

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Morfologia Umana e Scienze Biomediche "Città Studi"

Scuola di dottorato in Scienze Morfologiche - XXIV ciclo



**STUDIO DELL'EFFETTO DI UKRAIN SUI MECCANISMI
DI TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMALE
E INVASIVITÀ TUMORALE IN CELLULE DI CARCINOMA RENALE**

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa Laura VIZZOTTO

Tutor: Prof.ssa Nicoletta GAGLIANO

Tesi di dottorato di:

Letizia PETTINARI

Matr. n° R08076

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

Riassunto.....	pag. 5
Introduzione.....	pag. 8
Carcinoma renale.....	pag. 9
Epidemiologia.....	pag. 9
Eziopatogenesi e classificazione.....	pag. 9
Sintomatologia e stadiazione.....	pag. 12
Diagnosi.....	pag. 13
Terapia.....	pag. 15
Ukrain.....	pag. 17
La transizione epitelio-mesenchimale.....	pag. 19
Classificazione della EMT.....	pag. 21
Regolazione della EMT.....	pag. 24
Complesso caderina E/ β -catenina.....	pag. 25
Le giunzioni aderenti.....	pag. 25
Struttura molecolare della super famiglia delle caderine.....	pag. 26
Classificazione delle caderine.....	pag. 27
Caderina E.....	pag. 30
Regolazione della caderina E.....	pag. 31
β -catenina.....	pag. 33
Citoscheletro actinico.....	pag. 34
Vimentina.....	pag. 39
Metalloproteinasi della matrice (MMPs).....	pag. 40

Classificazione delle MMPs.....	pag. 40
Struttura molecolare delle MMPs.....	pag. 42
Attivazione delle MMPs.....	pag. 43
Regolazione dell'attività delle MMPs.....	pag. 45
MMPs e invasività tumorale.....	pag. 47
Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC).....	pag. 48
SPARC e proliferazione cellulare.....	pag. 50
SPARC ed invasività tumorale.....	pag. 51
Apoptosi.....	pag. 52
Caratteristiche dell'apoptosi.....	pag. 54
Meccanismi dell'apoptosi.....	pag. 55
Scopo dello studio.....	pag. 57
Materiali e metodi.....	pag. 59
Modello sperimentale.....	pag. 60
Colture cellulari.....	pag. 60
Disegno sperimentale e trattamento con Ukrain.....	pag. 61
Vitalità e morfologia cellulare.....	pag. 62
Test di apoptosi	pag. 63
Analisi del ciclo cellulare.....	pag. 64
Test di migrazione e di invasività.....	pag. 65
Test di migrazione.....	pag. 65
Test di invasività.....	pag. 65
Immunofluorescenza.....	pag. 67

Zimografia.....	pag. 69
Western Blot.....	pag. 70
Elettroforesi sul gel di poliacrilamide	pag. 70
Immunoblotting.....	pag. 70
Analisi statistica.....	pag. 72
Risultati.....	pag. 73
Vitalità e proliferazione cellulare.....	pag. 74
Morfologia cellulare.....	pag. 76
Espressione della tubulina.....	pag. 77
Espressione dei marcatori di transizione epitelio-mesenchimale.....	pag. 78
Espressione e attività delle MMPs.....	pag. 83
Migrazione e invasività.....	pag. 85
Espressione di SPARC.....	pag. 86
Analisi del ciclo cellulare.....	pag. 88
Discussione e Conclusioni.....	pag. 89
Discussione.....	pag. 90
Morfologia cellulare e transizione epitelio-mesenchimale.....	pag. 91
Attività delle metalloproteinasi della matrice e potenziale invasivo.....	pag. 93
Espressione di SPARC.....	pag. 95
Conclusioni.....	pag. 97
Bibliografia.....	pag. 98

RIASSUNTO

Il carcinoma renale (RCC) rappresenta l'80-85% dei tumori del rene, tra i quali il più frequente è il tipo a cellule chiare (ccRCC), derivante dalla trasformazione neoplastica delle cellule dei tubuli contorti prossimali, caratterizzato da un elevato grado di metastatizzazione e da un'alta frequenza di recidiva dopo rimozione chirurgica, con conseguente prognosi infausta.

Durante la progressione dei carcinomi gioca un ruolo chiave la transizione epitelio-mesenchimale (EMT), un processo finemente regolato attraverso il quale le cellule possono perdere le loro caratteristiche epiteliali ed assumere un fenotipo mesenchimale, acquisendo motilità e capacità invasive. Durante la EMT si assiste alla down-regolazione della caderina E, la principale componente delle zonule aderenti, al rimodellamento del citoscheletro, e alla up-regolazione dell'attività delle metalloproteinasi della matrice (MMPs) coinvolte, insieme alla Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC), nel rimodellamento della matrice extracellulare circostante il tumore e nella disseminazione di metastasi a distanza.

Ukrain è un farmaco derivato della chelidonina, la principale componente degli alcaloidi estratti della pianta *Chelidonium majus*. La sua efficacia nel trattamento di tumori solidi, quali i tumori del colon, del retto, della mammella, della vescica, dell'ovaio, del pancreas, e del rene è stata dimostrata in numerosi studi clinici, sebbene i meccanismi alla base della sua attività non siano ancora completamente noti.

In questo studio abbiamo pertanto caratterizzato *in vitro* l'effetto di Ukrain su cellule di ccRCC, al fine di contribuire alla comprensione della sua azione terapeutica.

A tale scopo abbiamo valutato l'effetto di Ukrain su morfologia, proliferazione cellulare, e apoptosi. Considerato il ruolo chiave della EMT nella progressione dei carcinomi, abbiamo caratterizzato il fenotipo delle cellule di ccRCC, e la sua possibile modulazione, dopo trattamento con Ukrain, in relazione all'espressione dei marcatori di EMT quali il complesso caderina E/ β -catenina, l'organizzazione dei microfilamenti, l'espressione della vimentina, e l'espressione delle metalloproteinasi della matrice (MMPs) ad azione gelatinolitica (MMP-2, MMP-9). Infine, considerata l'importanza del rimodellamento della matrice extracellulare nel microenvironment circostante il tumore, abbiamo analizzato l'espressione della SPARC, una proteina della matrice che, non solo è in grado di modulare le interazioni cellula-matrice, ma agisce anche come regolatore del ciclo cellulare.

