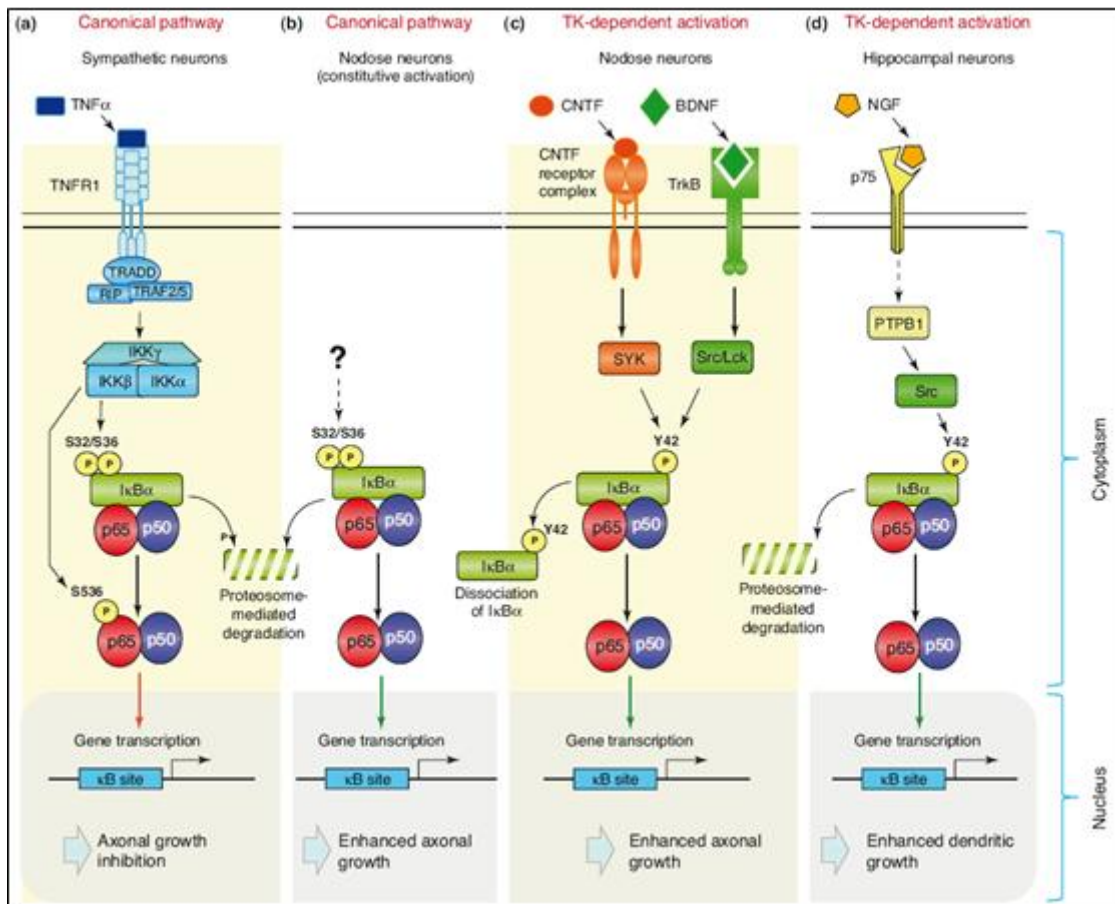
#### 4.4 Regolazione di NF-kB nei processi neurali

Le proteine NF-kB, ampiamente descritte nel sistema immunitario, dove giocano un ruolo cruciale nel regolare l'espressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria e infiammatoria, nella sopravvivenza e proliferazione cellulare, sono anche ampiamente espresse nel sistema nervoso, maturo e in via di sviluppo.

Studi con reporter di NF-kB su topi hanno evidenziato l'attività di NF-kB in molteplici regioni del cervello in diversi stadi di differenziamento e negli adulti (Memet S *Biochem Pharmacol*, 2006; Kaltschmidt B and Kaltschmidt C *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009). Nel sistema nervoso, un'ampia serie di segnali extracellulari regolano l'attività di NF-kB tra cui neurotrasmettitori, neuropeptidi, neutrofine, citochine e molecole di adesione neurale (NCAMs) (Memet S *Biochem Pharmacol*, 2006; Romano A et al. *Eur J Neurosci*, 2006). NF-kB è implicato nella regolazione dell'espressione di sempre più geni coinvolti nel differenziamento neurale e/o processi neurali, come ad esempio quelli che codificano per NCAM (Simpson CS and Morris BJ *J Biol Chem*, 2000) e per i recettori di neurotrasmettitori, neuropeptidi e fattori neurofici (Richter M et al. *Gene*, 2002; Kraus J et al. *Mol Pharmacol*, 2003; Chiechio S et al. *Mol Pain*, 2006; Kim MH et al. *Mol Cell Biol*, 2009; Mitra AK et al. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010). Nel sistema nervoso, NF-kB è inoltre coinvolto in processi di regolazione della sopravvivenza e morte neuronale, nella mielinizzazione dei nervi periferici e funzioni sinaptiche (Memet S *Biochem Pharmacol*, 2006). NF-kB è inoltre emerso essere un importante regolatore positivo della crescita assonale e dendritica nello sviluppo di neuroni periferici e centrali. Il signaling di NF-kB contribuisce alla crescita dei dendriti dei neuroni piramidali e alla crescita dei neuriti stimolati da NGF (*nerve growth factor*) e BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) rispettivamente nella linea cellulare neurale PC12 e nei neuroni sensitivi (Sole C et al. *J Cell Biol*, 2004; Gutierrez H et al. *Development*, 2005) ed è cruciale per la crescita dei neuriti in neuroni sensitivi promossa da CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) (Gallagher D et al. *J Neurosci*, 2007). Una grande varietà di stimoli attiva NF-kB in svariati tipi cellulari attraverso diverse pathway (Figura 7). Nel pathway canonico, IKK $\beta$  attivato fosforila I $\kappa$ B $\alpha$  sulle Ser32 e Ser36, inducendone l'ubiquitinazione e la degradazione, permettendo al dimero p50/p65 di



traslocare nel nucleo. IKK $\beta$  può anche fosforilare p65 sulla Ser536, inducendo NF-kB a funzioni inibitorie sulla crescita neurale.



**Figura 7:** Pathways di NF-kB che regolano la crescita neuronale (Modificato da Gutierrez H and Davies AM, *Trends in Neurosci*, 2011).

#### 4.5 Ruolo di NF-kB nel sarcoma di Ewing

In letteratura, il ruolo di NF-kB nel sarcoma di Ewing è scarsamente definito e pressochè volto ad indagare la sua funzionalità nel processo apoptotico. Il primo lavoro fa capo a Javelaud e colleghi che hanno mostrato come cellule di sarcoma di Ewing siano resistenti all'apoptosi indotta da TNF $\alpha$ , per via di una forte attivazione di NF-kB. Secondo gli autori, questa insolita elevata attivazione può aver luogo perchè l'attività di NF-kB presente nelle cellule tumorali non stimolate è solitamente molto bassa. Inoltre, hanno dimostrato che l'inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti p21<sup>Waf1/Cip1</sup> ha un'azione anti-apoptotica indotta da TNF $\alpha$  in quanto l'attivazione di questa proteina richiede l'attività di NF-kB. Inoltre, hanno dimostrato che l'over-espressione della forma mutata, resistente alla degradazione, di Ikb $\alpha$  [Ikb $\alpha$ (A32/A36)], sensibilizza le cellule di Ewing all'apoptosi indotta da TNF $\alpha$  (Javelaud D et al. *Oncogene*, 2000).

Un lavoro successivo ha mostrato poi come l'attivazione di NF-kB porti a un rapido spegnimento della pathway di JNK e di conseguenza a una inibizione dell'apoptosi TNF $\alpha$  indotta (Javelaud D and Besancon F *Oncogene*, 2001).

Gli stessi autori hanno poi dimostrato attraverso l'uso della forma mutata di Ikb $\alpha$ , come l'inibizione dell'attività costitutiva di NF-kB, nonostante non inibisca la capacità proliferativa delle cellule *in vitro*, inibisce la crescita di tumori *in vivo* in topi nudi (Javelaud D et al. *Int J Cancer*, 2002).

Questi primi studi hanno quindi suggerito l'utilizzo di inibitori di NF-kB in combinazione con trattamenti di TNF $\alpha$ , come possibile terapia complementare per il sarcoma di Ewing.

Un recente lavoro ha infine cercato di mettere in luce il ruolo di EWS-FLI1 sull'attività di NF-kB. E' stato dimostrando che: in cellule trasformate da EWS-FLI1 l'attività costitutiva di NF-kB è bassa, il TNF $\alpha$  attiva NF-kB preferibilmente nella forma eterodimerica p50/RelA(p65) e che EWS-FLI1 sebbene non abbia influenza sull'attività costitutiva di NF-kB, inibisce l'attivazione di NF-kB mediata da TNF $\alpha$ . Infatti, EWS-FLI1 non influenza direttamente l'espressione di NF-kB o la sua localizzazione cellulare ma solo la sua capacità di legare il DNA in seguito a stimolo di TNF $\alpha$  (Lagirand-Cantaloube J et al. *Biochem and Biophys Res Comm*, 2010).

Gli autori si sono dunque chiesti cosa mediasse questi processi, ipotizzando interazioni con co-fattori, modificazioni post-traduzionali di p65 e interazioni fisiche con altri elementi regolatori.

In conclusione, questi dati pongono molte domande aperte, tra le quali, in quale modo l'inibizione indiretta di NF- $\kappa$ B mediata da EWS-FLI1 possa essere un beneficio per lo sviluppo del sarcoma di Ewing.

NF- $\kappa$ B può provocare effetti anti-apoptotici attraverso la regolazione di p53, Fas, FasL, TNF $\alpha$ , TRAIL o DR6 in risposta a diversi induttori (Kucharczak MJ et al. *Oncogene*, 2003) e può agire come oncosoppressore nelle fasi iniziali del tumore (Perkins ND *Trends Cell Biol*, 2004), suggerendo che la compromissione dell'attività di NF- $\kappa$ B da parte di EWS-FLI1 potrebbe favorire la sopravvivenza cellulare.

Tuttavia, nel sarcoma di Ewing, NF- $\kappa$ B è stato dimostrato essere implicato nel conferimento della resistenza all'azione citotossica del TNF $\alpha$ , attraverso l'*up*-regolazione di geni anti-apoptotici (Javelaud D et al. *Oncogene*, 2000).

Un altro aspetto di NF- $\kappa$ B che può essere discusso è il suo ruolo nel differenziamento. La trascrizione di SOX9, un gene chiave coinvolto nella condrogenesi, viene attivato dalla subunità p65 in cellule condrogeniche di topo (Ushita M et al. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009). L'attivazione di NF- $\kappa$ B indotta da TNF $\alpha$ , promuove l'osteogenesi in cellule staminali mesenchimali umane (Hess K et al. *Bone*, 2009) o in tessuto adiposo derivato da cellule stromali (Cho HH et al. *J Cell Physiol*, 2010). EWS-FLI1 per contro inibisce il differenziamento adipogenico e osteogenico delle cellule mesenchimali C3H10T1/2 (González I et al. *J Mol Med*, 2007) e inoltre, inibisce l'osteogenesi e l'adipogenesi in cellule stromali di midollo osseo di topo (Torchia EC et al. *Cancer Res*, 2003).

Viste queste evidenze, l'inibizione di NF- $\kappa$ B, mediata in modo indiretto da EWS-FLI1 potrebbe contribuire al blocco del differenziamento associato all'oncogenesi del sarcoma di Ewing.

## SCOPO DELLA TESI

Il sarcoma di Ewing nonostante sia una neoplasia rara, rappresenta il secondo tumore osseo primitivo che colpisce prevalentemente bambini e giovani adulti. E' caratterizzato da cellule scarsamente differenziate, che rendono questa neoplasia altamente aggressiva. L'origine, ampiamente dibattuta, sembra essere una cellula mesenchimale staminale.

Le nuove conoscenze in ambito molecolare sottolineano come questo tumore, seppur originato da un evento trasformante definito che avviene durante una specifica fase dello sviluppo tissutale, conservi la plasticità caratteristica delle cellule totipotenti, che gli consentono di differenziare in diversi *lineage*.

La conoscenza dei mediatori cruciali del differenziamento in questa neoplasia è quindi fondamentale.

Studi pregressi hanno mostrato l'impatto di CD99 e EWS-FLI1 nella modulazione delle caratteristiche del sarcoma di Ewing.

Un recente studio ha corroborato la funzione inibitoria della molecola CD99 nel differenziamento delle cellule di sarcoma di Ewing (Rocchi A et al. *J Clin Inves*, 2010). Questa proteina è stata inoltre associata alla modulazione del pathway di MAPK/ERK nel mediare lo sviluppo del fenotipo neurale. Il pathway di MAPK, è documentato partecipare ai processi di differenziamento e apoptosi modulando l'attività di diversi fattori trascrizionali.

In questo quadro, lo scopo di questo studio è stato pertanto quello di valutare l'impatto di CD99 e EWS-FLI1 sulla capacità differenziativa delle cellule di sarcoma di Ewing focalizzandoci sui fattori trascrizionali implicati in questo processo, in particolare il ruolo di NF-kBp65.

A tal fine, su diversi modelli cellulari a confronto, sono stati messi a punto studi funzionali di silenziamento e overespressione, attraverso trasfezioni stabili e transienti dei vari mediatori, per stabilire le connessioni funzionali e l'ordine gerarchico nel processo differenziativo.

# MATERIALI E METODI

## LINEE CELLULARI

La linea cellulare di sarcoma di Ewing TC-71 è stata fornita dal Dott. T. J. Triche (Childrens Hospital, Los Angeles, CA), la linea cellulare IOR/CAR è stata ottenuta dal Laboratorio di Oncologia Sperimentale (Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna). Le cellule sono state coltivate in terreno Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (*Lonza*) con siero fetale di bovino al 10% inattivato (FBS, *Fetal Bovine Serum*) (*Lonza*), addizionato con penicillina 100U/ml e streptomicina 100mg/ml, ad una temperatura di 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>.

Nel laboratorio sono stati precedentemente ottenuti cloni stabili, usati per i nostri studi, a partire dalla linea TC-71. I cloni TCshCD99#23 e TCshCD99#24 derivano dalla trasfezione della linea parentale con il plasmide pSilencer<sup>TM</sup>4.1-CMV neo (*Ambion*) in cui è stata inserita la sequenza codificante la molecola *short hairpin* RNA specifica per il gene MIC2, il trasfettante di controllo TC-CTRshCD99, invece, deriva dalla trasfezione della linea parentale TC-71 con il medesimo plasmide pSilencer<sup>TM</sup>4.1-CMV neo, codificante una sequenza aspecifica. Il metodo impiegato per la trasfezione è stato quello del calcio-fosfato (*Calcium Phosphate Transfection System Kit, Invitrogen*). La selezione è avvenuta con l'aggiunta al terreno di coltura di 500µg/ml di neomicina (*Sigma-Aldrich*) (Rocchi A. *J.Clin Invest*, 2010).

In analogo a quanto ottenuto nella linea TC-71, a partire dalla linea cellulare IOR/CAR sono stati ottenuti i cloni CARshCD99#13 e CARshCD99#34 e il clone di controllo CAR-CTRshCD99. La selezione è avvenuta con l'aggiunta al terreno di coltura di 1000 µg/ml di neomicina.

La linea cellulare ASP14, gentilmente fornita dal Prof. H. Kovar (Children Cancer Research Institute, St. Anna Kinderkrebsforschung, Vienna, AT), contiene un sistema inducibile doxyciclina dipendente codificante uno *short hairpin* per EWS-FLI1. La selezione è ottenuta con l'aggiunta al terreno di coltura di Blastocidina 2µg/ml e Zeocina 50µg/ml. Il

silenziamento di EWS-FLI1 è indotto dal trattamento con Doxyciclina 1ng/ml per 48-72 ore.

Infine, a partire dalla linea TC-71 è stato creato un pool di cellule stabilmente silenziate per NF-kBp65 con il plasmide shNF-kBp65 (gentilmente concesso dal Prof. H. Kovar, Children Cancer Research Institute, St. Anna Kinderkrebsforschung, Vienna, AT).

Il metodo impiegato per la trasfezione è stato quello del calcio-fosfato (*Calcium Phosphate Transfection System Kit, Invitrogen*). La selezione è avvenuta con l'aggiunta al terreno di coltura di 2.5µg/ml di puromicina (*Sigma-Aldrich*).

## **TRASFEZIONE STABILE**

Le linee IOR/CAR e TC-71 è stata seminata in petri da 100 mm Ø in IMDM al 10% di FBS, in modo da avere il 60% circa di confluenza al momento della trasfezione. Quest'ultima è stata effettuata secondo il protocollo del kit *Calcium Phosphate Transfection System (Invitrogen)* che prevede l'aggiunta del DNA plasmidico (10-20 µg) di interesse ad una soluzione concentrata di CaCl<sub>2</sub>. La mix viene mescolata ad un buffer fosfato (HBS 2x) facendo gorgogliare dell'aria con una pipetta, per consentire la formazione di un fine precipitato Ca<sup>2+</sup>-DNA (circa 30 minuti, a temperatura ambiente).

La miscela così ottenuta è stata aggiunta goccia a goccia a ciascuna petri; come controllo, le petri rimanenti sono state trattate con una soluzione contenente soltanto acqua e sali.

Dopo un'incubazione *overnight*, il terreno con i precipitati è stato rimosso, mantenendo le cellule in terreno normale per i due giorni successivi. La loro seguente esposizione al terreno selettivo per circa due settimane ha consentito solo ai cloni contenenti il plasmide di crescere. Successivamente si è proceduto allo screening dei cloni sulla base dell'espressione proteica del CD99 valutata al citometro a flusso.

## **CITOMETRIA A FLUSSO**

I campioni cellulari sono stati analizzati mediante immunofluorescenza indiretta e citometria a flusso (*FACSCalibur, Becton Dickinson*) durante lo screening per la caratterizzazione dei cloni di IOR/CAR silenziati per il CD99.

Dopo trapianto con tripsina e conta vitale con trypan blue, per ogni linea cellulare sono stati preparati dei prelievi da 500.000 cellule, centrifugati a 3000 rpm per 5 minuti; il pellet così ottenuto è stato lavato con PBS per eliminare i residui di FBS presenti nel mezzo di coltura. Dopo un'ulteriore centrifugazione, le cellule sono state risospese con l'anticorpo primario  $\alpha$ -CD99 O13 MAb (diluizione 1:80) (*Signet Ortho*); i controlli negativi, invece, in un uguale volume di PBS. In seguito ad un'incubazione di 30 minuti in ghiaccio, la reazione è stata bloccata con l'aggiunta di IMDM senza siero. Centrifugate ancora le cellule nelle stesse condizioni prima menzionate, si è proceduto con l'incubazione con l'anticorpo secondario Goat anti-Mouse IgG (H+L) FITC (diluizione 1:100) (*Thermo Fisher Scientific Inc*). Dopo 30 minuti a freddo, l'incubazione è stata interrotta come sopra e i campioni sono stati centrifugati e risospesi in PBS con bromuro di etidio (che colora le cellule morte) alla concentrazione di 1 $\mu$ g/ml per l'analisi al FACS.

## **ANALISI DELLA CRESCITA CELLULARE IN MONOSTRATO**

Per valutare l'effetto del silenziamento della proteina CD99 sulla capacità di crescita in monostrato, la linea parentale IOR/CAR è stata confrontata con i trasfettanti stabili CARshCD99#13, CARshCD99#34 e il controllo CAR-CTRshCD99.

Sospensioni cellulari da 500.000 cellule per ogni linea cellulare sono state seminate in fiasca T25 (25cm<sup>2</sup>) in IMDM 10% FBS e l'andamento della crescita, fino alla saturazione, è stato ricavato raccogliendo le cellule ogni 24 ore per 11 giorni ed effettuando una conta vitale mediante colorazione con Trypan Blue (*Sigma-Aldrich*).

## **ANALISI DELLA CRESCITA CELLULARE IN TERRENO SEMI-SOLIDO “SOFT AGAR”**

La crescita delle linee cellulari in condizioni d'indipendenza da ancoraggio è stata valutata in agar allo 0.33%, in petri da 60 mm Ø. Sospensioni cellulari da 3.300 cellule per IOR/CAR, CAR-CTRshCD99, CARshCD99#13 e CARshCD99#34 sono state seminate in terreno semi-solido (IMDM al 10% FBS con 0.33% di agar). Le petri sono state mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Le colonie delle diverse linee cellulari sono state contate 14 giorni dalla semina.

## **LISI PROTEICA E WESTERN BLOTTING**

Le proteine sono state estratte da cellule seminate in petri da 100 mm Ø di diametro e raccolte al raggiungimento di uno stato di sub-confluenza o di confluenza. Le cellule sono state lisate in ghiaccio in un tampone di lisi costituito da Buffer UPSTATE per proteine fosforilate (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1mM EDTA, 0.25% sodio deossicolato, 1mM NaF) con l'aggiunta di 1/100 del volume del buffer degli inibitori delle proteasi: aprotinina (10µg/ml), leupeptina (0.1mM), PMSF (1mM), sodio ortovanadato (0.2mM). Dopo 30 minuti di incubazione in agitazione in ghiaccio, i lisati sono stati centrifugati ed è stato raccolto il surnatante contenente la frazione proteica delle cellule. La concentrazione delle proteine è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro diluendo 1µl di campione in 999µl di Protein Assay (*Bio-Rad*) e confrontando le densità ottiche dei campioni con quelle della curva standard della BSA (*Bovine Serum Albumin*) a concentrazione nota. Prelievi di 40µg di proteine sono stati caricati su un gel al 10% SDS-PAGE. Dopo la corsa elettroforetica, è stato fatto il trasferimento per tutta la notte su membrane di nitrocellulosa (*Bio-Rad*). Mediante colorazione con Ponceau (*Sigma-Aldrich*) si è valutata la presenza di proteine sulla membrana di nitrocellulosa che è stata poi incubata per 1 ora con una soluzione TBST (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl e 0.1% Tween20) al 5% di *non-fat dry milk* (*Bio-Rad*), per saturare i possibili siti aspecifici.



Di conseguenza è stata valutata l'espressione di diversi antigeni:

- $\alpha$ -CD99 12E7 (*Dako*, 1:5000)
- GAPDH (*Santa Cruz Biotechnology*, 1:3000)
- FLI1 (*Santa Cruz Biotechnology*, 1:400)
- NF-kBp65 (*Santa Cruz Biotechnology*, 1:3000)

Per questi antigeni è stata effettuata un'incubazione *overnight* a +4°C.

L'incubazione con l'anticorpo secondario è stata per tutti di 1 ora a temperatura ambiente con anti-rabbit o anti-mouse (*Amersham*) coniugato con l'enzima perossidasi di rafano. Pertanto si è proceduto allo sviluppo su lastra fotografica mediante ECL (*Euroclone*) per la reazione chemiluminescente.

## **IMMUNOFLUORESCENZA SU CELLULE IN ADERENZA**

Le cellule sono state seminate in petri 60 mm Ø contenenti un vetrino trattato con fibronectina (*Sigma-Aldrich*) e fissate dopo 48 ore dalla semina con una soluzione al 4% di PBS-paraformaldeide per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo permeabilizzazione con una soluzione 0.15% di PBS-Triton X-100, le cellule sono state incubate per un ora a temperatura ambiente con una soluzione al 5% di PBS-BSA per bloccare i siti aspecifici. L'anticorpo primario: anti- $\beta$ III-tubulina (diluizione 1:50) (*Sigma-Aldrich*) è stato incubato *overnight* a 4°C in camera umida. L'anticorpo secondario: Goat anti-Mouse IgG (H+L) FITC (diluizione 1:100) (*Thermo Fisher Scientific Inc*) è stato incubato per 1 ora a temperatura ambiente in camera umida. I nuclei sono stati contrastati con Hoechst 33258 0.5  $\mu$ g/ml (*Sigma-Aldrich*).

L'acquisizione dei vetrini è stata effettuata con un microscopio a fluorescenza Nikon ECLIPSE 90i, obiettivo 40X.

## LUCIFERASE REPORTER GENE ASSAY

Le cellule sono state seminate in IMDM 10% FBS senza antibiotici in piastre da 24 pozzetti (30.000 cellule/pozzetto). A circa 50% di confluenza, le cellule sono state trasfettate con 250ng di SRE(Elk-1), AP-1, CREB, E2F reporter assay (*Cignal Reporter Assay Kit; Quiagen - SA Biosciences*). La miscela contiene il reporter Firefly luciferasi sotto il controllo del fattore trascrizionale d'interesse e il reporter Renilla per valutare l'efficienza di trasfezione (40:1).

Per NF-kBp65 sono stati trasfettati 50ng di plasmide IgkB con-A LUC e 50ng di plasmide pTK-RNL esprime il costrutto Renilla (i plasmidi sono stati gentilmente concessi dal Prof. H Kovar Childern Cancer Research Institute, St.Anna Kinderkrebsforschung, Vienna, AT). La trasfezione è stata eseguita con Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*).

48 ore dopo la trasfezione le cellule sono state incubate con il reagente *Dual-Glo Luciferase (Promega)* che induce la lisi cellulare e agisce come substrato per la luciferasi Firefly. Successivamente, le cellule vengono incubate con il reagente *Dual-Glo Stop & Glo* che spegne la luminescenza della Firefly e fornisce il substrato per la luciferasi Renilla. Attraverso l'utilizzo del luminometro le attività luciferasiche sono state misurate e i valori, normalizzati sull'attività della Renilla sono stati espressi come *fold induction* sul controllo negativo. I dati sono rappresentati come *Relative Light Units (RLU)* e come *fold induction* rispetto alla linea parentale.

Per il silenziamento transiente di CD99 nella linea cellulare ASP14, sono state usate la sequenza controllo Scrambled (ON-TARGETplus siCONTROL) (IDT-Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) e la sequenza siRNA (5'GGCUGGCCAUUAUUAAGUCTT3') (*Dharmacon-Thermo Scientific Inc*) alla concentrazione finale di 40nM. Le cellule sono state seminate in terreno IMDM 10% FBS senza antibiotici e co-trasfettate insieme al reporter per NF-kBp65, dopo 24 ore utilizzando la Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*).

Per il silenziamento transiente di EWS-FLI1 nelle linee cellulari TC-71 e TCshCD99#23, è stato utilizzato il plasmide contenente uno *short hairpin* per la sequenza di EWS-FLI1, gentilmente concesso dal Prof. H. Kovar (Childern Cancer Research Institute, St.Anna Kinderkrebsforschung,

Vienna, AT). Le cellule sono state seminate in terreno IMDM 10% FBS senza antibiotici e co-trasfettate insieme al reporter per NF-kBp65, dopo 24 ore utilizzando la Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*).

Per l'overespressione transiente di NF-kBp65 nella linea cellulare TCshCD99#23, è stato utilizzato il plasmide pCMVp65, gentilmente concesso dal Prof. H. Kovar (Children Cancer Research Institute, St. Anna Kinderkrebsforschung, Vienna, AT). Le cellule sono state seminate in terreno IMDM 10% FBS senza antibiotici e co-trasfettate insieme al reporter per NF-kBp65, dopo 24 ore utilizzando la Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*).

### **Trattamento con TNF $\alpha$**

Per valutare l'effetto stimolatorio di TNF- $\alpha$  sull'attività trascrizionale di NF-kBp65, le cellule sono state esposte a TNF- $\alpha$  (*Boehringer Mannheim*) alla concentrazione di 1ng/ml per 4 ore prima di misurare l'attività luciferasica di NF-kBp65, 48 ore dopo la trasfezione.

### **Trattamento con PD98059**

Per valutare l'attività trascrizionale di AP-1, dopo inibizione di ERK, le cellule sono state trattate con PD98059 (*Calbiochem*) alla concentrazione di 50 $\mu$ M per 2 ore. L'attività luciferasica è stata misurata 24 ore dopo la trasfezione.

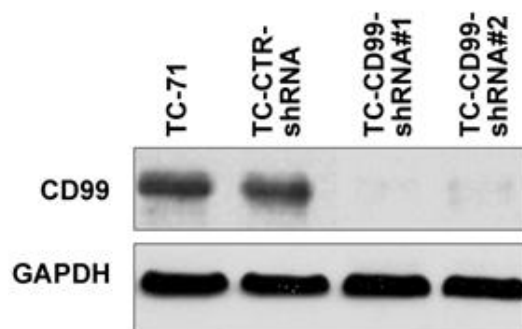
## **ANALISI STATISTICA**

La differenza tra le medie di singoli esperimenti è stata calcolata usando il test del *t* Student.

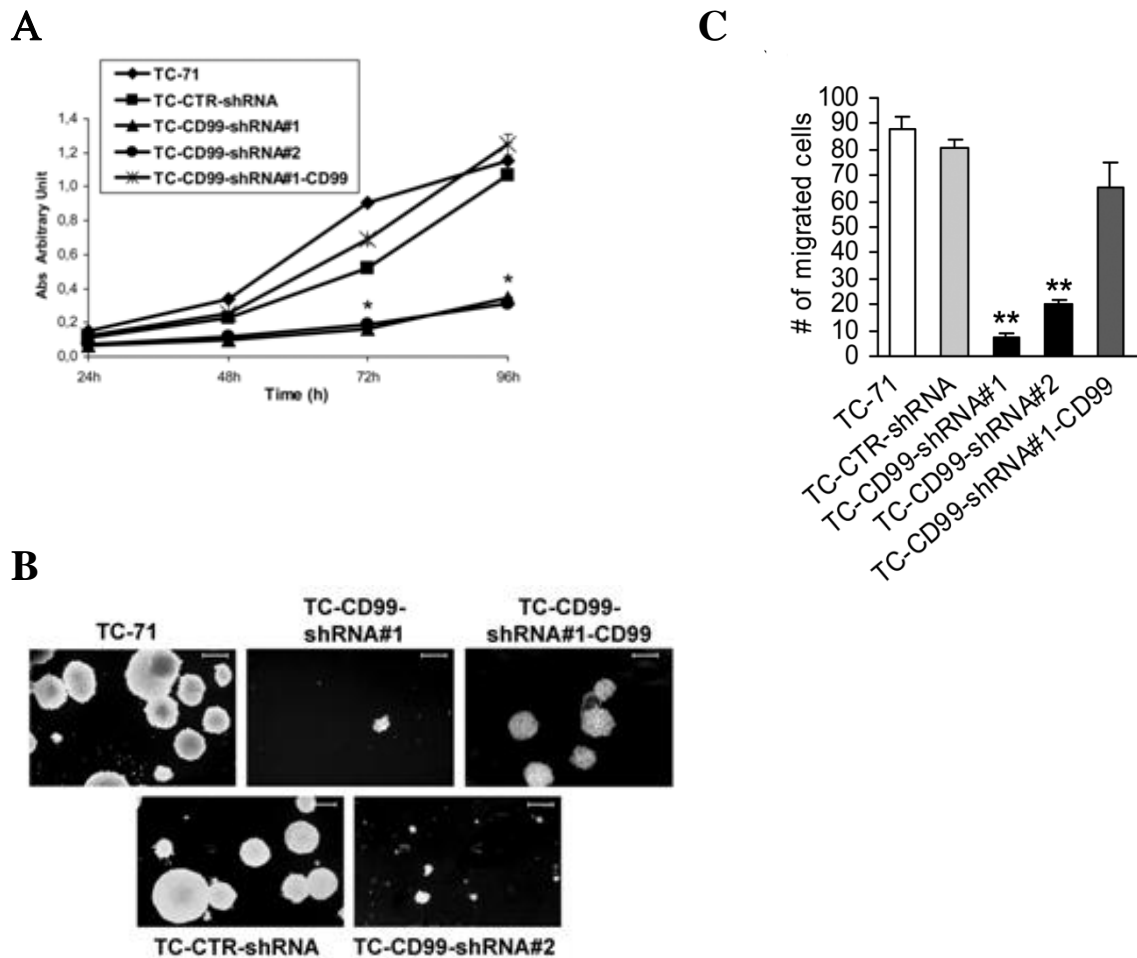
# RISULTATI

## 1. DATI PRELIMINARI

Dati preliminari prodotti nel nostro laboratorio, hanno evidenziato che l'espressione della proteina CD99 è una condizione richiesta per il fenotipo oncogenico delle cellule di ES *in vitro* e *in vivo*. Attraverso l'utilizzo di linee cellulari silenziate stabilmente per il CD99 (Figura 8) si è osservato che i trasfettanti hanno un fenotipo meno maligno. I cloni silenzianti, infatti, mostrano un'inibizione della crescita in monostrato, della crescita in assenza di ancoraggio (soft-agar) e della motilità cellulare rispetto alla linea cellulare parentale (Figura 9A, B, C). *In vivo* si osserva una minore crescita della massa tumorale e una ridotta insorgenza di metastasi. Si assiste a un blocco del ciclo cellulare in fase G<sub>2</sub>/M e a un'induzione del processo apoptotico. L'analisi di alcune proteine chiave del ciclo cellulare e di alcuni mediatori dell'apoptosi ha indicato una *up*-regolazione di p21 e p27, due effettori che partecipano al controllo del *checkpoint* G1/G2, bloccando il ciclo cellulare e alla *down*-regolazione della proteina anti-apoptotica Bcl-2.



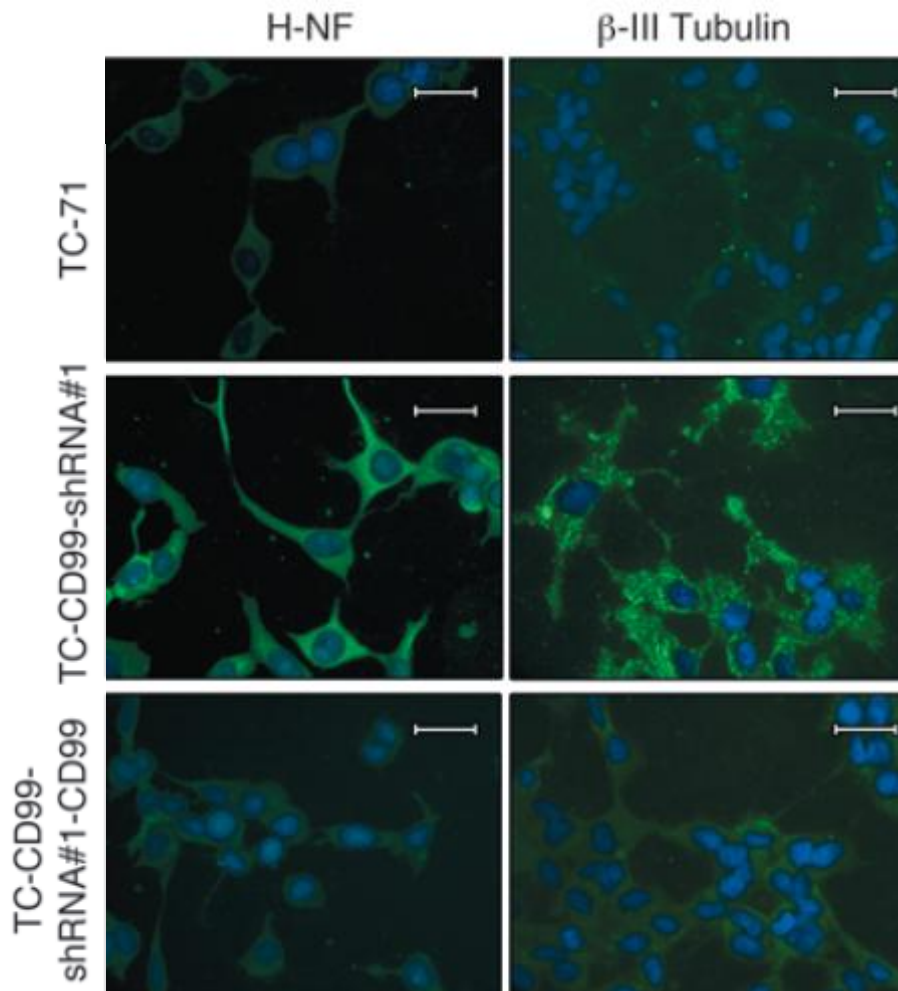
**Figura 8:** Silenziamento stabile del CD99 attraverso l'uso del plasmide CD99-shRNA nella linea cellulare di ES TC-71. I cloni TC-CD99shRNA mostrano un abbondante *knockdown* del CD99 a livello proteico determinato in Western blotting.



**Figura 9:** Effetti in vitro del silenziamento del CD99 in cellule di ES.

**A:** Crescita in monostrato; **B:** Inibizione della crescita in assenza di ancoraggio; **C:** Inibizione della motilità cellulare

I trasfettanti silenziati per il CD99 tendono a differenziare in senso neurale, sviluppando neuriti ed esprimendo specifici marker di differenziamento neurale come la proteina  $\beta$ III-tubulina e la catena pesante dei neurofilamenti (H-NF), marker di differenziamento neurale terminale (Figura 10). A dimostrazione del fatto che il differenziamento neurale è associato alla perdita della glicoproteina CD99, dopo trattamento con l'induttore NGF, i trasfettanti mostrano un'elevata espressione di H-NF al contrario delle cellule parentali. A ulteriore conferma, analizzando l'espressione di CD99 e H-NF in una casistica di pazienti affetti da ES si è osservata una correlazione inversa tra i due antigeni e lo stato differenziativo e la malignità *in vitro* e *in vivo* (Rocchi A et al. *J Clin Inves*, 2010).



**Figura 10:** Immunofluorescenza di  $\beta$ III-tubulina e H-NF nel modello sperimentale TCshCD99.

Per meglio comprendere la funzione del CD99 è stato attuato uno studio di profilo genico identificando diverse pathways coinvolte nei processi di differenziamento, modulate dal CD99, tra cui MAPK, Hedgehog, Wnt e Notch. L'attivazione transiente di MAPK è dimostrata indurre proliferazione nella linea cellulare PC12, mentre una prolungata attivazione promuove il differenziamento neurale (Traverse S. *Biochem J*, 1992). Nei cloni silenziati per il CD99 si assiste a una costante e prolungata attivazione di ERK1/2, indicando quindi un coinvolgimento di MAPK. Trattando le cellule con PD98059, noto inibitore di ERK, si osserva come atteso, una diminuzione della proliferazione nella linea parentale. Tuttavia, nei cloni non si assiste all'inibizione della proliferazione ma a una *down*-modulazione del differenziamento neurale. Questi effetti vengono meno quando l'espressione del CD99 è ristabilita. Questo suggerisce come il

CD99 prevenga il differenziamento neurale nel sarcoma di Ewing attraverso la via di MAPK (Rocchi A. *J.Clin Invest*, 2010).