Per questo scopo sono state utilizzate tre linee cellulari umane di ccRCC: Caki-1, Caki-2, e ACHN, non trattate (CT) o trattate con quattro dosi di farmaco (5, 10, 20, e 40 μ M) per 24 e 48 ore.

L'effetto di Ukrain sulla proliferazione cellulare è stato determinato mediante curve di crescita, la morfologia cellulare mediante osservazione al microscopio a contrasto di fase. Il test dell'annessina V e la citofluorimetria sono stati utilizzati, rispettivamente, per indagare la presenza di apoptosi e il ciclo cellulare. L'analisi al microscopio a fluorescenza è stata impiegata

per valutare l'espressione del complesso caderina E/ β -catenina, della vimentina, dell'actina citoscheletrica e della tubulina. Mediante western blot è stata determinata l'espressione di vimentina e SPARC, mentre con la zimografia è stata quantificata l'attività delle MMPs. I test di migrazione e di invasività hanno permesso di valutare il potenziale migratorio e invasivo delle cellule di ccRCC.

Le curve di crescita hanno evidenziato una riduzione della proliferazione cellulare di tutte le tre linee cellulari indotta da Ukrain, evidente 24 ore dopo somministrazione delle dosi 10, 20, e 40 μ M, e dopo 48 ore a tutti i dosaggi del farmaco. L'effetto anti-proliferativo di Ukrain è risultato verosimilmente mediato dall'induzione di apoptosi, evidenziata con il test dell'annexina V, 24 e 48 ore dopo trattamento con Ukrain. In particolare, Ukrain incrementa la percentuale di cellule apoptotiche nella linea cellulare Caki-1 a partire dalla dose 10 μ M, e a partire da 5 μ M nelle linee Caki-2 e ACHN. Il citoscheletro di tubulina non risulta modificato nelle cellule trattate col farmaco.

I risultati ottenuti hanno mostrato che Ukrain non è in grado di ripristinare a livello della membrana cellulare l'immunoreattività del complesso caderina E/ β -catenina, sebbene induca nelle cellule Caki-2 e ACHN la ri-espressione corticale dell'actina. Inoltre, Ukrain non influenza complessivamente l'espressione della vimentina, tuttavia, in alcune cellule Caki-1 e ACHN ne determina un riarrangiamento correlabile con la sua down regolazione.

L'attività delle MMP-2 e MMP-9 rimane immodificata 24 ore dopo somministrazione del farmaco. Dopo 48 ore di trattamento, invece, l'attività della MMP-2 risulta significativamente down-regolata dopo trattamento con Ukrain 20 μ M in tutte le linee cellulari. L'attività della MMP-9 è significativamente down-regolata dalla somministrazione di tutte le dosi di Ukrain nella linea Caki-1, e dalla dose 20 μ M nelle cellule Caki-2 e ACHN.

I dati sull'attività delle MMPs sono in accordo con il risultato dei test di migrazione e invasività, che confermano la riduzione del potenziale migratorio e invasivo delle cellule indotto dal farmaco.

Per quanto riguarda SPARC, i risultati mostrano che i suoi livelli nei surnatanti vengono down regolati a tutti i dosaggi nelle Caki-2, e alla dose di 20 μ M nelle Caki-1 e ACHN. Allo stesso tempo, i livelli intracellulari di SPARC risultano up-regolati nelle tre linee cellulari dopo trattamento con Ukrain, suggerendo che il farmaco potrebbe anche influenzare la proliferazione cellulare mediante inibizione del ciclo cellulare.

Considerati nel loro insieme, i risultati di questo studio suggeriscono che Ukrain potrebbe essere in grado di revertire il fenotipo delle cellule di ccRCC correlato alla EMT, e modulare due principali aspetti coinvolti nella progressione del carcinoma renale, quali il potenziale invasivo e la proliferazione cellulare.

INTRODUZIONE

CARCINOMA RENALE

Epidemiologia

Il carcinoma (o adenocarcinoma) renale (RCC) rappresenta il 3% di tutti i tumori umani ed è considerato la forma più maligna delle neoplasie urologiche comuni, in quanto caratterizzato da prognosi nefasta.

Il RCC ha origine dalla trasformazione neoplastica delle cellule epiteliali che rivestono i diversi tratti del tubulo renale e costituisce circa l'80-85% dei tumori maligni del rene; fra gli altri tipi di carcinoma a carico dell'apparato urinario possono essere annoverati il carcinoma della pelvi renale (che rappresenta il 15-20% dei casi di cancro renale negli adulti) e il tumore di Wilms (o nefroblastoma) nei bambini [Lam et al., 2009].

L'incidenza del RCC è doppia negli uomini rispetto alle donne, mentre è equivalente fra popolazione bianca e di colore. La frequenza della patologia è più elevata nel Nord America e in Scandinavia. I pazienti affetti da RCC hanno in genere più di 40 anni al momento della diagnosi poiché la malattia si manifesta prevalentemente nella settima ed ottava decade di vita [Motzer et al., 1996].

I fattori di rischio ambientali che hanno un peso significativo sull'insorgenza del RCC sono il fumo di sigaretta (il quale raddoppia il rischio di comparsa di RCC e contribuisce a circa un terzo di tutti i casi) e l'obesità, soprattutto femminile, poiché esiste una correlazione tra aumento del peso corporeo e sviluppo di RCC.

Ulteriori fattori di rischio associati allo sviluppo della malattia sono: l'ipertensione e le terapie ad essa collegate; le cure estrogeniche e l'esposizione a prodotti petroliferi, metalli pesanti e amianto; inoltre, nei pazienti con sclerosi tuberosa e con malattia renale cistica legata a insufficienza renale cronica, l'incidenza di manifestazione del RCC è notevolmente aumentata [Motzer et al., 1996].