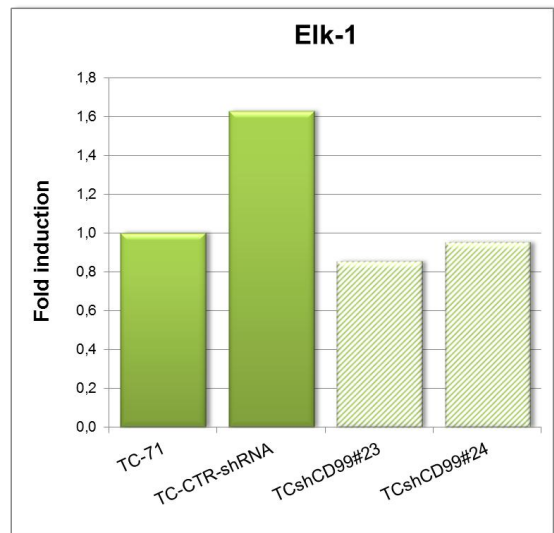
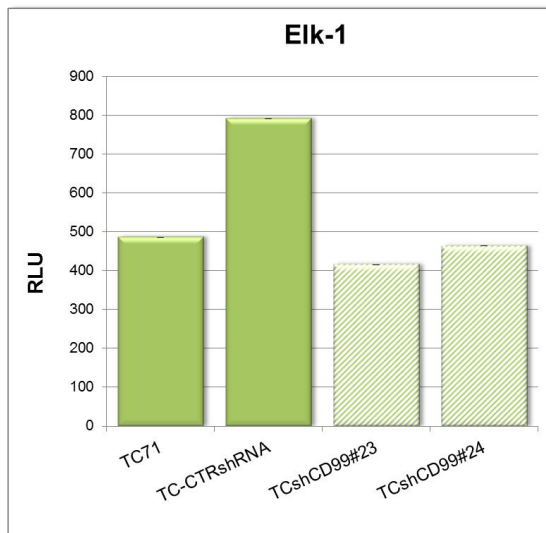
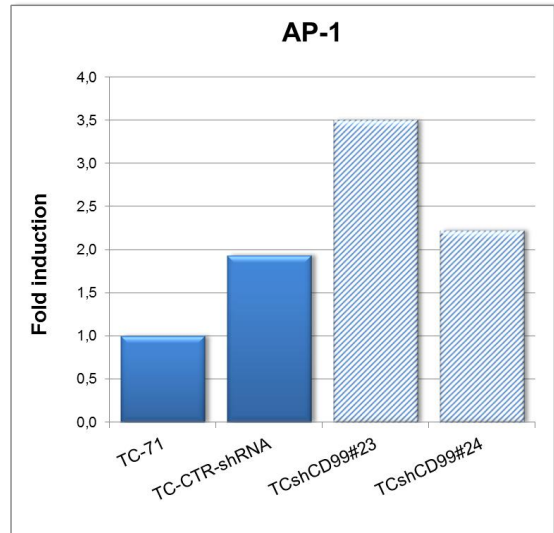
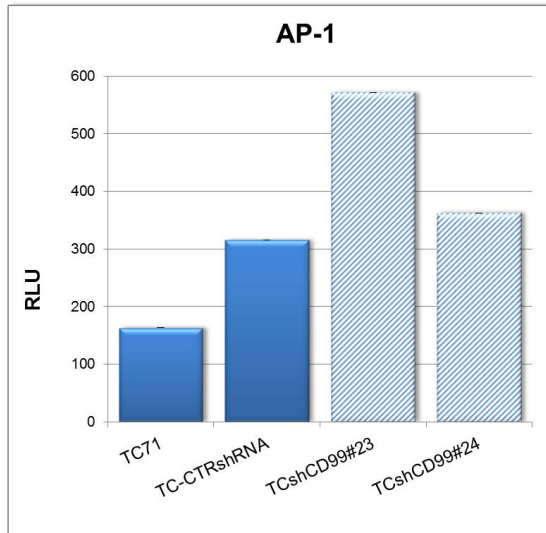
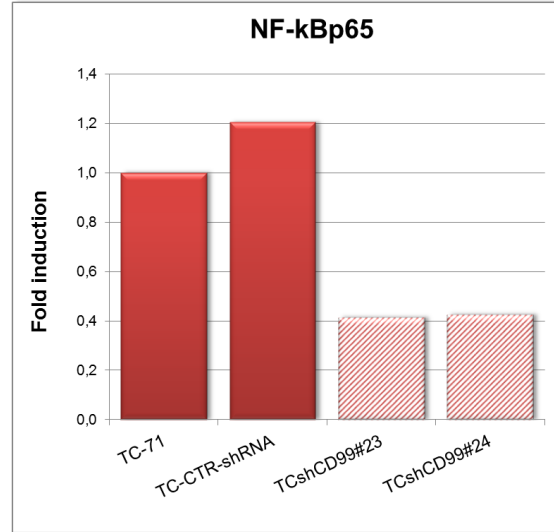
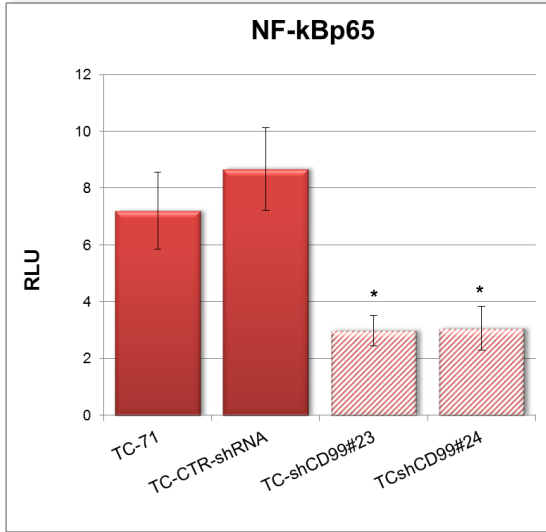
In letteratura, numerosi studi effettuati sulla linea cellulare PC12 e colture di cellule primarie suggeriscono che l'attivazione costitutiva di Raf, MEK1 o ERK2 induca il differenziamento neurale; inoltre alcuni studi suggeriscono che l'attivazione modulata da Ras/Raf/MEK/ERK pathway può rappresentare il principale meccanismo attraverso cui le cellule possono essere indotte verso la proliferazione o il differenziamento. (Crespo P and Leòn J *Cell Mol Life Sci*, 2000; Yang H. *J Biol Chem*, 2008; Grewal S.S. *Curr Opin Neurobiol*, 1999; Fukunaga K *Mol Neurobiol* 1998). In particolare, l'induzione del differenziamento in seguito ad attivazione del pathway di Ras/MAPK risulta essere associata alla durata del segnale. Esperimenti condotti sulla linea PC12 hanno mostrato che un'attivazione transiente di MAPK induce proliferazione, mentre un'attivazione prolungata induce differenziamento neurale. (Traverse S. et al. *Biochem J*, 1992). Nello specifico, la fosforilazione prolungata di ERK1/2 nucleare sembra essere cruciale nello spostamento delle funzioni biologiche di ERK1/2 verso lo sviluppo e differenziamento neurale (Silvany RE et al. *Oncogene*, 2000) Un possibile meccanismo attraverso il quale ERK può indurre differenziamento è traslocando nel nucleo e attivando specifici fattori di trascrizione quali AP-1 e NF-kB (Davis RJ *Mol. Repro.* 1995; Whitmarsh, AJ and Davis RJ *J. Mol. Med.* 1996; Woodgett, JR et al. *Pigment Cell Res.* 1994), che possono a loro volta regolare il differenziamento neurale.

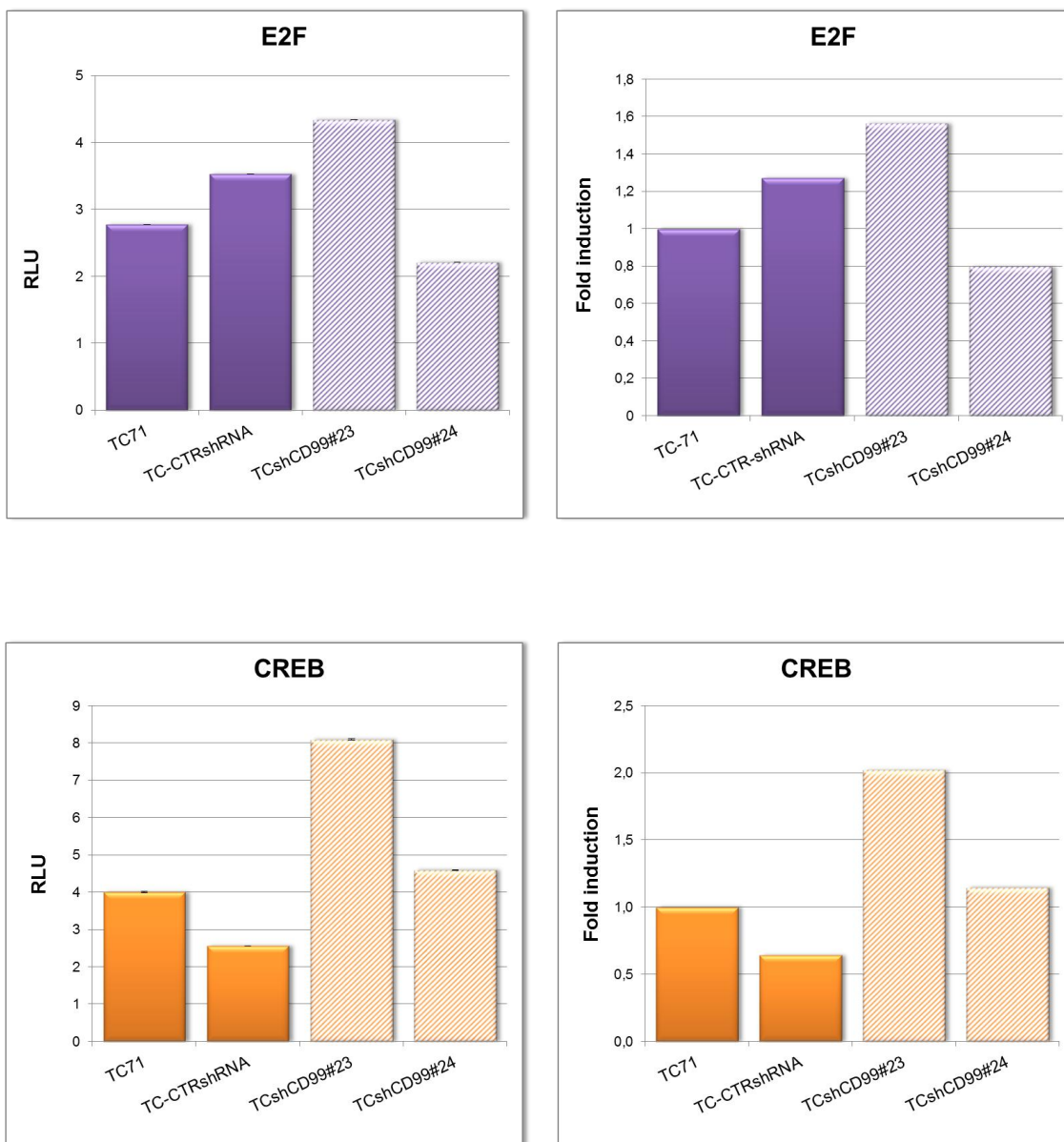
## **2. FATTORI TRASCRIZIONALI NEL MODELLO TC-CD99shRNA**

Allo scopo di identificare fattori trascrizionali modulati nel nostro modello sperimentale TC-71 e cloni TC-CD99shRNA abbiamo utilizzato la tecnica della luciferase gene reporter assay. Questa tecnica permette di valutare l'attività trascrizionale di cellule trasfettate con un costrutto contenente il gene reporter della luciferasi sotto il controllo del promotore d'interesse. Dopo generalmente 48h le cellule sono lisate, l'estratto cellulare viene fatto reagire con luciferina (substrato della luciferasi),  $Mg^{++}$  e ATP. L'enzima luciferasi eventualmente espresso, catalizza la carbossilazione ossidativa della luciferina producendo luminescenza. Questo effetto può essere quantificato con un luminometro e la quantità di fotoni rivelata correla direttamente con l'attività di binding del fattore di trascrizione oggetto di studio.

Nel nostro modello sperimentale abbiamo quindi analizzato l'attività trascrizionale di diversi fattori trascrizionali quali: NF-kBp65, AP-1, Elk-1, E2F e CREB (Figura 11).



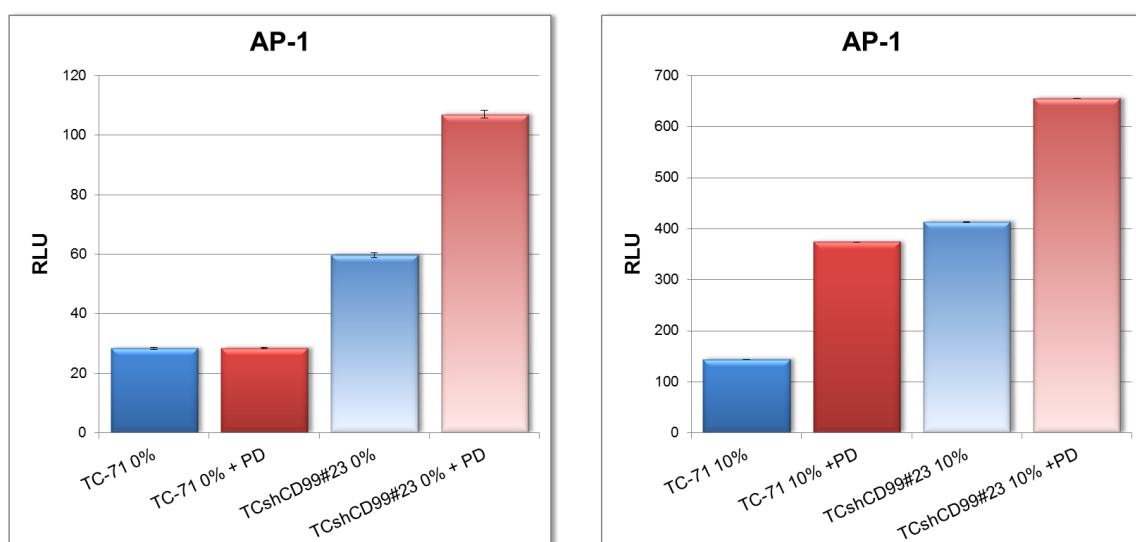




**Figura 11:** Attività trascrizionale di NF-kBp65, AP-1, Elk-1, E2F e CREB nel modello sperimentale TC-CD99-shRNA. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e i grafici riportano i valori di almeno due esperimenti indipendenti. (Media  $\pm$  ES, \* indica un valore di  $P < 0.05$ , test del t-Student rispetto alla linea parentale TC-71).

Rispetto alla linea parentale TC-71, i cloni silenziati per il CD99 mostrano una significativa *down*-regolazione dell'attività trascrizionale di NF-kBp65, un leggero aumento dell'attività trascrizionale di CREB, una maggiore attività trascrizionale di AP-1 e nessuna variazione statisticamente significativa per i fattori trascrizionali Elk-1 e E2F.

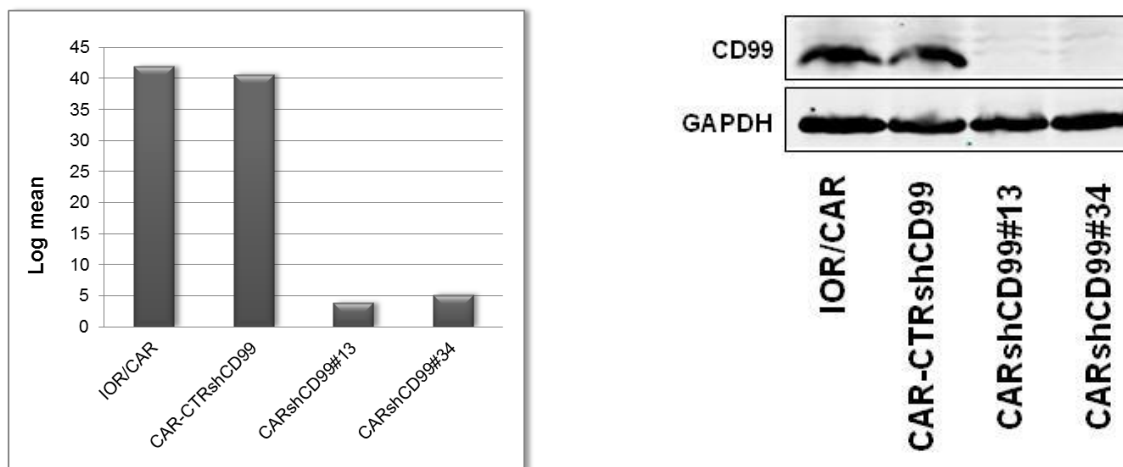
Considerata l'*up*-regolazione di AP-1 nelle cellule silenziate per CD99 e le evidenze presenti in letteratura che correlano MAPK con AP-1 abbiamo analizzato se fosse presente una correlazione tra il fattore trascrizionale e ERK1/2 nel nostro modello TCshCD99. Abbiamo trattato le cellule con l'inibitore specifico per ERK1/2, PD98059, e valutato l'attività trascrizionale di AP-1. In condizioni basali, si riconferma la upregolazione di AP-1 in mancanza di CD99 (colonne blue). Sia in assenza, sia in presenza di siero, il trattamento con il PD98059 non sembra inibire l'attività trascrizionale di AP-1, facendoci concludere che questo fattore trascrizionale non è modulato da ERK1/2 nel nostro modello sperimentale (Figura 12).



**Figura 12:** Attività trascrizionale di AP-1 nel modello sperimentale TC-CD99-shRNA dopo trattamento con l'inibitore specifico di ERK1/2, PD98059 in assenza e presenza di siero. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato (Media  $\pm$  ES).

### 3. MODELLO SPERIMENTALE CAR-CD99shRNA

Successivamente abbiamo voluto creare un secondo modello sperimentale di confronto al TC-71 e per farlo abbiamo trasfettato la linea cellulare IOR/CAR, seguendo il protocollo del Calcio-Fosfato. Tale processo ha consentito l'introduzione, in modo permanente, del plasmide pSilencer contenente il gene di resistenza al G418 e l'inserto di interesse: la sequenza codificante il shRNA per la sequenza del CD99. Come controllo aggiuntivo è stata effettuata la trasfezione anche con il plasmide privo di inserto, pSilencer-CTRshCD99. I trasfettanti stabili sono stati selezionati per la loro capacità di crescita in terreno selettivo e successivamente caratterizzati in funzione della qualità del silenziamento del CD99. Tra i cloni ottenuti, sono stati scelti due trasfettanti CARshCD99 sulla base della quantità di glicoproteina silenziata, valutata attraverso citofluorimetria a flusso (FACS) e western blotting. Da queste analisi è reso visibile un netto profilo tra la linea parentale IOR/CAR e i cloni CARshCD99#13 e CARshCD99#34 (Figura 13).

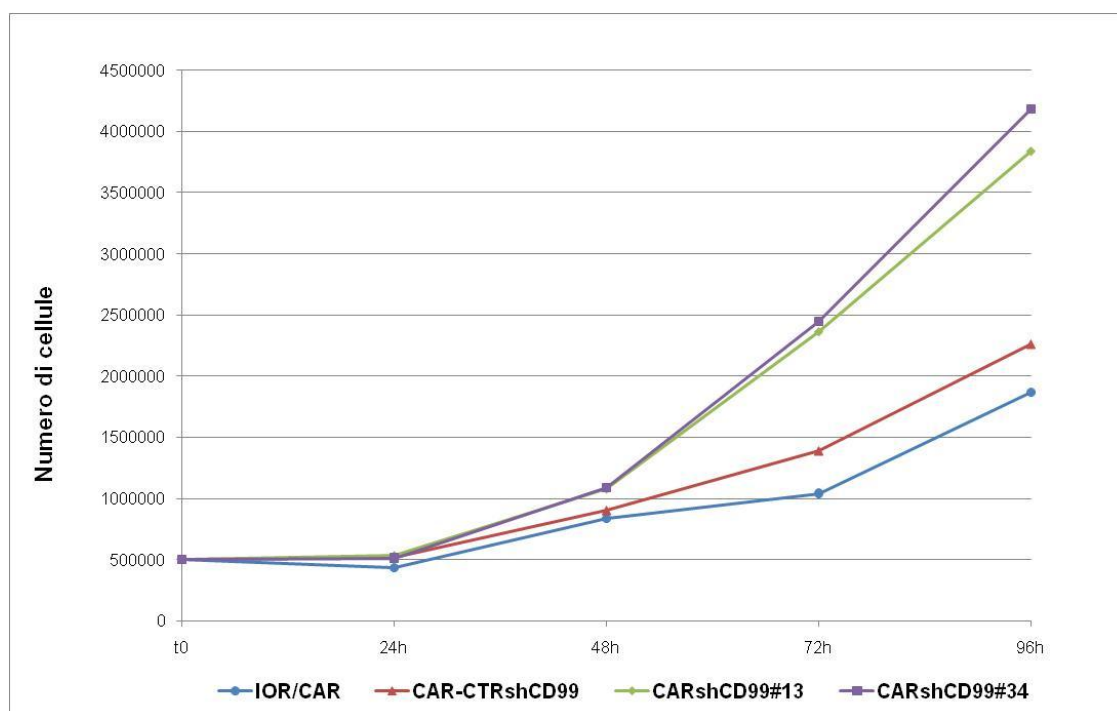


**Figura 13:** Espressione dell'antigene CD99 sui trasfettanti IOR/CAR mediante citometria a flusso e western blotting.

Abbiamo successivamente caratterizzato i cloni CARshCD99 per la capacità di crescita *in vitro* come: crescita in monostrato e crescita in soft-agar. Quest'ultimo è un test che consente di sondare la crescita delle cellule in assenza di ancoraggio ed è uno dei migliori metodi *in vitro* per valutare

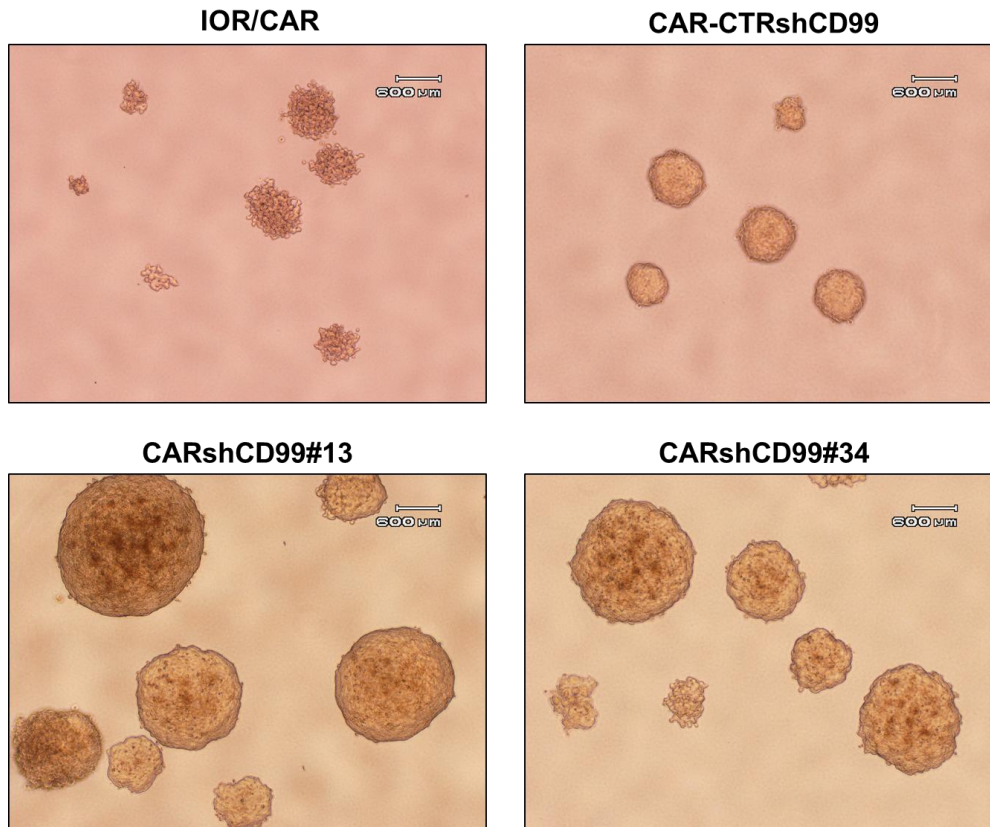
l'aggressività tumorale in quanto mostra la migliore correlazione con il grado di malignità *in vivo* delle cellule.

Nonostante il silenziamento della proteina CD99 si sia dimostrato in citofluorimetria e western blotting molto soddisfacente, i risultati ottenuti non hanno confermato i risultati attesi. L'esame della capacità proliferativa in monostrato non ha messo in rilievo alcun rallentamento della crescita nei trasfettanti rispetto alla linea parentale e anche la crescita in terreno semisolido o *soft-agar* non mostra differenze quantitative. Il silenziamento del CD99 nella linea cellulare IOR/CAR non induce una variazione del numero delle colonie ma a un aumento della dimensione delle stesse, contrariamente alle cellule trasfettate con il vettore vuoto che, invece, non mostrano alcuna alterazione (Figura 14 e 15).



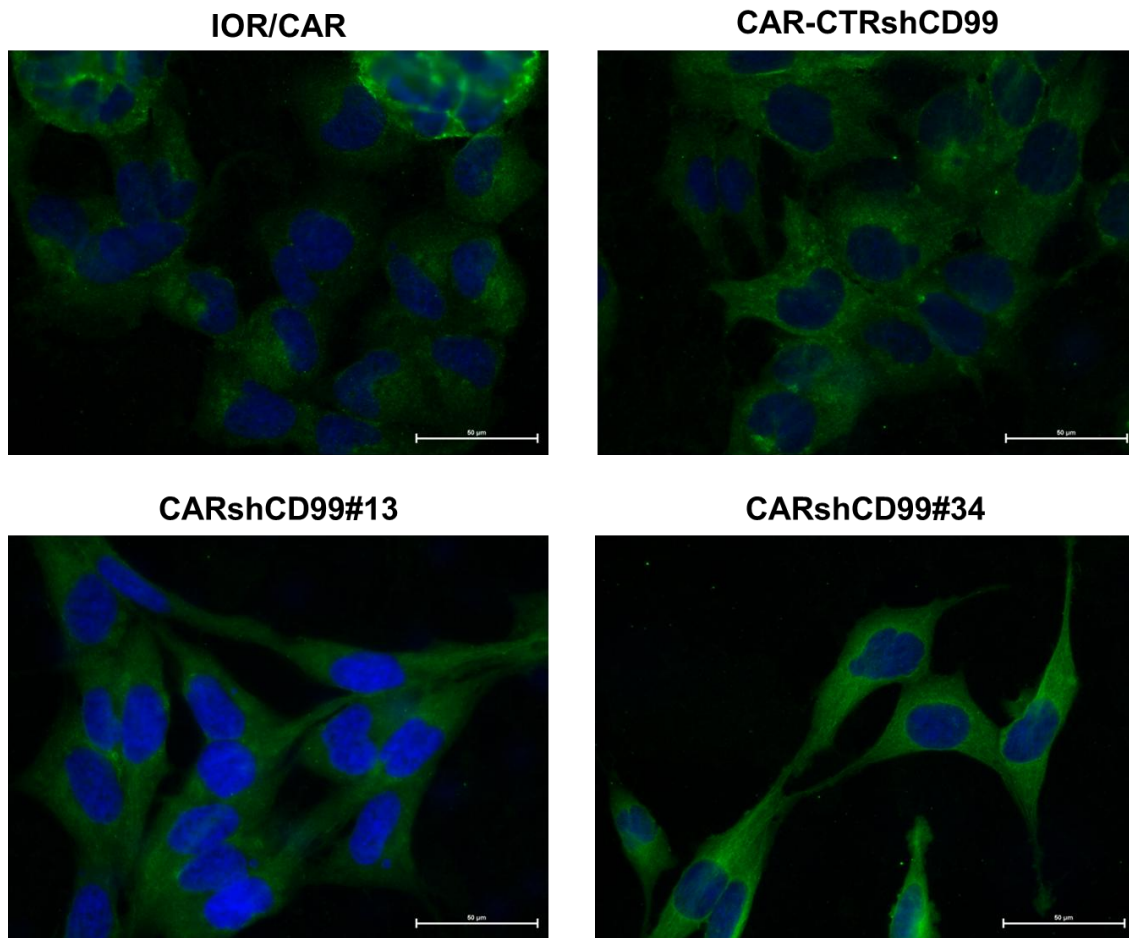
Linea	Densità di saturazione cellule/cm <sup>2</sup>
IOR/CAR	1473750
CAR-CTRshCD99	945000
CARshCD99#13	965000
CARshCD99#34	1030000

**Figura 14:** Curve di crescita in monostrato dei trasfettanti CARshCD99 a partire da una semina di 500000 cellule e tabella delle densità di saturazione a 264h.



**Figura 15:** Crescita in *soft-agar* delle cellule parentali IOR/CAR e dei cloni CARshCD99. Le immagini al microscopio della crescita clonale in terreno semisolido fanno riferimento a colonie contate 14 giorni dalla semina di 3300 cellule in piastre 60 mm di diametro.

Nonostante i cloni CARshCD99 non mostrino differenze rispetto alla linea parentale in termini di malignità mostrano differenze fenotipiche, sono morfologicamente più grandi e mostrano prolungamenti del corpo cellulare già in condizioni basali. Esperimenti di immunofluorescenza hanno infatti mostrato come i cloni CARshCD99 esprimano  $\beta$ III-tubulina, marker di differenziamento neurale, espresso anche dai cloni TCshCD99 (Figura 16).

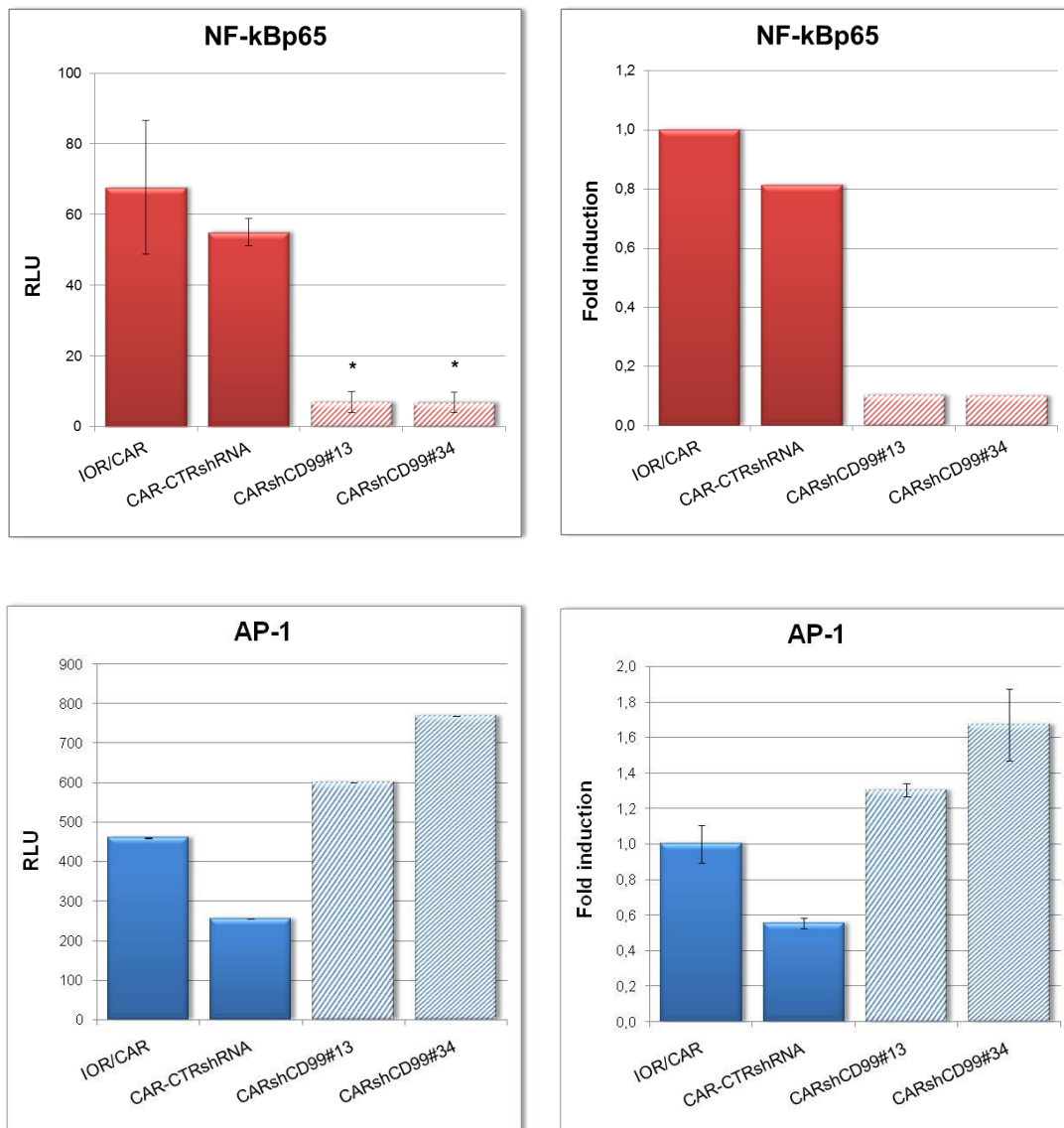


**Figura 16:** Immunofluorescenza della  $\beta$ -III tubulina su cellule in aderenza. La marcatura è avvenuta con un anticorpo monoclonale anti  $\beta$ -III tubulina e rivelata attraverso una IgM anti-mouse FITC-coniugata. Immagini ottenute con microscopio a fluorescenza, obiettivo 40X.

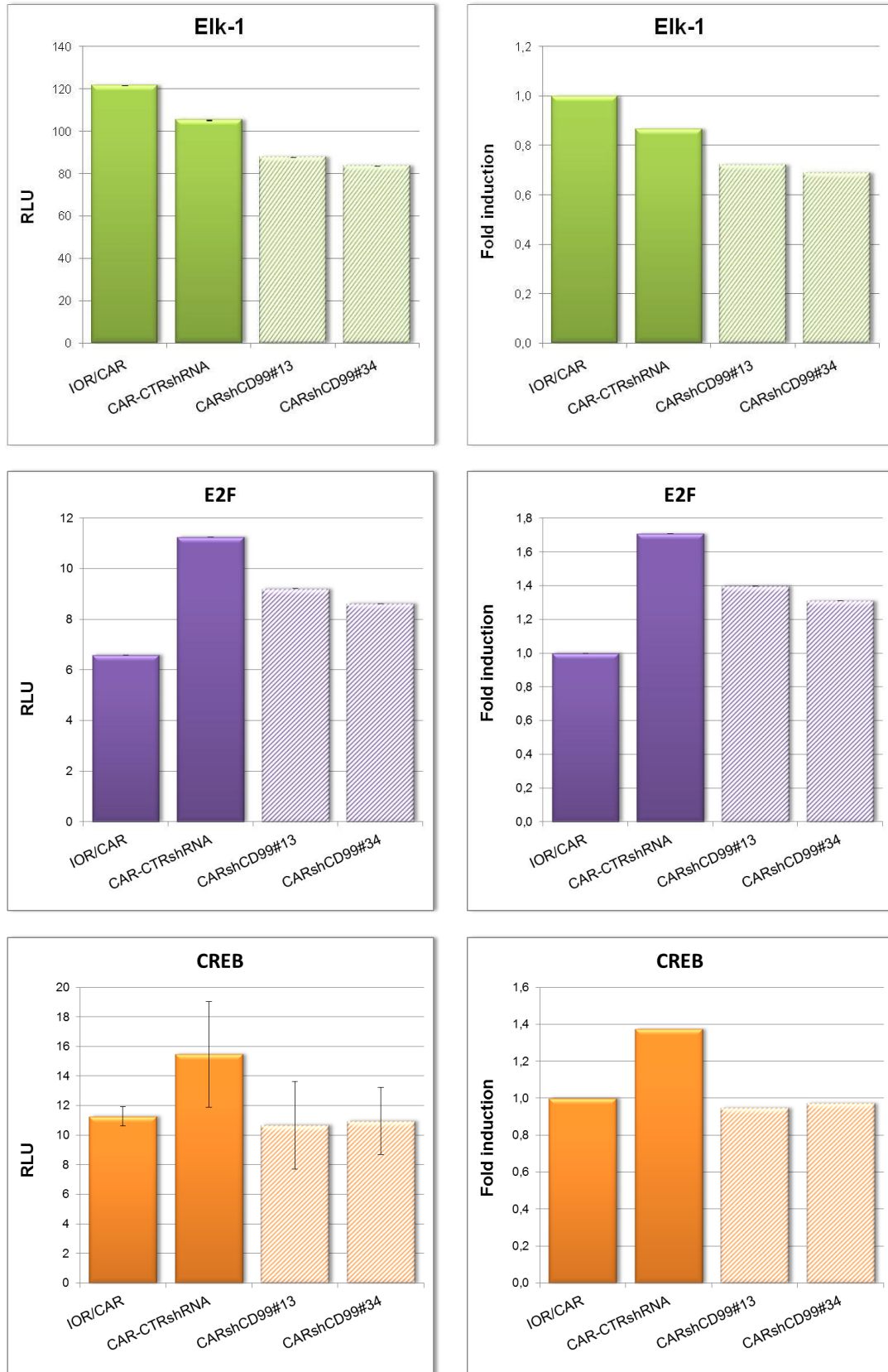
I dati ottenuti *in vitro* sui trasfettanti della linea di ES IOR/CAR, confermano in parte, quanto precedentemente osservato su un'altra linea tumorale, il TC-71. Dal confronto dei due modelli sperimentali si può osservare come il silenziamento del CD99 moduli due processi fondamentali nella tumorigenesi del sarcoma di Ewing: la proliferazione, anche in condizioni di ancoraggio indipendenza, test che correla con la malignità, e il differenziamento. Esistono però differenze in diversi contesti cellulari e per capire se queste potessero dipendere da un coinvolgimento di fattori trascrizionali, si è proceduto a valutare l'attività trascrizionale di NF-kBp65, AP-1, Elk-1, E2F e CREB anche nelle cellule *knockdown* per CD99 derivanti dalla linea cellulare IOR/CAR.

## 4. FATTORI TRASCRIZIONALI NEL MODELLO CAR-CD99shRNA

Abbiamo valutato nel modello sperimentale IOR/CAR CD99shRNA l'attività dei fattori trascrizionali NF-kBp65, AP-1, Elk-1, E2F e CREB testati precedentemente per il TC-71 (Figura 17).







**Figura 17:** Attività trascrizionale di NF-kBp65, AP-1, Elk-1, E2F e CREB nel modello sperimentale IOR/CAR CD99-shRNA. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e i grafici riportano i valori di almeno due esperimenti indipendenti (Media  $\pm$  ES, \* indica un valore di  $P < 0.05$ , test del t-Student rispetto alla linea parentale IOR/CAR).

L'analisi di questi fattori trascrizionali ha evidenziato una forte e statisticamente significativa *down*-regolazione di NF-kBp65, una leggera *down*-regolazione di CREB e Elk-1, un aumento dell'attività trascrizionale di AP-1 e nessuna variazione per E2F dei cloni CD99 *knockdown* rispetto alla linea parentale IOR/CAR.