Eziopatogenesi e classificazione

Per quanto riguarda l'eziopatogenesi di questa neoplasia, è stato osservato che il suo sviluppo dall'epitelio del tubulo renale normale, tra le altre cause, può essere in parte dovuto a mutazioni dei geni indispensabili per il corretto sviluppo cellulare, quali ad esempio i geni che codificano per proteine coinvolte nel controllo della divisione cellulare. Questi includono i geni che partecipano direttamente al controllo del ciclo cellulare, quali il gene del retinoblastoma (Rb), il gene oncosoppressore p53 e la famiglia dei geni ras, le cui proteine sono coinvolte nella

trasduzione di segnali dall'esterno della cellula al nucleo. Sono stati rilevati anche elevati livelli di espressione del gene *myc* in gran parte dei tumori renali sporadici, ma questo dato non sembra avere valore prognostico.

L'aumento di fattori di crescita angiogenici, invece, come il fibroblast growth factor (FGF) e il vascular endothelial growth factor (VEGF), possono contribuire alla ipervascolarizzazione tumorale e allo sviluppo di metastasi, e possono quindi avere importanza prognostica [Motzer et al., 1996].

Nella maggior parte dei casi, il RCC non è di origine ereditaria; le rare forme familiari, che si manifestano generalmente come tumori bilaterali e multifocali, sono caratterizzate da una trasmissione autosomica dominante e da giovane età al momento della diagnosi (dalla terza alla quinta decade) [Motzer et al., 1996]. Un esempio è la malattia di Von Hippel-Lindau, una sindrome autosomica dominante ereditaria che deriva da una mutazione nel gene *VHL* e che predispone ad una grande varietà di neoplasie, tra cui anche i carcinomi renali. La concomitanza e la molteplicità delle diverse patologie tumorali a carico dei diversi organi è molto variabile da paziente a paziente ma, comunemente, il RCC rende conto di circa il 50% delle cause di morte nei pazienti con *VHL* [Gnarra et al., 1994].

I carcinomi renali sono stati storicamente classificati secondo il tipo cellulare presente (chiaro, granuloso, fusato, o oncocitico) e secondo la modalità di crescita (acinario, papillare, o sarcomatoide); questo criterio di classificazione forniva, però, scarse informazioni sul comportamento clinico del carcinoma stesso. Una successiva classificazione di tipo istopatologico, è stata proposta nel 1986, è basata sulle caratteristiche morfologiche, istochimiche e ultrastrutturali del tumore, ed è supportata da analisi citogenetiche e molecolari [Motzer et al., 1996].

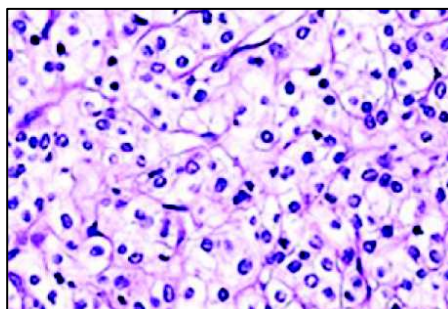
L'attuale criterio di classificazione dei carcinomi renali è basato principalmente sulla morfologia e sulle differenze genetiche delle popolazioni cellulari.

Secondo questa classificazione si distinguono:

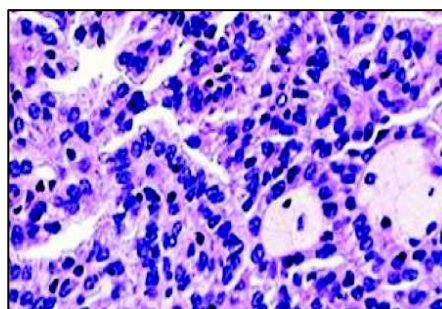
- *RCC a cellule chiare*: rappresenta circa il 70-80% delle neoplasie renali; presenta principalmente cellule con citoplasma chiaro, con focolai di cellule a citoplasma eosinofilo. Le cellule progenitrici del RCC a cellule chiare derivano dalle cellule epiteliali del tubulo contorto prossimale. Questo tipo di carcinoma è caratterizzato, inoltre, dalla delezione del 3p di una o entrambe le copie del cromosoma. La presenza di un pattern sarcomatoide correla con una prognosi nefasta.
- *RCC a cellule cromofile (papillare)*: rappresenta circa il 15% delle neoplasie renali e si presenta, solitamente, multifocale e bilaterale; è composto per almeno il 50% da strutture papillari, formate da tessuto connettivo e da piccole e medie cellule cuboidi con

citoplasma granulare eosinofilo o basofilo. Non presenta la delezione del 3p ma monosomie del cromosoma Y e trisomie del 7 o del 27.

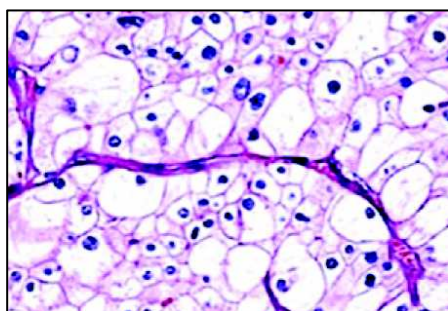
- *RCC a cellule cromofobe*: rappresenta circa il 4% dei RCC; è una variante caratterizzata da grandi cellule poligonali a crescita compatta e con abbondanti vescicole citoplasmatiche visibili al microscopio elettronico. Le cellule progenitrici di questo tipo di carcinoma originano dal dotto collettore; anche in questo caso non è presente la delezione del 3p, ma il corredo cromosomico risulta essere ipodiploide.
- *Oncocitoma renale*: origina dal tubulo contorto distale e rappresenta il 3-5% delle neoplasie renali; dal punto di vista istologico è costituito in prevalenza da cellule eosinofile disposte a “nido”. È generalmente considerato un tumore benigno.
- *Carcinoma del dotto collettore (di Bellini)*: rappresenta una minoranza delle neoplasie renali, con incidenza compresa fra lo 0,4 e il 2,6%. Raramente è associato a metastasi e si localizza principalmente nella porzione midollare del rene [Motzer et al., 1996; Zambrano et al., 1999].



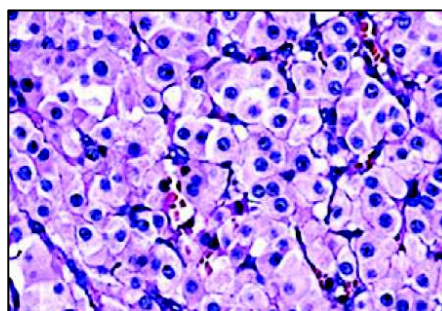
a) RCC a cellule chiare



b) RCC papillare



c) RCC a cellule cromofobe



d) Oncocitoma renale

Figura 1. Microfotografie al microscopio ottico di sezioni di tessuto renale in cui sono mostrate le diverse tipologie di RCC (colorazione con ematoxilina-eosina) [modificato da Ficarra et al., 2010].