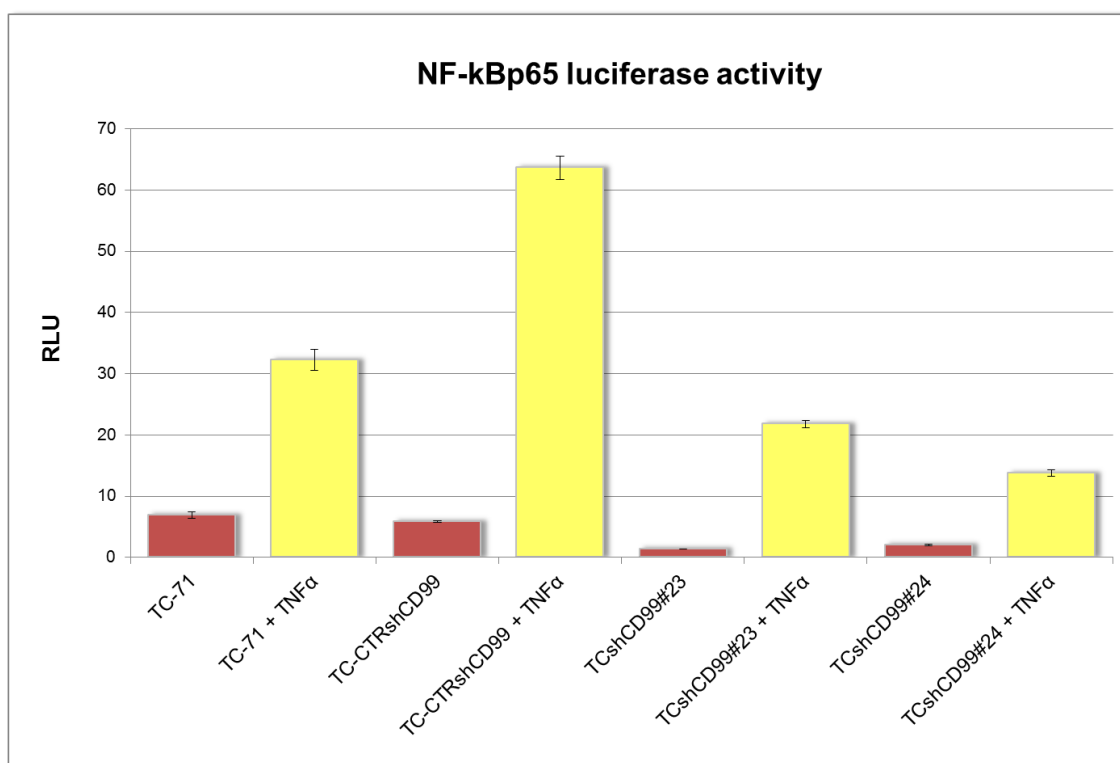
In conclusione, in entrambi i modelli sperimentali analizzati, NF-kBp65 è significativamente *down*-regolato in cellule di sarcoma di Ewing silenziate per CD99. La nostra attenzione si è quindi rivolta verso questo importante fattore trascrizionale, implicato non solo nei processi infiammatori e apoptotici ma anche nei processi differenziativi. Sia nel modello TC-71shCD99, sia nel modello IOR/CARshCD99 il fenotipo comune è rappresentato da cellule più differenziate in senso neurale.

Poiché in letteratura sono presenti sempre più studi che mostrano il coinvolgimento di NF-kB nella regolazione di diversi aspetti del differenziamento neurale quali: la regolazione della neurogenesi in embrioni e adulti (Young K.M. et al. *J. Neurosci. Res* 2006; Koo J.W. et al. *Proc. Natl.Acad. Sci U.S.A*, 2010), la regolazione dei processi di sopravvivenza di popolazioni di neuroni periferici e centrali (Memet S. *Biochem Pharmacol*, 2006; Li Q. et al. *Genes Dev*, 2000) e l'induzione di processi di maturazione nervosa come la mielinizzazione dei nervi periferici (Nickols J.C. et al. *Nat Neurosci*, 2003; Limpert A.S. and Carter B.D. *J.Biol.Chem*, 2010); si è proceduto a caratterizzare meglio questa possibile associazione.

## 5. SILENZIAMENTO DI CD99 E NF-kBp65

I dati precedentemente ottenuti attraverso esperimenti di luciferasi reporter assay sui trasfettanti delle linee di ES TC-71 e IOR/CAR mostrano un significativo coinvolgimento del fattore trascrizionale NF-kBp65 in seguito al silenziamento della proteina CD99.

Allo scopo di valutare la relazione tra NF-kBp65 e la proteina CD99 abbiamo valutato nel sistema TCshCD99 l'effetto della citochina TNF $\alpha$ , noto induttore di NF-kB. Dopo aver trattato le cellule con TNF $\alpha$  1ng/ml per 4h assistiamo a una generale attivazione di NF-kBp65, anche se i trasfettanti shCD99 continuano a mostrare una minore attività trascrizionale rispetto alla linea parentale (Figura 18). Questo dato va a conferma dell'ipotesi che esista un'associazione tra NF-kBp65 e la glicoproteina CD99.



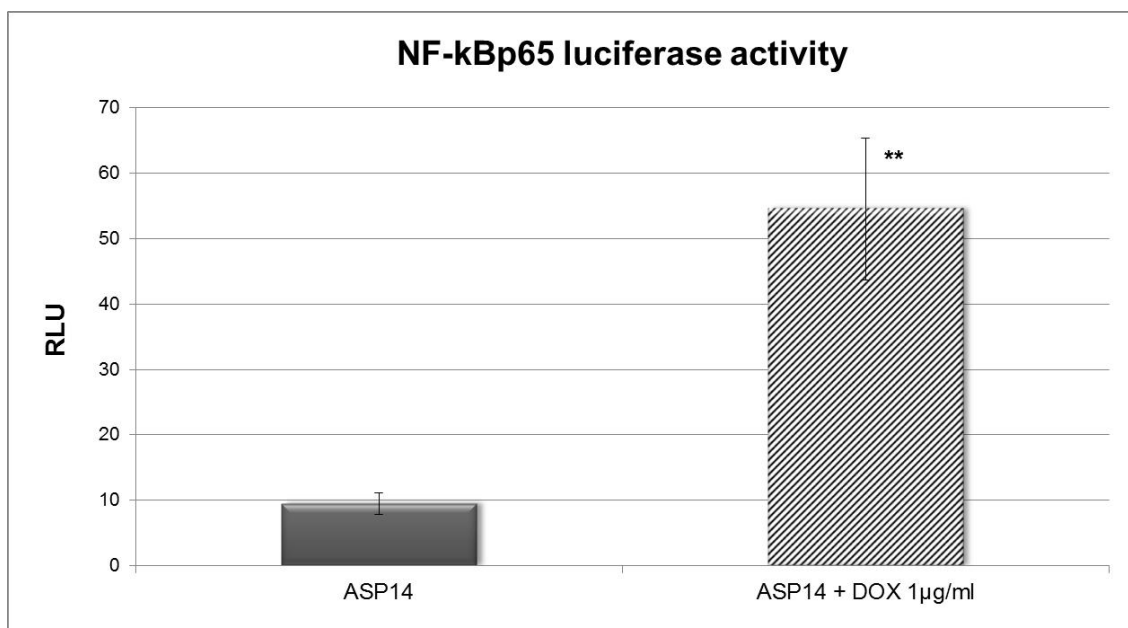
**Figura 18:** Attività trascrizionale di NF-kBp65 nel pannello TC-shCD99 dopo trattamento con TNF $\alpha$  1ng/ml per 4h. L'esperimento è stato condotto in triplicato e il grafico indica Media  $\pm$  ES.

## 6. SILENZIAMENTO DI EWS-FLI1 E NF-kBp65

Successivamente, con l'intento di valutare se nel legame funzionale tra NF-kBp65 e CD99 fosse anche coinvolta la proteina di fusione aberrante EWS-FLI1 abbiamo introdotto un terzo modello: la linea cellulare ASP14 (Gentilmente concessa dal Prof. Heinrich Kovar, Vienna).

Questo modello sperimentale è stato generato trasfettando stabilmente la linea cellulare di ES A674 con un sistema doxyciclina (DOX) inducibile codificante uno short hairpin RNA per silenziare EWS-FLI1. Abbiamo quindi condotto esperimenti di gene reporter assay, per il fattore trascrizionale NF-kBp65, effettuando trattamenti con doxyciclina 1µg/ml per 72h per silenziare EWS-FLI1 nella linea ASP14.

In condizioni basali, l'attività trascrizionale di NF-kBp65 è ridotta dalla presenza dell'oncogene EWS-FLI1 poiché si assiste a un abbondante aumento di NF-kBp65, da 9 a 54 RLU, quando EWS-FLI1 viene silenziato (Figura 19).

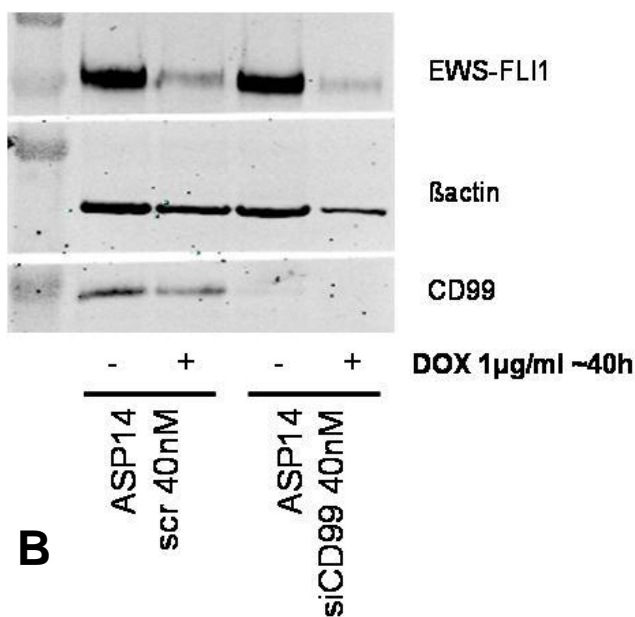
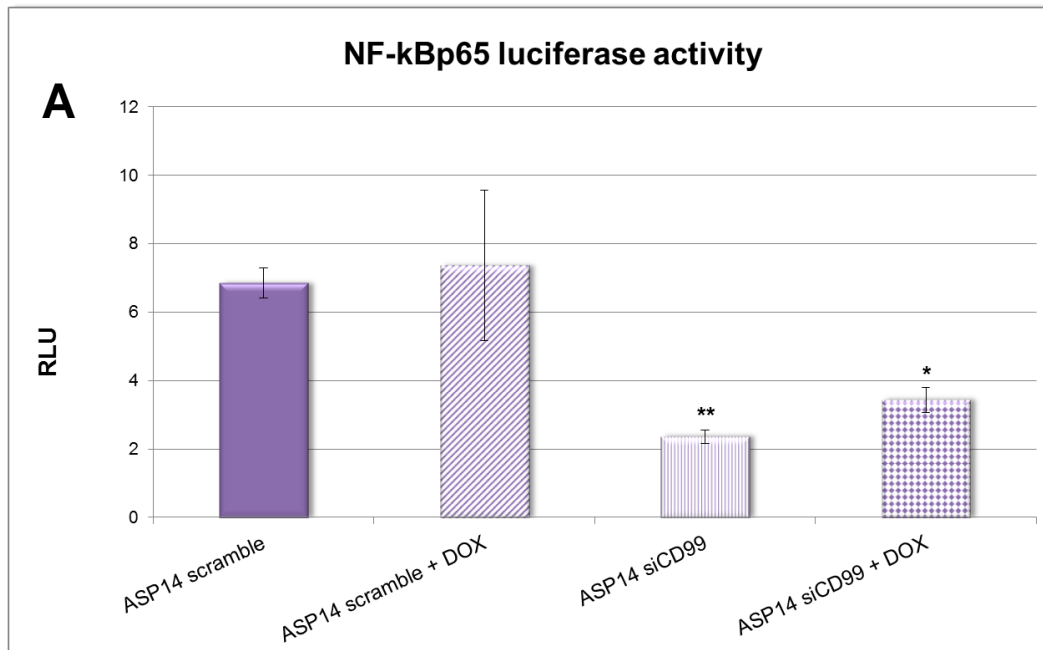


**Figura 19:** Attività trascrizionale di NF-kBp65 nella linea cellulare ASP14. Il silenziamento di EWS-FLI1 è ottenuto attraverso trattamento con doxyciclina 1µg/ml per 72h. L'esperimento è stato condotto in triplicato e i grafici riportano i valori di almeno tre esperimenti indipendenti (Media ± ES, \*\* indica un valore di  $P < 0.01$ , test del t-Student).

## 7. CD99 E EWS-FLI1 NELLA MODULAZIONE DELL'ATTIVITÀ TRASCRIZIONALE DI NF-kBp65

Considerate le precedenti evidenze sperimentali, per cercare di comprendere quale fosse l'interplay funzionale di CD99 e EWS-FLI1 nella modulazione dell'attività trascrizionale di NF-kBp65, è stato valutato il contemporaneo *knockdown* delle due proteine in due modelli cellulari: ASP14 e cellule TC-shCD99.

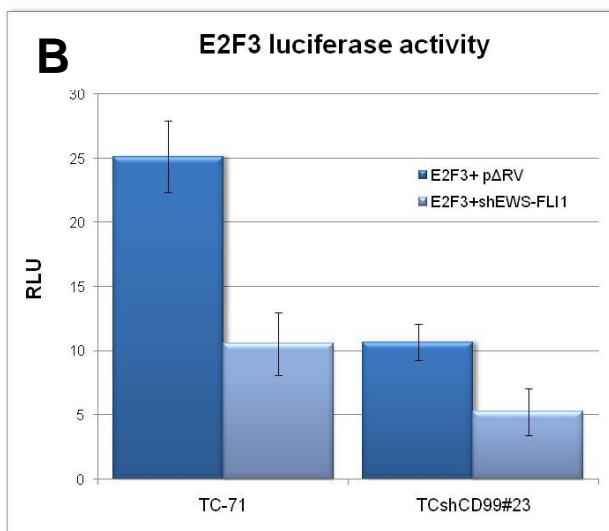
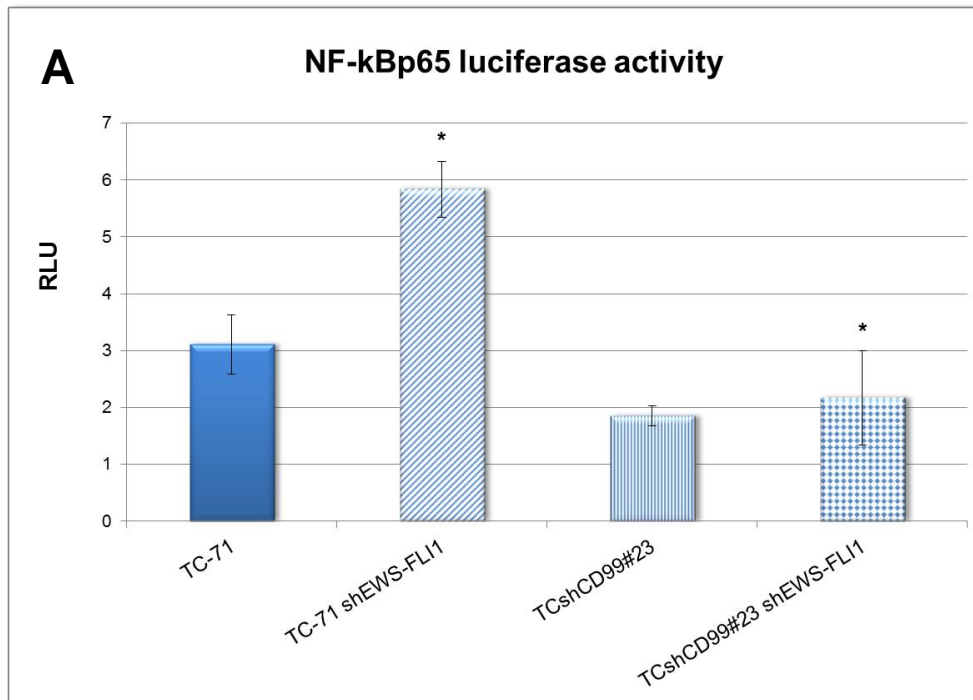
Ci siamo chiesti se il silenziamento di EWS-FLI1 in cellule CD99 *knockdown* potesse in qualche modo ripristinare l'attività trascrizionale di NF-kBp65. Il primo modello preso in esame ha previsto l'uso della linea ASP14. Il silenziamento di EWS-FLI1 è stato ottenuto come precedentemente descritto, attraverso il trattamento con doxyciclina 1µg/ml per 48h mentre il silenziamento del CD99 è stato ottenuto attraverso l'uso di un siRNA alla concentrazione di 40nM. Dal saggio di transattivazione è emerso come l'incremento dell'attività trascrizionale di NF-kBp65 indotto dal *knockdown* di EWS-FLI1 è inibito in assenza di CD99 (Figura 20).



**Figura 20**

**A:** Attività trascrizionale di NF-kBp65 nella linea cellulare ASP14. Il silenziamento di EWS-FLI1 è ottenuto attraverso trattamento con doxyciclina 1µg/ml, mentre il silenziamento di CD99 è ottenuto attraverso l'uso di un siRNA a 40nM. L'esperimento è stato condotto in triplicato e i grafici riportano i valori di almeno due esperimenti indipendenti (Media ± ES, \*\* indica un valore di P<0.01, \* indica un valore di P<0.05, test del t-Student). **B:** I silenziamenti di EWS-FLI1 e CD99 del punto A, sono stati controllati attraverso western blotting.

L'altro approccio ha visto l'analisi dell'attività trascrizionale di NF-kBp65 nella linea parentale TC-71 e trasfettante TCshCD99#23 dopo silenziamento in transiente di EWS-FLI1 con l'utilizzo di un plasmide shRNA. Come mostrato in Figura 21, il *knockdown* di EWS-FLI1 nella linea parentale TC-71 induce l'*up*-regolazione di NF-kBp65. Al contrario, nel clone TCshCD99#23 non assistiamo a nessuna variazione dell'attività trascrizionale di NF-kBp65 dopo silenziamento di EWS-FLI1.

**Figura 21**

**A:** Attività trascrizionale di NF-kBp65 nella linea cellulare TC-71 e trasfettante TCshCD99#23 in presenza e assenza di EWS-FLI1. Il silenziamento di EWS-FLI1 è ottenuto attraverso trasfezione in transiente del plasmide shRNA EWS-FLI1. L'esperimento è stato condotto in triplicato e il grafico riporta i valori di tre esperimenti indipendenti (Media  $\pm$  ES, \* indica un valore di  $P < 0.05$ , test del t-Student).

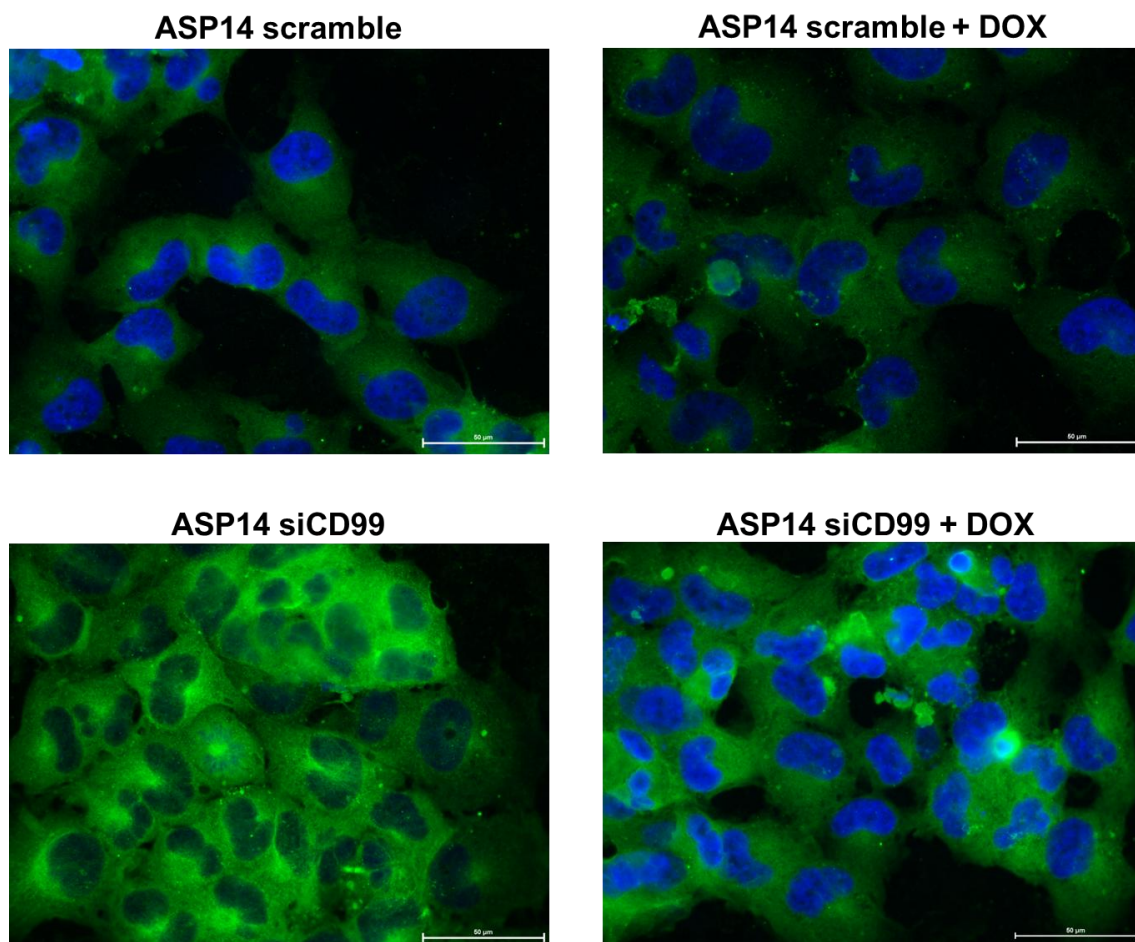
**B:** E2F3, target *downstream* di EWS-FLI1 è stato usato come controllo del silenziamento di EWS-FLI1 dell'esperimento riportato nel punto A.

Da questi esperimenti si evince che il silenziamento, stabile e transiente, di EWS-FLI1 *up*-regola l'attività trascrizionale di NF-kBp65 solo in presenza di CD99. Infatti, il silenziamento di CD99 riduce l'attività di NF-kBp65 indipendentemente dalla presenza o assenza di EWS-FLI1. Appare quindi sempre più evidente come il CD99 moduli l'attività trascrizionale di NF-kBp65 e il suo effetto sia dominante rispetto EWS-FLI1.

Poiché il silenziamento di CD99 induce differenziamento neurale nelle linee cellulari di Ewing: TC-71 e IOR/CAR, abbiamo investigato il ruolo di NF-kBp65 nei processi di differenziamento neurale.

## 8. CD99 E EWS-FLI1 NELLA MODULAZIONE DELL'ATTIVITÀ TRASCRIZIONALE DI NF-kBp65 E DEL DIFFERENZIAMENTO NEURALE

La variazione dell'attività trascrizionale di NF-kBp65 modulata da CD99 e EWS-FLI1 in cellule di sarcoma di Ewing si esplica in una induzione del differenziamento neurale come evidenziato dall'espressione della  $\beta$ III-tubulina nella linea cellulare ASP14. (Figura 22).



**Figura 22:** Immunofluorescenza della  $\beta$ -III-tubulina su cellule in aderenza silenziate per CD99 e per EWS-FLI1. La marcatura è avvenuta con un anticorpo monoclonale anti  $\beta$ -III-tubulina e rivelata attraverso una IgM anti-*mouse* FITC-coniugata. Immagini ottenute con microscopio a fluorescenza, obiettivo 40X.



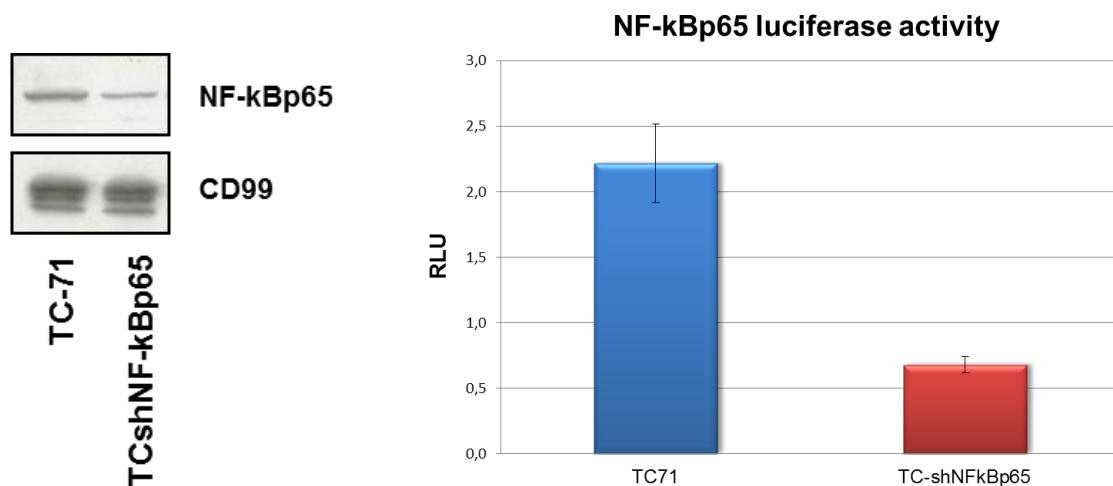
Dopo il silenziamento di CD99, le cellule mostrano come atteso, un aumento del differenziamento neurale rispetto alle condizioni basali (ASP14 scramble). Le cellule silenziate solo per EWS-FLI1 (ASP14 DOX) risultano negative per il marker di differenziamento e mantengono quindi il fenotipo indifferenziato; mentre il concomitante *knockdown* di CD99 e EWS-FLI1 mantiene le cellule in un fenotipo differenziato.

Questi risultati stanno ad indicare che il differenziamento neurale nelle cellule silenziate per CD99 non dipende da EWS-FLI1 ma piuttosto da NF-kBp65.

Per confermare il ruolo dominante di NF-kB nel processo differenziativo abbiamo modulato NF-kBp65, attraverso l'uso di plasmidi per l'overespressione e plasmidi shRNA per il silenziamento e abbiamo valutato gli effetti fenotipici attraverso l'analisi del marcatore di differenziamento neurale  $\beta$ III-tubulina con tecniche di immunofluorescenza.

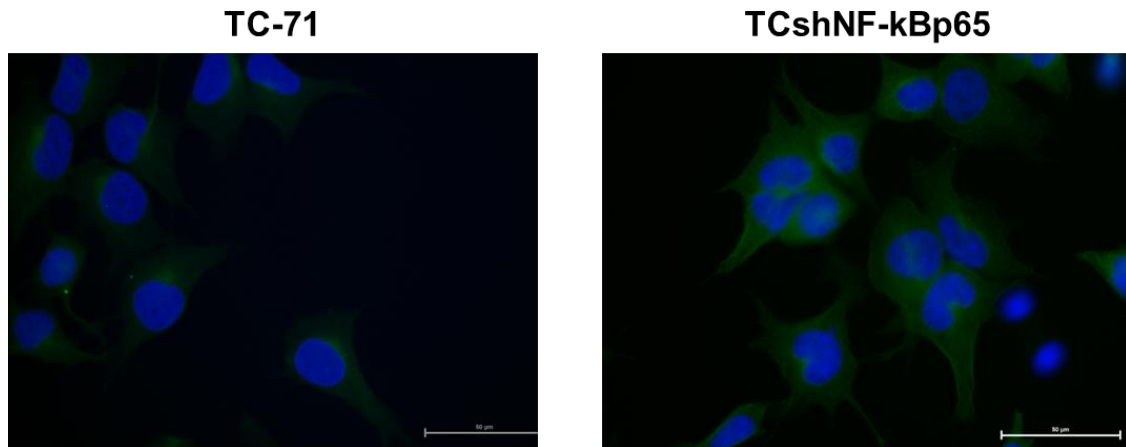
## 9. SILENZIAMENTO E OVERESPRESSIONE DI NF-kBp65 E DIFFERENZIAMENTO NEURALE

Grazie alla tecnica del Calcio-Fosfato abbiamo trasfettato stabilmente la linea cellulare TC-71 con un plasmide contenente il gene di resistenza alla puromicina e la sequenza short hairpin specifica per la subunità p65 di NF-kB. Abbiamo selezionato il pool di cellule silenziate e abbiamo valutato l'efficienza del silenziamento con western blotting e gene reporter assay (Figura 23). La linea cellulare TCshNF-kBp65 mostra una buona riduzione di NF-kBp65 sia in proteina sia dell'attività trascrizionale.



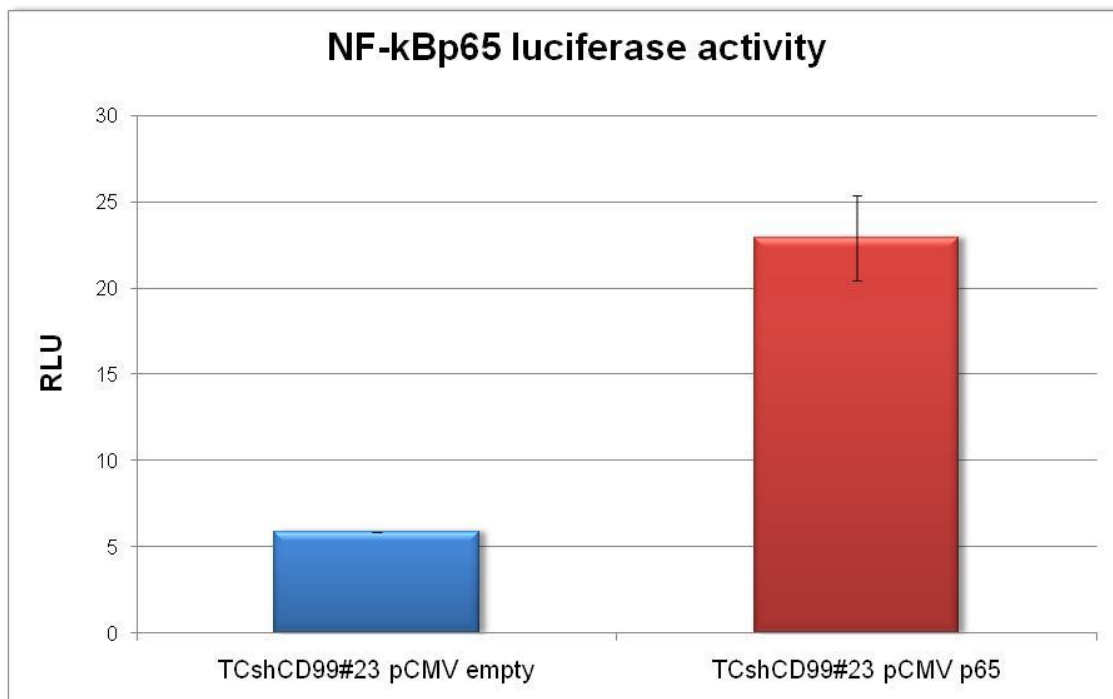
**Figura 23:** Analisi del silenziamento di NF-kBp65 nella linea TC-71 in western blotting e luciferase reporter assay.

Successivamente sul pool di cellule stabilmente silenziate per NF-kBp65 abbiamo valutato il differenziamento neurale attraverso l'analisi in immunofluorescenza della  $\beta$ III-tubulina. Il silenziamento di NF-kBp65 in cellule di sarcoma di Ewing, induce l'aumento dell'espressione di  $\beta$ III-tubulina (Figura 24).

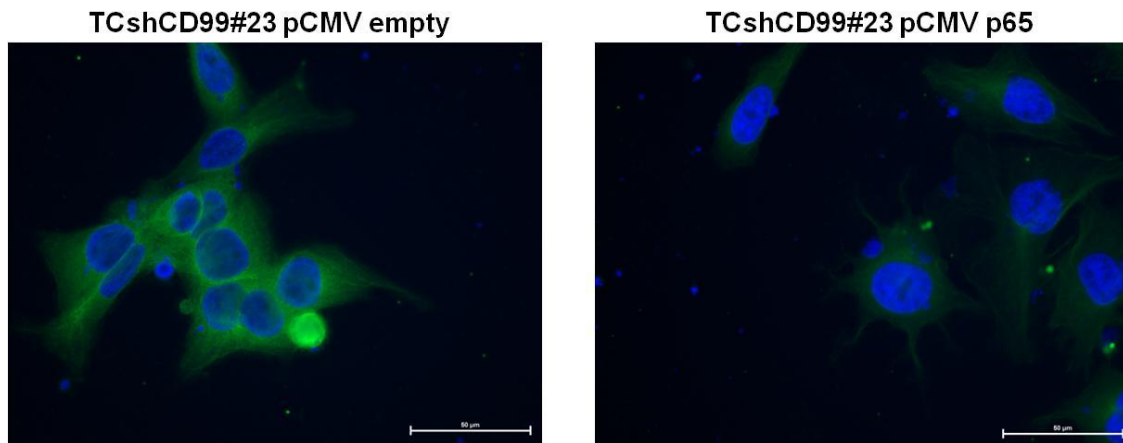


**Figura 24:** Analisi in immunofluorescenza di  $\beta$ -III tubulina su cellule in aderenza di TC-71 silenziate per NF-kBp65. La marcatura è avvenuta con un anticorpo monoclonale anti  $\beta$ -III tubulina e rivelata attraverso una IgM anti-*mouse* FITC-coniugata. Immagini ottenute con microscopio a fluorescenza, obiettivo 40X.

Allo scopo di confermare ulteriormente la relazione tra NF-kBp65, il CD99 e il differenziamento neurale abbiamo over-espresso il fattore trascrizionale NF-kBp65 nella linea TCshCD99#23 attraverso il plasmide pCMVp65 (Figura 25).



**Figura 25:** Attività trascrizionale di NF-kBp65 nelle cellule TCshCD99#23 trasfettate in transiente con il plasmide per overesprimere NF-kBp65 (pCMVp65) e il vettore vuoto di controllo (pCMV empty).



**Figura 26:** Valutazione mediante immunofluorescenza dell'espressione della  $\beta$ -III tubulina su cellule in aderenza di TCshCD99#23 trasfettate con il plasmide per overesprimere NF-kBp65 (pCMVp65) e il vettore vuoto (pCMV empty). La marcatura è avvenuta con un anticorpo monoclonale anti  $\beta$ -III tubulina e rivelata attraverso una IgM anti-*mouse* FITC-coniugata. Immagini ottenute con microscopio a fluorescenza, obiettivo 40X.

Come mostrato in Figura 26, le cellule che over-esprimono NF-kBp65, anche se in assenza di CD99, perdono il fenotipo differenziato esprimendo meno  $\beta$ III-tubulina, indicando perciò il ruolo dominante del CD99 e come l'effetto pro-differenziativo dato dal silenziamento del CD99 sia mediato da NF-kBp65.

## DISCUSSIONE

Il sarcoma di Ewing può essere reputato come il prototipo dei sarcomi: è caratterizzato da un cariotipo simil diploide, con un singolo evento genetico (riarrangiamento del gene EWSR1 con un gene membro della famiglia dei fattori di trascrizione ETS, più frequentemente FLI1), che porta alla formazione di un prodotto di fusione aberrante che agisce come “*driver*” di trasformazione. Tuttavia, è diventato chiaro negli ultimi anni, che EWS-FLI1 non descrive per intero tutta la patogenesi del sarcoma di Ewing e che lo studio delle vie parallele e a valle è necessario per una piena comprensione dell’oncogenesi in questo tumore. Infatti, senza la presenza della via di segnalazione di IGF-IR e/o della molecola CD99, il prodotto di fusione EWS-FLI1 non è in grado di trasformare le cellule (Toretzky JA et al. *J Biol Chem*, 1997; Rocchi A et al. *J Clin Inves*, 2010). EWS-FLI1 induce in diversi tipi cellulari un’elevata espressione di CD99 (Miyagawa Y et al. *Mol Cell Biol*, 2008; Lessnick SL et al. *Cancer Cell*, 2002; Hu-Lieskovan S et al. *Cancer Res*, 2005), una glicoproteina di membrana che è implicata in fenomeni di adesione cellulare, apoptosi, differenziamento delle cellule T e timociti (Bernard G et al. *J Immunol*, 1995; Bernard G et al. *J Immunol*, 1997; Alberti I et al. *FASEB J*, 2002), migrazione di monociti (Schenkel AR et al. *Nat Immunol*, 2002) e adesione intercellulare tra linfociti e cellule endoteliali (Bernard G et al. *Eur J Immunol*, 2000).

In condizioni patologiche, l’attivazione del CD99 in seguito a legame con MAb agonisti anti-CD99, induce processi di aggregazione omotipica e apoptosi massiva delle cellule di Ewing (Sohn HW et al. *Am J Pathol*, 1998; Scotlandi K et al. *Cancer Res*, 2000; Cerisano V et al. *Oncogene*, 2004). L’espressione abbondante di CD99 sulla superficie delle cellule di Ewing lo rendono un ottimo marker per la diagnosi differenziale di questa neoplasia (Ambros IM et al. *Cancer (Phila.)*, 1991; Kovar H et al. *Oncogene*, 1990). Inoltre, è stato dimostrato che il CD99 contribuisce alla malignità del tumore reprimendo il differenziamento neurale (Rocchi A et al. *J Clin Inves*, 2010). Le cellule di Ewing deprivate della molecola CD99 mostrano una reversione della malignità con una minore crescita della massa tumorale e una ridotta insorgenza di metastasi e appaiono

terminalmente differenziate verso il fenotipo neurale. E' stata inoltre dimostrata una modulazione della pathway di MAPK, con un'abbondante e persistente localizzazione nucleare di ERK1/2 nelle cellule silenziate per il CD99.

L'attivazione del pathway Ras/MAPK è ben documentata nei processi di differenziamento e sopravvivenza (Yang H et al. *J Biol Chem*, 2008; Sweatt JD *Curr Opin Neurobiol*, 2004; Subramaniam S and Unsicker K *Neuroscience*, 2006; Grewal SS et al. *Curr Opin Neurobiol*, 1999; Fukunaga K and Miyamoto E *Mol Neurobiol*, 1998). Stimoli extracellulari in grado di attivare Ras portano ad una cascata di segnale che attraverso Raf si estende su tutto il pathway di MAPK fino all'attivazione di ERK1/2. MAPK può agire come modulatore trascrizionale attraverso l'interazione diretta e indiretta con molteplici fattori trascrizionali.

Variazioni del microambiente nucleare e dell'attività dei fattori trascrizionali sembrano essere cruciali nel passaggio dai messaggi proliferativi a quelli differenziativi. Una migliore comprensione dei processi di auto-rinnovamento (*self-renewal*) e differenziamento *lineage-specific* delle cellule di sarcoma di Ewing è quindi obbligatoria per la progettazione di una terapia differenziativa nei sarcomi. Tuttavia, la complessità di questo processo rende difficile l'impiego di farmaci mirati contro specifiche molecole coinvolte nel differenziamento.