Sintomatologia e stadiazione

Il quadro clinico del RCC si presenta con molteplici sintomi; le manifestazioni più comuni sono: ematuria (50-60% dei pazienti), dolore addominale (40%), e una massa palpabile nel fianco (30-40%). Questi tre sintomi si manifestano però come una combinazione ("triade classica") in meno del 10% dei pazienti. Altre manifestazioni relativamente aspecifiche sono: febbre, sudorazione notturna, malessere generalizzato e perdita di peso; inoltre, il 2% dei pazienti di sesso maschile presenta varicocele, di solito nell'antimero sinistro, a causa dell'ostruzione della vena testicolare [Motzer et al., 1996].

Se il tumore è di dimensioni ridotte ed è localizzato, raramente produce sintomi importanti; per questo motivo la diagnosi è spesso ritardata fintanto che la malattia non è avanzata.

Il principale fattore di sopravvivenza, come per la maggior parte dei tumori, è la sua estensione anatomica o stadio patologico. I pazienti con malattia estesa limitatamente al rene hanno generalmente risposte migliori alla terapia rispetto a quelli con coinvolgimento linfonodale o metastasi a distanza.

Il grado di stadiazione tumorale per il RCC è mostrato in Figura 2 ed è così suddiviso:

- *Stadio 1* → tumore primario non più grande di 7 cm e localizzato in sede intrarenale. Sopravvivenza a 5 anni del 95%.
- *Stadio 2* → tumore primario di dimensioni maggiori di 7 cm localizzato in sede intrarenale. Sopravvivenza a 5 anni dell'88%.
- *Stadio 3* → tumore primario esteso alla vena renale, alla ghiandola surrenale, alla fascia di Gerota o con il coinvolgimento di un linfonodo loco-regionale. Sopravvivenza a 5 anni del 59%.
- *Stadio 4* → tumore primario esteso esternamente alla fascia di Gerota o con il coinvolgimento di più di un linfonodo loco-regionale. Sopravvivenza a 5 anni del 20% [Cohen e McGovern, 2005; Lam et al., 2009].

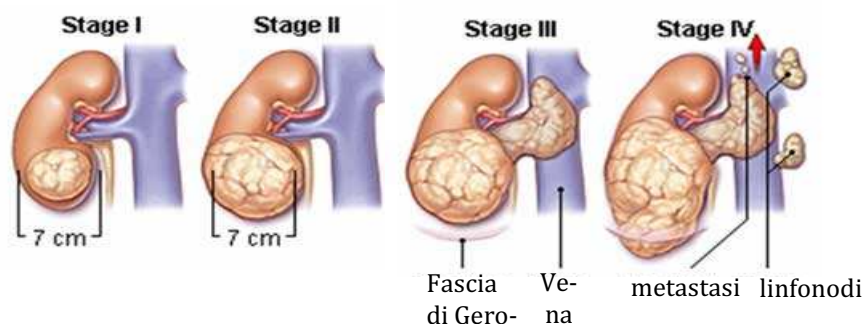


Figura 2. Stadiazione del RCC.

Dall'1 al 3% dei tumori renali risultano essere bilaterali; dal 25 al 40% dei casi il RCC presenta una crescita extrarenale metastatica e un terzo delle lesioni apparentemente localizzate sviluppa metastasi durante il corso post-operatorio.

Le metastasi possono potenzialmente localizzarsi in qualunque sito anatomico; i siti più frequenti sono il parenchima polmonare (dal 50 al 60% dei pazienti con metastasi), le ossa (dal 30 al 40%), il fegato (dal 30 al 40%), il cervello (5%). Più raramente, invece, possono essere coinvolti la tiroide, il pancreas, il muscolo scheletrico, la pelle e i tessuti molli sottostanti [Motzer et al., 1996].

È stata inoltre documentata una vasta gamma di sindromi paraneoplastiche (in circa il 5% dei pazienti) tra cui eritrocitosi, ipercalcemia, disfunzione epatica (sindrome di Stauffer), e amiloidosi. Le loro cause includono sostanze ormono-simili prodotte dal tumore (eritropoietina e ormone paratiroideo) e la formazione di complessi immuni (come nell'amiloidosi e nella nefropatia). La presenza di queste sindromi, però, non implica necessariamente che il RCC sia in stadio avanzato e non controindica la resezione chirurgica di un tumore localizzato [Motzer et al., 1996].

Diagnosi

Le tecniche diagnostiche ad oggi più largamente utilizzate per la diagnosi del RCC sono l'ecografia e la TAC addominale. Esse hanno quasi del tutto sostituito l'urografia endovenosa e l'angiografia, anche se la prima rimane utile nello screening iniziale per accertare le cause dell'ematuria. L'arteriografia, invece, è raramente utilizzata a fini diagnostici, ma viene impiegata prevalentemente nei casi selezionati per la mappatura pre-operatoria della vascolarizzazione, soprattutto quando è prevista una chirurgia non radicale.

Nell'ultimo decennio l'applicazione diffusa della tomografia computerizzata ha portato ad un notevole aumento della diagnosi accidentale del RCC. Questo fatto ha confermato il dato precedente che due terzi dei carcinomi renali rilevati in una serie di studi autoptici su pazienti nel decennio 1958-1969 non erano stati diagnosticati clinicamente. L'aspetto più importante di questi casi è riscontrabile nel fatto che i tumori scoperti incidentalmente sono in genere significativamente più piccoli di quelli che producono i sintomi specifici e hanno quindi più ampie probabilità di essere asportati prima che metastatizzino, migliorando notevolmente la prognosi [Motzer et al., 1996].



Figura 3. TAC addominale che evidenzia la presenza di una massa tumorale a carico del rene destro (indicata dalla freccia) [modificata da Rathmell et al., 2010].