Partendo dalle evidenze di Rocchi e collaboratori, che suggeriscono come il CD99 giochi un ruolo fondamentale nel fenotipo oncogenico del sarcoma di Ewing e ne blocchi il differenziamento terminale attraverso la modulazione di MAPK siamo andati ad indagare quali fattori trascrizionali potessero essere coinvolti in questo processo.

Per studiare questi aspetti siamo partiti dallo stesso modello sperimentale creato precedentemente in questo laboratorio e utilizzato nel lavoro di Rocchi e collaboratori e abbiamo esteso le analisi in un altro modello cellulare. Attraverso l'uso del gene reporter luciferasi, sono state analizzate le attività trascrizionali di diversi fattori trascrizionali implicati nel pathway di MAPK.

L'assenza dell'antigene CD99 non induce alcuna modulazione significativa dei fattori Elk-1, E2F1 e CREB, mentre è osservato un aumento dell'attività trascrizionale di AP-1 e una diminuzione dell'attività trascrizionale della subunità p65 di NF-kB.

In letteratura, Elk-1, CREB e E2F sono descritti come fattori trascrizionali a valle di ERK, JNK e p38 generalmente associati a eventi proliferativi (Gille H et al. *Nature* 1992;. Marais R et al. *Cell*, 1993; Janknecht R et al. *EMBO J*, 1993; Hazzalin CA and Mahadevan LC *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002; Tan Y et al. *EMBO J*, 1996; Wang S et al. *EMBO J*, 1999). Nel nostro modello, si conferma che l'induzione del pathway di MAPK, dovuta al silenziamento di CD99 correla con i processi di differenziamento e spiega quindi la mancanza di modulazione di questi fattori trascrizionali.

Il fattore trascrizionale AP-1, che può essere attivato non solo da ERK, ma anche da altri membri di MAPK, come JNK e p38, e altri fattori trascrizionali come SMAD, è riportato partecipare ai processi proliferativi e differenziativi in diversi contesti, normali e patologici. In letteratura viene descritta la sua funzionalità nel differenziamento neurale di cellule stromali di midollo osseo murine, attraverso la cascata di segnale MAPK/ERK1/2.

L'aumento trascrizionale di AP-1 osservato nei trasfettanti shCD99, suggerirebbe un coinvolgimento di AP-1 nel differenziamento neurale di queste cellule. Ciò nonostante, esperimenti volti a silenziare ERK attraverso l'utilizzo dell'inibitore specifico PD98059, mostrano che l'*up*-regolazione di AP-1 osservata non è strettamente correlata a ERK.

In assenza di CD99 per quanto concerne l'attività trascrizionale della subunità p65 di NF-kB si è invece osservata una *down*-modulazione statisticamente significativa. In letteratura, la funzionalità di NF-kB è apparentemente contraddittoria, viene descritto sia come promotore tumorale attivando diversi geni anti-apoptotici (Kucharczak J et al. *Oncogene*, 2003) e inducendo proto-oncogeni (Perkins ND *Trends Cell Biol*, 2004), sia come fattore oncosoppressivo aumentando i processi apoptotici mediati da p53 (Ryan KM et al. *Nature*, 2000) in base al contesto cellulare analizzato.

Al sistema sperimentale TCshCD99 si è poi affiancato un secondo modello di confronto, nel quale è stata silenziata la proteina CD99 nella linea cellulare di ES IOR/CAR. I dati ottenuti *in vitro* sulla malignità non hanno pienamente confermato i dati ottenuti precedentemente nel TC-71, mentre i dati *in vitro* ottenuti sul differenziamento, confermano quanto osservato precedentemente. Benché il CD99 moduli due processi fondamentali nella tumorigenesi del sarcoma di Ewing, quali malignità e differenziamento, il suo effetto può subire variazioni in diversi contesti cellulari.

Partendo dall'osservazione di un fenotipo differenziato comune nei due modelli, abbiamo proceduto alla valutazione dei fattori trascrizionali precedentemente studiati.

Per i fattori trascrizionali Elk-1, E2F e CREB non sono state osservate modulazioni tra la linea parentale e i trasfettanti silenziati per il CD99, a conferma che queste tre proteine risultano svincolate dai processi di differenziamento neurale mediati da MAPK in questo contesto biologico.

L'attività trascrizionale di AP-1 risulta *up*-regolata in assenza di CD99 ma in maniera ridotta a quanto accade nei trasfettanti TC-71. In letteratura è riportato che il fattore AP-1 può indurre l'espressione dell'inibitore del ciclo cellulare p21<sup>Waf1/Cip1</sup> e questo fornirebbe una spiegazione al perché, nonostante l'efficiente silenziamento del CD99 in IOR/CAR, non si assiste a una diminuzione della malignità, in termini di crescita in monostrato e crescita in assenza di ancoraggio. Per contro, nelle cellule TCshCD99 l'attività di AP-1 è molto più elevata rispetto alla linea parentale, dato che rispecchia la diminuzione delle malignità *in vitro*, con un blocco del ciclo cellulare in fase G<sub>2</sub>/M, una diminuzione della crescita in *soft-agar* e della capacità migratoria (Rocchi A et al. *J Clin Inves*, 2010).

Dato confermato in entrambe i modelli è la *down*-regolazione statisticamente significativa di NF-kBp65.

A conclusione di questa prima parte, per entrambi i modelli studiati si confermano significative le modulazioni di AP-1 e NF-kBp65, tra i fattori trascrizionali analizzati.

Vista la forte entità del fenomeno che coinvolge l'attività di NF-kBp65 in assenza di CD99, e il ruolo descritto in letteratura nella regolazione dei processi di sviluppo e differenziamento del sistema nervoso (Memet S *Biochem Pharmacol*, 2006; Kaltschmidt B and Kaltschmidt C *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009; Simpson CS and Morris BJ *J Biol Chem*, 2000) mediata anche dal pathway di MAPK (Vermeulen L et al. *EMBO J*, 2003); abbiamo proceduto allo studio di questo importante fattore trascrizionale più nel dettaglio.

In assenza di CD99, l'induzione di NF-kB, attraverso trattamento con la citochina TNF $\alpha$ , rimane minore rispetto alla linea parentale, confermando un'associazione tra CD99 e NF-kB. Questa associazione però non può essere diretta, in quanto la proteina CD99 non possedendo domini transattivanti esplica le sue funzioni indirettamente attraverso altri pathway di segnalazione, agendo attraverso effettori diversi, cellula-specifici. Per



contro, sappiamo che le cellule di Ewing sono caratterizzate specificamente dal prodotto di fusione EWS-FLI1, che agisce in qualità di fattore trascrizionale aberrante e che è stato riportato avere un'azione pro-differenziativa.

Abbiamo quindi analizzato l'effetto di EWS-FLI1 sull'attività trascrizionale di NF- $\kappa$ B. Da questi esperimenti, si è osservato che la presenza di EWS-FLI1 mantiene bassi i livelli trascrizionali di NF- $\kappa$ B, mentre l'assenza, in seguito a silenziamento, ne aumenta significativamente di oltre 5 volte l'attività. Per contro, il CD99 preserva l'attività trascrizionale di NF- $\kappa$ B. Se da un lato EWS-FLI1 contribuisce a inibire l'attività di NF- $\kappa$ B, dall'altro il CD99 ne contrasta lo spegnimento e contribuisce a mantenere NF- $\kappa$ B attivo e domandandoci quale fosse l'*interplay* funzionale di CD99 e EWS-FLI1 nella regolazione di NF- $\kappa$ Bp65 abbiamo silenziato contemporaneamente le due proteine.

Il silenziamento di EWS-FLI1 aumenta l'attività trascrizionale di NF- $\kappa$ Bp65 solo in presenza di CD99. Infatti, il silenziamento di CD99 riduce l'attività di NF- $\kappa$ Bp65 indipendentemente dalla presenza o assenza di EWS-FLI1. Appare quindi evidente come il CD99 moduli l'attività trascrizionale di NF- $\kappa$ Bp65, e il suo effetto sia dominante rispetto a EWS-FLI1.

Inoltre, il differenziamento neurale osservato nelle cellule CD99 *knockdown* non dipende da EWS-FLI1 ma piuttosto da NF- $\kappa$ B, evidenza confermata attraverso l'*over*-espressione di NF- $\kappa$ Bp65 in cellule silenziate per CD99. Queste cellule perdono infatti la loro capacità differenziativa e mostrano un fenotipo simile alla classica cellula di Ewing.

La modulazione di NF- $\kappa$ Bp65, nel nostro modello, non si può attribuire a variazioni nella regolazione della trascrizione genica, in quanto i livelli di RNA e proteina non cambiano in presenza o assenza di CD99. Ciò nonostante, NF- $\kappa$ Bp65 può subire diverse modificazioni post-traduzionali quali acetilazione e fosforilazione e possono inoltre variare i livelli di fosforilazione del suo inibitore I $\kappa$ B $\alpha$ .

Negli ultimi anni, con la scoperta di una nuova famiglia di RNA non codificanti, chiamati microRNA (miRNA) si è sviluppato un campo di ricerca di base altamente innovativo e i sistemi di predizione bioinformatica hanno rivelato che una grande varietà di pathway regolativi può essere soggetta al controllo mediato da miRNA. Inoltre, molti di essi sono espressi in maniera differenziale nel corso dello sviluppo e nel

differenziamento (Bartel DP *Cell*, 2004), ed è lecito pensare che ogni tipo cellulare possa avere un suo unico profilo di espressione di miRNA.

Dati preliminari prodotti nel nostro laboratorio hanno identificato una *signature* miRNA coinvolta nelle linee cellulari a diversa espressione di CD99 e alcuni di essi (let-7, miR-146b-5p, miR-218, miR-301a ) sono riportati in letteratura essere associati a NF-kB (Ma X et al. *J Mol Cell Biol*, 2011). Sarebbe quindi interessante indagare su quest'aspetto per delineare maggiormente il meccanismo attraverso il quale CD99 influenza l'attività di NF-kBp65 nei processi di differenziamento.

In conclusione, i dati ottenuti in questo studio supportano il coinvolgimento del fattore trascrizionale NF-kBp65 nel differenziamento neurale del sarcoma di Ewing. Nella cellula di Ewing, l'elevata espressione della molecola CD99 porta ad un'alta espressione di NF-kBp65 che attraverso meccanismi ancora poco noti blocca il differenziamento terminale della cellula neoplastica.

L'importanza dei risultati fin qui ottenuti si inserisce in un contesto più ampio, quale la possibilità di applicare, in un futuro, le nuove evidenze a una nuova strategia terapeutica. Le molecole coinvolte nella carcinogenesi sono state ben identificate e molte scelte come bersagli terapeutici che hanno rivoluzionato il trattamento di questi tumori. Nonostante questo, le molecole responsabili dello sviluppo e della progressione nei sarcomi risultano ancora poco definite. L'utilizzo di inibitori, che agiscono direttamente su NF-kB o indirettamente andando a inibire la fosforilazione di I $\kappa$ B $\alpha$  (Kanduri M et al. *Blood Cancer J*, 2011) potrebbero trovare un possibile ruolo in un approccio terapeutico combinato, avente come bersaglio non solo la proliferazione ma anche il differenziamento di queste cellule neoplastiche.

## BIBLIOGRAFIA

Alberti I, Bernard G, Rouquette-Jazdanian AK, Pelassy C, Pourtein M, Aussel C *et al* (2002). CD99 isoforms expression dictates T cell functional outcomes. *FASEB J* **16**: 1946-1948.

Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gardner H, Salzer-Kuntschik M (1991). MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* **67**: 1886-1893.

Arvand A, Bastians H, Welford SM, Thompson AD, Ruderman JV, Denny CT (1998). EWS/FLI1 up regulates mE2-C, a cyclin-selective ubiquitin conjugating enzyme involved in cyclin B destruction. *Oncogene* **17**: 2039-2045.

Aubrit F, Gelin C, Pham D, Raynal B, Bernard A (1989). The biochemical characterization of E2, a T cell surface molecule involved in rosettes. *Eur J Immunol* **19**: 1431-1436.

Banting GS, Pym B, Darling SM, Goodfellow PN (1989). The MIC2 gene product: epitope mapping and structural prediction analysis define an integral membrane protein. *Mol Immunol* **26**: 181-188.

Bar-Sagi D, Feramisco JR (1985). Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. *Cell* **42**: 841-848.

Barbacid M (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem* **56**: 779-827.

Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281-297.

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

Bernard G, Breittmayer JP, de Matteis M, Tramont P, Hofman P, Senik A *et al* (1997). Apoptosis of immature thymocytes mediated by E2/CD99. *J Immunol* **158**: 2543-2550.

Bernard G, Raimondi V, Alberti I, Pourtein M, Widjenes J, Ticchioni M *et al* (2000). CD99 (E2) up-regulates alpha4beta1-dependent T cell adhesion to inflamed vascular endothelium under flow conditions. *Eur J Immunol* **30**: 3061-3065.

Bixel G, Kloep S, Butz S, Petri B, Engelhardt B, Vestweber D (2004). Mouse CD99 participates in T-cell recruitment into inflamed skin. *Blood* **104**: 3205-3213.

Bonizzi G, Karin M (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* **25**: 280-288.

Braun BS, Frieden R, Lessnick SL, May WA, Denny CT (1995). Identification of target genes for the Ewing's sarcoma EWS/FLI fusion protein by representational difference analysis. *Mol Cell Biol* **15**: 4623-4630.

Braunreiter CL, Hancock JD, Coffin CM, Boucher KM, Lessnick SL (2006). Expression of EWS-ETS fusions in NIH3T3 cells reveals significant differences to Ewing's sarcoma. *Cell Cycle* **5**: 2753-2759.

Brown RE, Boyle JL (2003). Mesenchymal chondrosarcoma: molecular characterization by a proteomic approach, with morphogenic and therapeutic implications. *Ann Clin Lab Sci* **33**: 131-141.

Bubici C, Papa S, Pham CG, Zazzeroni F, Franzoso G (2004). NF-kappaB and JNK: an intricate affair. *Cell Cycle* **3**: 1524-1529.

Buckley JD, Pendergrass TW, Buckley CM, Pritchard DJ, Nesbit ME, Provisor AJ *et al* (1998). Epidemiology of osteosarcoma and Ewing's sarcoma in childhood: a study of 305 cases by the Children's Cancer Group. *Cancer* **83**: 1440-1448.

Campbell KJ, Witty JM, Rocha S, Perkins ND (2006). Cisplatin mimics ARF tumor suppressor regulation of RelA (p65) nuclear factor-kappaB transactivation. *Cancer Res* **66**: 929-935.

Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* **17**: 1395-1413.

Cerisano V, Aalto Y, Perdichizzi S, Bernard G, Manara MC, Benini S *et al* (2004). Molecular mechanisms of CD99-induced caspase-independent cell death and cell-cell adhesion in Ewing's sarcoma cells: actin and zyxin as key intracellular mediators. *Oncogene* **23**: 5664-5674.

Chapman NR, Perkins ND (2000). Inhibition of the RelA(p65) NF-kappaB subunit by Egr-1. *J Biol Chem* **275**: 4719-4725.

Chen LF, Greene WC (2004). Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 392-401.

Chiechio S, Copani A, De Petris L, Morales ME, Nicoletti F, Gereau RWt (2006). Transcriptional regulation of metabotropic glutamate receptor 2/3 expression by the NF-kappaB pathway in primary dorsal root ganglia neurons: a possible mechanism for the analgesic effect of L-acetylcarnitine. *Mol Pain* **2**: 20.

Cho HH, Shin KK, Kim YJ, Song JS, Kim JM, Bae YC *et al* (2010). NF-kappaB activation stimulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue by increasing TAZ expression. *J Cell Physiol* **223**: 168-177.

Choi EY, Park WS, Jung KC, Kim SH, Kim YY, Lee WJ *et al* (1998). Engagement of CD99 induces up-regulation of TCR and MHC class I and

II molecules on the surface of human thymocytes. *J Immunol* **161**: 749-754.

Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **77**: 841-852.

Crespo P, Leon J (2000). Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell Mol Life Sci* **57**: 1613-1636.

Davis RJ (1995). Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev* **42**: 459-467.

Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* **17**: 4426-4441.

Deneen B, Welford SM, Ho T, Hernandez F, Kurland I, Denny CT (2003). PIM3 proto-oncogene kinase is a common transcriptional target of divergent EWS/ETS oncoproteins. *Mol Cell Biol* **23**: 3897-3908.

Dworzak MN, Fritsch G, Buchinger P, Fleischer C, Printz D, Zellner A *et al* (1994). Flow cytometric assessment of human MIC2 expression in bone marrow, thymus, and peripheral blood. *Blood* **83**: 415-425.

Ellis NA, Ye TZ, Patton S, German J, Goodfellow PN, Weller P (1994). Cloning of PBDX, an MIC2-related gene that spans the pseudoautosomal boundary on chromosome Xp. *Nat Genet* **6**: 394-400.

Feig LA (1993). The many roads that lead to Ras. *Science* **260**: 767-768.

Fisher C (1998). Synovial sarcoma. *Ann Diagn Pathol* **2**: 401-421.

Fukunaga K, Miyamoto E (1998). Role of MAP kinase in neurons. *Mol Neurobiol* **16**: 79-95.

Funaba M, Zimmerman CM, Mathews LS (2002). Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem* **277**: 41361-41368.

Gallagher D, Gutierrez H, Gavalda N, O'Keeffe G, Hay R, Davies AM (2007). Nuclear factor-kappaB activation via tyrosine phosphorylation of inhibitor kappaB-alpha is crucial for ciliary neurotrophic factor-promoted neurite growth from developing neurons. *J Neurosci* **27**: 9664-9669.

Gangwal K, Sankar S, Hollenhorst PC, Kinsey M, Haroldsen SC, Shah AA *et al* (2008). Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 10149-10154.

Gelin C, Aubrit F, Phalipon A, Raynal B, Cole S, Kaczorek M *et al* (1989). The E2 antigen, a 32 kd glycoprotein involved in T-cell adhesion processes, is the MIC2 gene product. *EMBO J* **8**: 3253-3259.

Gelin C, Zoccola D, Valentin H, Raynal B, Bernard A (1991). Isoforms of the E2 molecule: D44 monoclonal antibody defines an epitope on E2 and reacts differentially with T cell subsets. *Eur J Immunol* **21**: 715-719.

Gerondakis S, Grossmann M, Nakamura Y, Pohl T, Grumont R (1999). Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. *Oncogene* **18**: 6888-6895.

Gille H, Sharrocks AD, Shaw PE (1992). Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* **358**: 414-417.

Goi T, Rusanescu G, Urano T, Feig LA (1999). Ral-specific guanine nucleotide exchange factor activity opposes other Ras effectors in PC12 cells by inhibiting neurite outgrowth. *Mol Cell Biol* **19**: 1731-1741.

Gomez N, Cohen P (1991). Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature* **353**: 170-173.

Gonzalez I, Vicent S, de Alava E, Lecanda F (2007). EWS/FLI-1 oncoprotein subtypes impose different requirements for transformation and metastatic activity in a murine model. *J Mol Med (Berl)* **85**: 1015-1029.

Goodfellow P, Banting G, Sheer D, Ropers HH, Caine A, Ferguson-Smith MA *et al* (1983). Genetic evidence that a Y-linked gene in man is homologous to a gene on the X chromosome. *Nature* **302**: 346-349.

Goodfellow PJ, Darling SM, Thomas NS, Goodfellow PN (1986). A pseudoautosomal gene in man. *Science* **234**: 740-743.

Goodfellow PJ, Pritchard C, Tippett P, Goodfellow PN (1987). Recombination between the X and Y chromosomes: implications for the relationship between MIC2, XG and YG. *Ann Hum Genet* **51**: 161-167.