L'accuratezza della tomografia computerizzata nel definire l'estensione di un tumore in fase preoperatoria è di circa il 90%. A questa tecnica sono stati però riconosciuti dei limiti nella valutazione del minimo ingrossamento dei linfonodi regionali e del grado di estensione craniale del tumore nella vena cava. Questo perché, mentre i linfonodi regionali di più di 2 cm di diametro sono quasi sempre coinvolti con metastasi, i linfonodi compresi tra 1 e 2 cm possono essere interessati (oltre che da metastasi) da iperplasia reattiva. Pertanto, la presenza di questo tipo di ingrossamento dei linfonodi non preclude il trattamento chirurgico. Il coinvolgimento della ghiandola surrenale omolaterale, invece, ha un'incidenza complessiva di circa il 4% e, nella maggior parte dei casi, è associato con una grande estensione loco regionale della lesione e con malattia già metastatica.

La risonanza magnetica con gadolinio per via endovenosa, infine, è più efficace della tomografia computerizzata nella valutazione della vena cava inferiore quando è sospettato il suo coinvolgimento. La risonanza magnetica è utile anche per individuare masse renali quando il materiale di contrasto non può essere somministrato per via endovenosa, a causa di allergie a tale materiale o di insufficienza renale [Motzer et al., 1996].

Terapia

Il RCC in stadio avanzato è caratterizzato da una scarsa risposta alla terapia sistemica e da un tasso di sopravvivenza a 5 anni inferiore al 20% [Schuetz et al., 2005].

La resezione chirurgica (nephrectomia) rimane il trattamento d'elezione per il carcinoma renale anche in caso di evidenza di malattia metastatica, consentendo il controllo della sintomatologia, riducendo il dolore e il sanguinamento delle vie urinarie dal rene interessato, e migliorando anche la sopravvivenza media.

La chirurgia, in base all'estensione della malattia e alla situazione clinica del paziente, può essere effettuata secondo diverse modalità:

- *nephrectomia radicale* (asportazione del rene, del surrene, del grasso perirenale e della capsula di Gerota, di parte dell'uretere e dei linfonodi locoregionali);
- *nephrectomia semplice* (asportazione del solo rene);
- *nephrectomia parziale o enucleazione* (nei tumori di piccole dimensioni);
- *nephrectomia* per via laparoscopica [Cohen e McGovern, 2005].

Per quanto riguarda, invece, la terapia farmacologica, la chemioterapia convenzionale nel RCC metastatico ha dato scarsi risultati (tasso di risposta medio del 4-6%), poiché esso risulta resistente sia alla convenzionale chemioterapia che alle terapie ormonali [Lam et al., 2005].

Fino ad oggi, l'immunoterapia ha rappresentato il trattamento di elezione per la cura di questa neoplasia. L'immunoterapia consiste nella somministrazione sottocutanea di farmaci che stimolano il sistema immunitario ad attivarsi contro le cellule estranee come quelle tumorali. L'utilizzo di interferone alfa ricombinante e/o di interleuchina-2 (da soli o in associazione a farmaci citotossici, come ad esempio il 5-fluorouracile) sono stati in grado di determinare regressioni parziali della malattia della durata di circa 4-6 mesi. Tuttavia, questo tipo di trattamento è associato a gravi problemi di tossicità sistemica e i maggiori benefici clinici sono stati osservati solo in pazienti con prognosi già favorevole [Costa e Drabkin, 2007; Facchini et al., 2009].

Sono inoltre in corso di studio trattamenti innovativi quali ad esempio il trapianto allogenico di cellule staminali eseguito dopo la somministrazione di un trattamento ablativo midollare che provoca un potente effetto antitumorale e sembra promettente per il trattamento del RCC a cellule chiare [Cohen e McGover, 2005].

Grazie alla scoperta di specifici marcatori tumorali, sono in corso numerosi studi rivolti alla comprensione della patogenesi, del comportamento e della biologia molecolare del RCC, al fine di potenziare la diagnosi precoce, permettere una migliore predizione della prognosi del tumore ed ottimizzare la sopravvivenza dei pazienti tramite lo sviluppo di nuove terapie e il

miglioramento di quelle attuali, che mirino a colpire in modo specifico i meccanismi di insorgenza e di progressione tumorale (quali la transizione epitelio-mesenchimale) [Facchini et al., 2009].

UKRAIN

Il farmaco antitumorale Ukrain (NSC 631570) (UK) è un composto semisintetico derivato dall'alcaloide chelidonina, il principale componente estratto dalla pianta *Chelidonium majus*, membro della famiglia delle Papaveracee [Kretmair, 1950], con effetti antispasmodici, analgesici e simili a quelli della papaverina [Jellin et al., 2000].

Ukrain consiste di una molecola di acido tiofosforico coniugata con tre molecole di chelidonina (Figura 4), e viene principalmente somministrato per via intravenosa, sebbene siano stati riportati effetti collaterali indesiderati [Ernst e Schmidt, 2005].

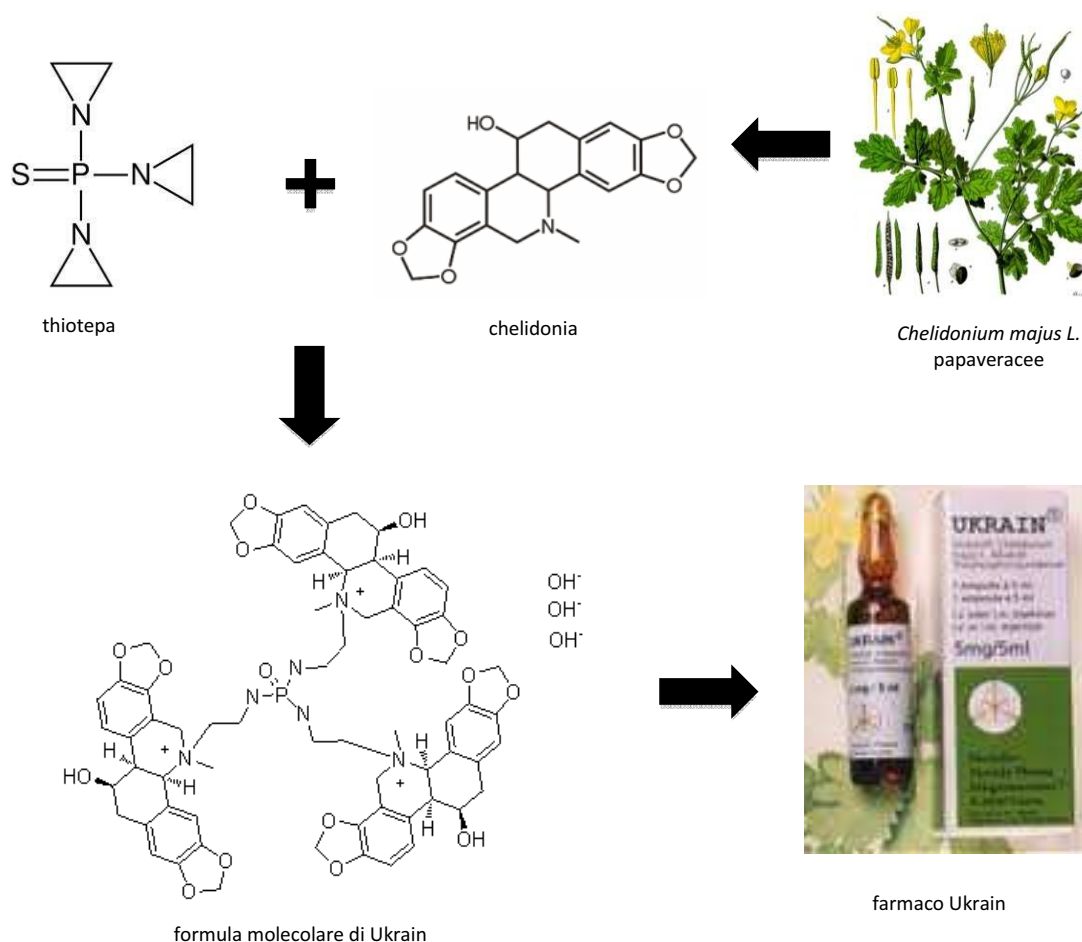


Figura 4. Composizione chimica del farmaco Ukrain.

Questo farmaco è attualmente in uso nella pratica clinica in diversi stati dell'ex Unione Sovietica [Ernst e Schmidt, 2005].

La ricerca sugli effetti terapeutici di Ukrain è iniziata circa 20 anni fa. Sebbene prevalgano in letteratura gli studi clinici, soprattutto recentemente sono stati effettuati numerosi studi *in vitro*, esperimenti in modelli animali e case report, al fine di caratterizzare i meccanismi biologici alla base della sua attività. Complessivamente, i dati emersi da questi studi suggeriscono che Ukrain svolge attività antineoplastica su un ampio numero di linee cellulari tumorali e tumori [Ernst e Schmidt, 2005], ma il suo preciso meccanismo d'azione rimane tuttora sconosciuto [Mendoza et al., 2006].

Studi *in vitro* hanno evidenziato un promettente effetto anti-neoplastico di Ukrain, con azione selettiva nei confronti delle cellule tumorali, senza effetti collaterali su cellule e tessuti sani [Hohenwarter et al., 1992]. Altri studi hanno evidenziato che Ukrain è in grado di inibire la crescita *in vitro* di alcuni tipi cellulari tumorali inducendone l'apoptosi. Inoltre, Ukrain svolge anche un'azione come immunostimolatore, favorendo quindi una risposta contro lo sviluppo tumorale, e come agente antiproliferativo bloccando il ciclo cellulare nella fase G2/M.

Evidenze sperimentali suggeriscono che l'azione di Ukrain sia mediata dall'interferenza con il metabolismo delle cellule tumorali, riducendo la sintesi di DNA, RNA e proteine, inibendo il consumo di ossigeno cellulare e inducendo l'apoptosi nelle cellule maligne [Nowicky et al., 1996; Ernst e Schmidt, 2005; Gagliano et al., 2007]. Inoltre, è stato osservato che Ukrain è anche in grado di espletare un'azione anti-mitotica su cellule di carcinoma [Panzer et al., 2000].

Studi in modelli sperimentali animali hanno confermato le proprietà antineoplastiche di Ukrain, che inibisce la crescita tumorale e la formazione di metastasi nel topo.

Infine, alcuni studi clinici hanno suggerito che Ukrain, somministrato come singolo farmaco o in combinazione con la chemioterapia convenzionale, esercita effetti benefici nel trattamento di una vasta gamma di tumori solidi, incluso il carcinoma renale [Ernst e Schmidt, 2005].

TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMALE

Sia l'insorgenza che la progressione di molti carcinomi, tra cui anche il RCC, è determinata dal processo noto come transizione epitelio-mesenchimale [Lee et al., 2006].

Il termine transizione epitelio-mesenchimale (EMT) definisce una serie di eventi attraverso i quali le cellule epiteliali perdono molte delle loro caratteristiche epiteliali e acquisiscono un fenotipo mesenchimale [Thiery e Sleeman, 2006].

La EMT è un processo dinamico e finemente regolato, e un evento fondamentale per gli esseri pluricellulari, in quanto permette la formazione di diversi tessuti e organi. Le prime descrizioni di tale processo, *in vitro*, risalgono al 1982, e le prime scoperte si riferiscono a studi sullo sviluppo embrionale. Studi successivi hanno evidenziato che la EMT non solo è importante nell'embriogenesi o nell'organogenesi ma, nell'adulto, anche in molteplici condizioni fisiologiche. Inoltre, la EMT gioca un ruolo chiave anche in alcuni eventi patologici, quali progressione tumorale e fibrogenesi che, pur con esiti molto diversi fra loro, presentano molti steps in comune [Thiery, 2002].

Le cellule *epiteliali* che compongono gli epiteli semplici presentano caratteristiche fenotipiche e morfo-funzionali ben definite:

- si organizzano a formare lamine continue, nelle quali diversi dispositivi giunzionali garantiscono l'adesività fra le cellule stesse, condizione importante per il mantenimento delle caratteristiche strutturali e funzionali di un epitelio;
- sono cellule polarizzate e, pertanto, si riconoscono differenti specializzazioni a livello delle loro porzioni apicale, laterale e basale, che si riflettono in una polarità di organizzazione citoplasmatica ultrastrutturale e funzionale;
- sono cellule scarsamente mobili; i movimenti sono limitatissimi e consentiti solo all'interno dell'epitelio in cui esse sono inserite.