Granter SR, Renshaw AA, Fletcher CD, Bhan AK, Rosenberg AE (1996). CD99 reactivity in mesenchymal chondrosarcoma. *Hum Pathol* **27**: 1273-1276.

Grewal SS, York RD, Stork PJ (1999). Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* **9**: 544-553.

Guerrero I, Wong H, Pellicer A, Burstein DE (1986). Activated N-ras gene induces neuronal differentiation of PC12 rat pheochromocytoma cells. *J Cell Physiol* **129**: 71-76.

Gutierrez H, Hale VA, Dolcet X, Davies A (2005). NF-kappaB signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development* **132**: 1713-1726.

Hahn MJ, Yoon SS, Sohn HW, Song HG, Park SH, Kim TJ (2000). Differential activation of MAP kinase family members triggered by CD99 engagement. *FEBS Lett* **470**: 350-354.

Haller D, Russo MP, Sartor RB, Jobin C (2002). IKK beta and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt participate in non-pathogenic Gram-negative enteric bacteria-induced RelA phosphorylation and NF-kappa B



activation in both primary and intestinal epithelial cell lines. *J Biol Chem* **277**: 38168-38178.

Hancock JD, Lessnick SL (2008). A transcriptional profiling meta-analysis reveals a core EWS-FLI gene expression signature. *Cell Cycle* **7**: 250-256.

Hartley AL, Birch JM, Blair V, Teare MD, Marsden HB, Harris M (1991). Cancer incidence in the families of children with Ewing's tumor. *J Natl Cancer Inst* **83**: 955-956.

Hayden MS, Ghosh S (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* **18**: 2195-2224.

Hazzalin CA, Mahadevan LC (2002). MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 30-40.

Helman LJ, Meltzer P (2003). Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer* **3**: 685-694.

Hess K, Ushmorov A, Fiedler J, Brenner RE, Wirth T (2009). TNFalpha promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF-kappaB signaling pathway. *Bone* **45**: 367-376.

Hoberg JE, Popko AE, Ramsey CS, Mayo MW (2006). IkappaB kinase alpha-mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300. *Mol Cell Biol* **26**: 457-471.

Hood JK, Silver PA (1999). In or out? Regulating nuclear transport. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 241-247.

Hu-Lieskovan S, Zhang J, Wu L, Shimada H, Schofield DE, Triche TJ (2005). EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. *Cancer Res* **65**: 4633-4644.

Huang HY, Illei PB, Zhao Z, Mazumdar M, Huvos AG, Healey JH *et al* (2005). Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J Clin Oncol* **23**: 548-558.

Janknecht R, Ernst WH, Pingoud V, Nordheim A (1993). Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *EMBO J* **12**: 5097-5104.

Javelaud D, Wietzerbin J, Delattre O, Besancon F (2000). Induction of p21Waf1/Cip1 by TNFalpha requires NF-kappaB activity and antagonizes apoptosis in Ewing tumor cells. *Oncogene* **19**: 61-68.

Javelaud D, Besancon F (2001). NF-kappa B activation results in rapid inactivation of JNK in TNF alpha-treated Ewing sarcoma cells: a mechanism for the anti-apoptotic effect of NF-kappa B. *Oncogene* **20**: 4365-4372.

Javelaud D, Poupon MF, Wietzerbin J, Besancon F (2002). Inhibition of constitutive NF-kappa B activity suppresses tumorigenicity of Ewing sarcoma EW7 cells. *Int J Cancer* **98**: 193-198.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ (2007). Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* **57**: 43-66.

Jeong SJ, Pise-Masison CA, Radonovich MF, Park HU, Brady JN (2005). Activated AKT regulates NF-kappaB activation, p53 inhibition and cell survival in HTLV-1-transformed cells. *Oncogene* **24**: 6719-6728.

Jung KC, Park WS, Bae YM, Hahn JH, Hahn K, Lee H *et al* (2002). Immunoreactivity of CD99 in stomach cancer. *J Korean Med Sci* **17**: 483-489.

Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2009). NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**: a001271.

Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M (2005). Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* **120**: 649-661.

Kanduri M, Tobin G, Aleskog A, Nilsson K, Rosenquist R (2011). The novel NF-kappaB inhibitor IMD-0354 induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J* **1**: e12.

Kasibhatla S, Tailor P, Bonefoy-Berard N, Mustelin T, Altman A, Fotedar A (1999). Jun kinase phosphorylates and regulates the DNA binding activity of an octamer binding protein, T-cell factor beta1. *Mol Cell Biol* **19**: 2021-2031.

Kim HY, Kim YM, Shin YK, Park SH, Lee W (2004). Solution structure of the cytoplasmic domain of human CD99 type I. *Mol Cells* **18**: 24-29.

Kim MH, Kim HB, Acharya S, Sohn HM, Jun JY, Chang IY *et al* (2009). Ape1/Ref-1 induces glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) responsiveness by upregulating GDNF receptor alpha1 expression. *Mol Cell Biol* **29**: 2264-2277.

Koo JW, Russo SJ, Ferguson D, Nestler EJ, Duman RS (2010). Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2669-2674.

Kosako H, Gotoh Y, Matsuda S, Ishikawa M, Nishida E (1992). Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *EMBO J* **11**: 2903-2908.

Kovar H, Dworzak M, Strehl S, Schnell E, Ambros IM, Ambros PF *et al* (1990). Overexpression of the pseudoautosomal gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. *Oncogene* **5**: 1067-1070.

Kovar H, Auinger A, Jug G, Aryee D, Zoubek A, Salzer-Kuntschik M *et al* (1993). Narrow spectrum of infrequent p53 mutations and absence of MDM2 amplification in Ewing tumours. *Oncogene* **8**: 2683-2690.

Krappmann D, Wegener E, Sunami Y, Esen M, Thiel A, Mordmuller B *et al* (2004). The IkappaB kinase complex and NF-kappaB act as master regulators of lipopolysaccharide-induced gene expression and control subordinate activation of AP-1. *Mol Cell Biol* **24**: 6488-6500.

Kraus J, Borner C, Giannini E, Holtt V (2003). The role of nuclear factor kappaB in tumor necrosis factor-regulated transcription of the human mu-opioid receptor gene. *Mol Pharmacol* **64**: 876-884.

Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gelinas C (2003). To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* **22**: 8961-8982.

Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR *et al* (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* **358**: 417-421.

Kyriakis JM, Avruch J (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**: 807-869.

Ladanyi M, Lewis R, Jhanwar SC, Gerald W, Huvos AG, Healey JH (1995). MDM2 and CDK4 gene amplification in Ewing's sarcoma. *J Pathol* **175**: 211-217.

Lagirand-Cantaloube J, Laud K, Lilienbaum A, Tirode F, Delattre O, Auclair C *et al* (2010). EWS-FLI1 inhibits TNFalpha-induced NFkappaB-dependent transcription in Ewing sarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **399**: 705-710.

Lee EJ, Lee HG, Park SH, Choi EY (2003). CD99 type II is a determining factor for the differentiation of primitive neuroectodermal cells. *Exp Mol Med* **35**: 438-447.

Lee G, Kim H, Elkabetz Y, Al Shamy G, Panagiotakos G, Barberi T *et al* (2007). Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **25**: 1468-1475.

Leevers SJ, Paterson HF, Marshall CJ (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**: 411-414.

Lessnick SL, Dacwag CS, Golub TR (2002). The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. *Cancer Cell* **1**: 393-401.

Levy R, Dille J, Fox RI, Warnke R (1979). A human thymus-leukemia antigen defined by hybridoma monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 6552-6556.

Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* **74**: 49-139.

Li Q, Estepa G, Memet S, Israel A, Verma IM (2000). Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation. *Genes Dev* **14**: 1729-1733.

Limpert AS, Carter BD (2010). Axonal neuregulin 1 type III activates NF-kappaB in Schwann cells during myelin formation. *J Biol Chem* **285**: 16614-16622.

Luo JL, Kamata H, Karin M (2005). IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* **115**: 2625-2632.

Ma X, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Li Y (2011). MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J Mol Cell Biol* **3**: 159-166.

Madrid LV, Mayo MW, Reuther JY, Baldwin AS, Jr. (2001). Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem* **276**: 18934-18940.

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

Marais R, Wynne J, Treisman R (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* **73**: 381-393.

May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC, Delattre O *et al* (1993a). Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5752-5756.

May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB *et al* (1993b). The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol* **13**: 7393-7398.

May WA, Arvand A, Thompson AD, Braun BS, Wright M, Denny CT (1997). EWS/FLI1-induced manic fringe renders NIH 3T3 cells tumorigenic. *Nat Genet* **17**: 495-497.

Mayr B, Montminy M (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 599-609.

McKeen EA, Hanson MR, Mulvihill JJ, Glaubiger DL (1983). Birth defects with Ewing's sarcoma. *N Engl J Med* **309**: 1522.

Memet S (2006). NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem Pharmacol* **72**: 1180-1195.

Mitra AK, Gao L, Zucker IH (2010). Angiotensin II-induced upregulation of AT(1) receptor expression: sequential activation of NF-kappaB and Elk-1 in neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**: C561-569.

Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T *et al* (2008). Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol* **28**: 2125-2137.

Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A (1993). Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* **260**: 1658-1661.

Nakafuku M, Kaziro Y (1993). Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha can induce neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells under particular culture conditions. *FEBS Lett* **315**: 227-232.

Nakielny S, Cohen P, Wu J, Sturgill T (1992). MAP kinase activator from insulin-stimulated skeletal muscle is a protein threonine/tyrosine kinase. *EMBO J* **11**: 2123-2129.

Natoli G, Sacconi S, Bosisio D, Marazzi I (2005). Interactions of NF-kappaB with chromatin: the art of being at the right place at the right time. *Nat Immunol* **6**: 439-445.

Natoli G, De Santa F (2006). Shaping alternative NF-kappaB-dependent gene expression programs: new clues to specificity. *Cell Death Differ* **13**: 693-696.

Nickols JC, Valentine W, Kanwal S, Carter BD (2003). Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral myelin formation. *Nat Neurosci* **6**: 161-167.

Noda M, Ko M, Ogura A, Liu DG, Amano T, Takano T *et al* (1985). Sarcoma viruses carrying ras oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line. *Nature* **318**: 73-75.

Novakovic B, Goldstein AM, Wexler LH, Tucker MA (1994). Increased risk of neuroectodermal tumors and stomach cancer in relatives of patients with Ewing's sarcoma family of tumors. *J Natl Cancer Inst* **86**: 1702-1706.

Ogawa M, LaRue AC, Drake CJ (2006). Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: Its pathophysiologic implications. *Blood* **108**: 2893-2896.

Owen LA, Lessnick SL (2006). Identification of target genes in their native cellular context: an analysis of EWS/FLI in Ewing's sarcoma. *Cell Cycle* **5**: 2049-2053.

Pahl HL (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**: 6853-6866.

Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M (2006). Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ* **13**: 861-872.

Perkins ND (1997). Achieving transcriptional specificity with NF-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 1433-1448.

Perkins ND (2004). NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol* **14**: 64-69.

Perkins ND (2006). Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* **25**: 6717-6730.

Perkins ND, Gilmore TD (2006). Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ* **13**: 759-772.

Qui MS, Green SH (1992). PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity. *Neuron* **9**: 705-717.

Ramani P, Rampling D, Link M (1993). Immunocytochemical study of 12E7 in small round-cell tumours of childhood: an assessment of its sensitivity and specificity. *Histopathology* **23**: 557-561.



Richter M, Suau P, Ponte I (2002). Sequence and analysis of the 5' flanking and 5' untranslated regions of the rat N-methyl-D-aspartate receptor 2A gene. *Gene* **295**: 135-142.

Riggi N, Suva ML, Suva D, Cironi L, Provero P, Tercier S *et al* (2008). EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* **68**: 2176-2185.

Riggi N, Suva ML, De Vito C, Provero P, Stehle JC, Baumer K *et al* (2010). EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells. *Genes Dev* **24**: 916-932.

Robinson MJ, Cobb MH (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 180-186.

Rocchi A, Manara MC, Sciandra M, Zambelli D, Nardi F, Nicoletti G *et al* (2010). CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *J Clin Invest* **120**: 668-680.

Rocha S, Campbell KJ, Perkins ND (2003a). p53- and Mdm2-independent repression of NF-kappa B transactivation by the ARF tumor suppressor. *Mol Cell* **12**: 15-25.

Rocha S, Martin AM, Meek DW, Perkins ND (2003b). p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF-kappaB subunit with histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* **23**: 4713-4727.

Rocha S, Garrett MD, Campbell KJ, Schumm K, Perkins ND (2005). Regulation of NF-kappaB and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor. *EMBO J* **24**: 1157-1169.

Romano A, Freudenthal R, Merlo E, Routtenberg A (2006). Evolutionarily-conserved role of the NF-kappaB transcription factor in neural plasticity and memory. *Eur J Neurosci* **24**: 1507-1516.

Rorie CJ, Thomas VD, Chen P, Pierce HH, O'Bryan JP, Weissman BE (2004). The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* **64**: 1266-1277.

Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, Vousden KH (2000). Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* **404**: 892-897.

Satoh T, Nakamura S, Kaziro Y (1987). Induction of neurite formation in PC12 cells by microinjection of proto-oncogenic Ha-ras protein preincubated with guanosine-5'-O-(3-thiotriphosphate). *Mol Cell Biol* **7**: 4553-4556.

Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol* **3**: 143-150.

Scotlandi K, Baldini N, Cerisano V, Manara MC, Benini S, Serra M *et al* (2000). CD99 engagement: an effective therapeutic strategy for Ewing tumors. *Cancer Res* **60**: 5134-5142.

Silvany RE, Eliazer S, Wolff NC, Ilaria RL, Jr. (2000). Interference with the constitutive activation of ERK1 and ERK2 impairs EWS/FLI-1-dependent transformation. *Oncogene* **19**: 4523-4530.

Simpson CS, Morris BJ (2000). Regulation of neuronal cell adhesion molecule expression by NF-kappa B. *J Biol Chem* **275**: 16879-16884.

Smith MJ, Goodfellow PN (1994). MIC2R: a transcribed MIC2-related sequence associated with a CpG island in the human pseudoautosomal region. *Hum Mol Genet* **3**: 1575-1582.

Sohn HW, Choi EY, Kim SH, Lee IS, Chung DH, Sung UA *et al* (1998). Engagement of CD99 induces apoptosis through a calcineurin-independent pathway in Ewing's sarcoma cells. *Am J Pathol* **153**: 1937-1945.

Sole C, Dolcet X, Segura MF, Gutierrez H, Diaz-Meco MT, Gozzelino R *et al* (2004). The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-kappa B signaling. *J Cell Biol* **167**: 479-492.

Spunt SL, Rodriguez-Galindo C, Fuller CE, Harper J, Krasin MJ, Billups CA *et al* (2006). Ewing sarcoma-family tumors that arise after treatment of primary childhood cancer. *Cancer* **107**: 201-206.

Stefanovsky VY, Pelletier G, Hannan R, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI, Moss T (2001). An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell* **8**: 1063-1073.

Stiller CA, Bielack SS, Jundt G, Steliarova-Foucher E (2006). Bone tumours in European children and adolescents, 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer* **42**: 2124-2135.

Subramaniam S, Unsicker K (2006). Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death. *Neuroscience* **138**: 1055-1065.

Sweatt JD (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* **14**: 311-317.

Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG *et al* (2007). Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* **129**: 1377-1388.

Tan Y, Rouse J, Zhang A, Cariati S, Cohen P, Comb MJ (1996). FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J* **15**: 4629-4642.

Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, Wahl G, Verma I (2002). p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell* **1**: 493-503.

Thompson AD, Braun BS, Arvand A, Stewart SD, May WA, Chen E *et al* (1996). EAT-2 is a novel SH2 domain containing protein that is up regulated by Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Oncogene* **13**: 2649-2658.

Thompson JE, Thompson CB (2004). Putting the rap on Akt. *J Clin Oncol* **22**: 4217-4226.

Torchia EC, Jaishankar S, Baker SJ (2003). Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells. *Cancer Res* **63**: 3464-3468.

Toretsky JA, Kalebic T, Blakesley V, LeRoith D, Helman LJ (1997). The insulin-like growth factor-I receptor is required for EWS/FLI-1 transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* **272**: 30822-30827.

Traverse S, Gomez N, Paterson H, Marshall C, Cohen P (1992). Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. *Biochem J* **288** ( Pt 2): 351-355.

Treisman R (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 205-215.

Tucker MA, D'Angio GJ, Boice JD, Jr., Strong LC, Li FP, Stovall M *et al* (1987). Bone sarcomas linked to radiotherapy and chemotherapy in children. *N Engl J Med* **317**: 588-593.

Uren A, Merchant MS, Sun CJ, Vitolo MI, Sun Y, Tsokos M *et al* (2003). Beta-platelet-derived growth factor receptor mediates motility and growth of Ewing's sarcoma cells. *Oncogene* **22**: 2334-2342.

Ushita M, Saito T, Ikeda T, Yano F, Higashikawa A, Ogata N *et al* (2009). Transcriptional induction of SOX9 by NF-kappaB family member RelA in chondrogenic cells. *Osteoarthritis Cartilage* **17**: 1065-1075.

Vermeulen L, De Wilde G, Van Damme P, Vanden Berghe W, Haegeman G (2003). Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J* **22**: 1313-1324.

Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**: 205-214.

Wang S, Nath N, Minden A, Chellappan S (1999). Regulation of Rb and E2F by signal transduction cascades: divergent effects of JNK1 and p38 kinases. *EMBO J* **18**: 1559-1570.

Warne PH, Viciano PR, Downward J (1993). Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* **364**: 352-355.

Whitmarsh AJ, Davis RJ (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med (Berl)* **74**: 589-607.

Whitmarsh AJ, Davis RJ (1998). Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci* **23**: 481-485.

Wiggin GR, Soloaga A, Foster JM, Murray-Tait V, Cohen P, Arthur JS (2002). MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts. *Mol Cell Biol* **22**: 2871-2881.

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

Wood KW, Qi H, D'Arcangelo G, Armstrong RC, Roberts TM, Halegoua S (1993). The cytoplasmic raf oncogene induces a neuronal phenotype in PC12 cells: a potential role for cellular raf kinases in neuronal growth factor signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5016-5020.

Woodgett JR, Pulverer BJ, Plyte S, Hughes K, Nikolakaki E (1994). Nuclear onco-protein targets of signal transduction pathways. *Pigment Cell Res* **7**: 96-100.

Yamamoto T, Wakabayashi T (1969). Bone tumors among the atomic bomb survivors of Hiroshima and Nagasaki. *Acta Pathol Jpn* **19**: 201-212.

Yang H, Xia Y, Lu SQ, Soong TW, Feng ZW (2008). Basic fibroblast growth factor-induced neuronal differentiation of mouse bone marrow stromal cells requires FGFR-1, MAPK/ERK, and transcription factor AP-1. *J Biol Chem* **283**: 5287-5295.

Yang SH, Shore P, Willingham N, Lakey JH, Sharrocks AD (1999). The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J* **18**: 5666-5674.

Young KM, Bartlett PF, Coulson EJ (2006). Neural progenitor number is regulated by nuclear factor-kappaB p65 and p50 subunit-dependent proliferation rather than cell survival. *J Neurosci Res* **83**: 39-49.

Zhang XF, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledge SJ, Marshall MS *et al* (1993). Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* **364**: 308-313.

Zhong H, Voll RE, Ghosh S (1998). Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* **1**: 661-671.

Zwerner JP, May WA (2001). PDGF-C is an EWS/FLI induced transforming growth factor in Ewing family tumors. *Oncogene* **20**: 626-633.