Le cellule *mesenchimali*, al contrario, non si organizzano a formare strutture laminari e fra di loro non si instaurano dispositivi giunzionali stabili, ma solo localizzati punti di adesione focale. Le cellule mesenchimali hanno una forma fusata o stellata, e sono dotate di elevata mobilità [Thiery e Sleeman, 2006], che ne permette la migrazione nell'interstizio circostante mediante diversi meccanismi basati sull'emissione di filopodi e pseudopodi [Friedl, 2004].

Durante la EMT le cellule epiteliali perdono il loro fenotipo per acquisire quello di cellule mesenchimali. Durante questo processo, esse si riorganizzano perdendo alcuni marcatori del loro fenotipo epiteliale, e ne esprimono altri caratteristici del fenotipo mesenchimale acquisito.

Si verifica pertanto una “riprogrammazione” molecolare dell’epitelio, con nuove istruzioni per la cellula. Si può parlare di “proteoma della EMT”.

Il marcatore chiave della EMT è la down-regolazione della caderina E. Infatti, la perdita delle fasce aderenti, e del conseguente rapporto col citoscheletro, sembra essere l’evento che favorisce la realizzazione dell’intero processo. La diminuzione della caderina E inizia precocemente. Vengono down-regolate anche le proteine delle tight junctions, come la ZO1 (proteina della *zonulae occludens*) che, in particolare, interagisce con diverse proteine transmembrana (come l’occludina), e con componenti delle giunzioni aderenti e gap.

FSP1 (Ca²⁺ - binding protein fibroblast specific protein 1) è una proteina legante il calcio specifica dei fibroblasti. Recentemente è stata però messa in dubbio la sua specificità quale marcatore di EMT. L’actina muscolare di muscolo liscio (α SMA) è un tipico marcatore di EMT. Bisogna tuttavia tener presente che è espressa nei miofibroblasti (cioè i fibroblasti attivati), e non nei fibroblasti, e a volte non in tutti.

Le gelatinasi MMP-2 e 9 sono importanti marcatori di EMT. Esse sono prodotte dai fibroblasti e risultano up-regolate, favorendo la degradazione delle membrane basali.

La vimentina, una proteina citoscheletrica, viene utilizzata come marcatore di cellula mesenchimale. La sua espressione *de novo* si correla con la down-regolazione delle citocheratine epiteliali. Essa non è però un marcatore specifico, in quanto espressa anche in cellule di tipo diverso come, ad esempio, leucociti e cellule endoteliali, ed in alcuni carcinomi in cui non vi è evidenza di EMT [Zavadil e Bottinger, 2005].

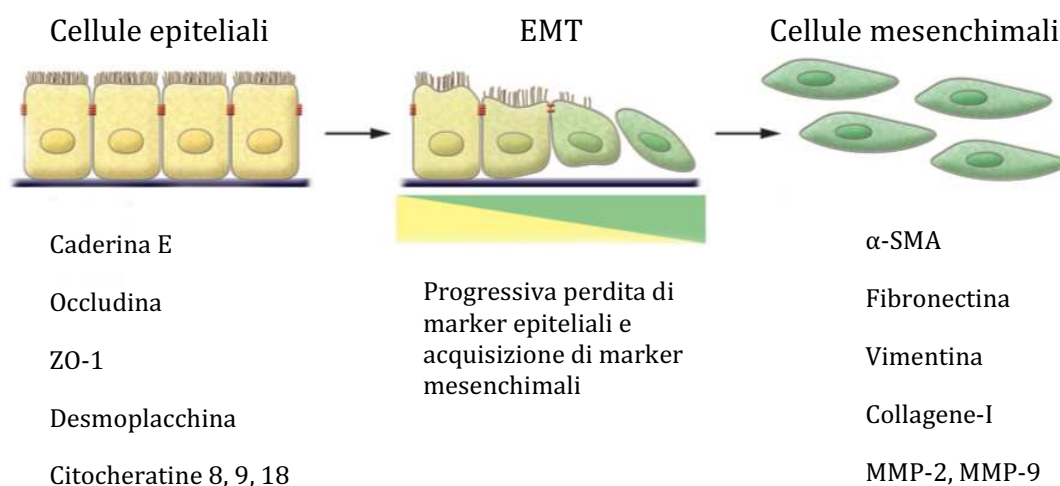


Figura 5. Processo di EMT e marcatori coinvolti [modificata da Kalluri e Weinberg, 2009].

Classificazione della EMT

La EMT si può verificare in tre condizioni biologiche distinte con esiti funzionali differenti fra loro; è stata pertanto proposta una classificazione della EMT in tre diversi sottotipi a seconda del contesto biologico in cui essa si verifica, che prendono il nome di EMT di “Tipo 1”, “Tipo 2”, “Tipo 3” (Figura 6) [Kalluri e Weinberg, 2009].

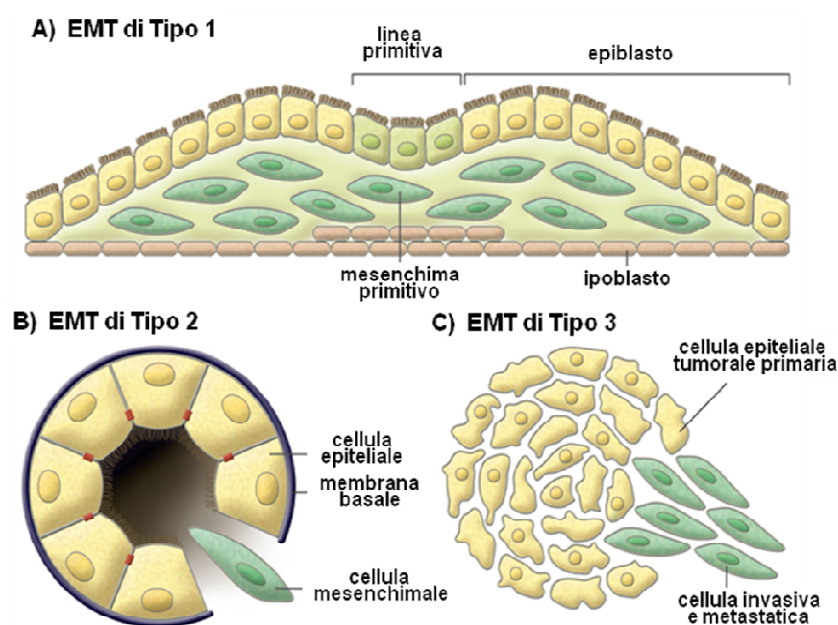


Figura 6. Rappresentazione della classificazione dei sottotipi di EMT: Tipo 1 (A), Tipo 2 (B), Tipo 3 (C) [modificata da Kalluri e Weinberg, 2009].

EMT di Tipo 1

Nei primissimi stadi dell'embriogenesi, l'impianto dell'embrione e l'inizio della formazione della placenta sono entrambi associati ad una EMT che coinvolge l'endoderma. In particolare, le cellule del trofoblasto, precursori del citotrofoblasto, vanno incontro a EMT per facilitare l'invasione dell'endometrio e il conseguente corretto impianto dell'embrione. Durante lo sviluppo embrionale anche la fase di gastrulazione è interessata dal processo di EMT, attraverso il quale si arriva alla formazione dei tre foglietti embrionali [Vicovac e Aplin, 1996], e le cellule epiteliali del neuroectoderma danno origine, sempre tramite EMT, a cellule migratorie della

cresta neurale. A livello biochimico la EMT associata a questi processi di sviluppo è dipendente dal signaling di Wnt, mediato dal TGF- β [Kalluri e Weinberg, 2009].

EMT di Tipo 2

Questo tipo di EMT è associato alla fibrosi degli organi, processo che interessa alcuni tessuti epiteliali ed è mediato da cellule infiammatorie e fibroblasti che rilasciano una certa quantità di segnali pro-infiammatori, così come componenti della matrice extracellulare come collagene, laminina, elastina, fibronectina, e tenascina.

Gli organi interessati dalla EMT di Tipo 2 e dal processo di fibrogenesi sono soprattutto il rene, il fegato, i polmoni e l'intestino, spesso in associazione ad una condizione di infiammazione cronica [Potenta et al., 2008].

Durante la EMT di Tipo 2, le cellule epiteliali degli organi interessati continuano a mantenere una morfologia epiteliale e l'espressione di marcatori molecolari come citocheratine e caderina E, esprimendo allo stesso tempo il marcatore mesenchimale FSP1 (proteina specifica dei fibroblasti) e α -SMA (l'isoforma α dell'actina di muscolo liscio). Si trovano quindi in uno stadio intermedio definito "EMT parziale" [Kalluri e Weinberg, 2009].

La condizione infiammatoria può richiamare cellule come macrofagi e fibroblasti residenti attivati che si accumulano nel sito danneggiato e rilasciano fattori di crescita, come TGF- β , PDGF, EGF e FGF che stimolano l'EMT. Queste cellule rilasciano anche chemochine e metalloproteinasi della matrice.

Sotto l'influenza di queste molecole segnale le cellule epiteliali, insieme alle cellule infiammatorie, inducono la degradazione del collagene di tipo IV e della laminina della membrana basale, favorendo la migrazione delle cellule trasformate nell'interstizio circostante dove contribuiscono al fenomeno fibrotico [Strutz et al., 2002].

Esperimenti recenti effettuati nel topo hanno dimostrato che anche le cellule endoteliali associate al micro circolo possono contribuire alla formazione di cellule mesenchimali durante la fibrosi, attraverso un processo analogo detto EndMT [Potenta et al., 2008].

EMT di Tipo 3

Questo tipo di EMT è associato alla progressione dei carcinomi e alla metastatizzazione. Durante la progressione tumorale, le cellule di carcinoma, soprattutto quelle presenti al fronte invasivo del tumore primario, mostrano frequentemente una down-regolazione dei marcatori del fenotipo epiteliale e una perdita delle giunzioni intercellulari, risultando nella perdita di polarità tipica delle cellule epiteliali e in una ridotta adesività intercellulare. Tutto ciò è spesso accompagnato da un'aumentata motilità cellulare e dall'espressione di marcatori mesenchimali come la vimentina, una proteina dei filamenti intermedi, e la caderina N [Lang et al., 2002; Thiery, 2003]. Vengono up-regolate anche altre proteine citoscheletriche, come l' α SMA, la γ -

actina, la β -filamina e la talina, così come altre componenti della matrice extracellulare come la fibronectina ed il collagene [LaGamba et al., 2005]. L'up-regolazione di queste proteine può facilitare la formazione di pseudopodi e il rimodellamento del citoscheletro. Vengono, infine, up-regolate anche le MMPs, che permettono alle cellule tumorali di invadere il microambiente circostante e di dar luogo a metastasi a distanza. La EMT si configura, quindi, come un prerequisito per originare cellule tumorali capaci di infiltrare i tessuti circostanti e di metastatizzare (Figura 7). Tuttavia i tumori sono costituiti da una popolazione cellulare altamente eterogenea e in alcuni casi molti carcinomi invasivi e metastatici non sono sottoposti ad una completa transizione ad un fenotipo mesenchimale, ma bensì possiedono le caratteristiche molecolari e morfologiche tipiche di un epitelio ben differenziato, esprimendo alti livelli di caderina E, e presentando giunzioni epiteliali e polarità apicale-basolaterale [Christiansen e Rajasekaran, 2006]. Questo può essere dovuto al fatto che le cellule di carcinoma maligno possono iniziare una parziale EMT e revertire da mesenchimali a epiteliali nei siti di metastasi distali secondo un processo detto MET (transizione mesenchimale-epiteliale); infatti, questi tumori secondari nei siti distali mantengono le stesse caratteristiche istopatologiche del tumore primario, senza mostrare fenotipo mesenchimale [Kalluri e Weinberg, 2009].

Un'altra ragione può essere che le cellule possono usare modi alternativi di infiltrazione e metastasi, come la migrazione collettiva, in cui i carcinomi invasivi invadono i tessuti circostanti sotto forma di aggregati multicellulari o clusters. In quest'ultimo caso, le cellule localizzate all'interno dell'aggregato vengono protette dall'ambiente esterno e quindi anche dagli attacchi immunologici. Inoltre, le giunzioni epiteliali nei carcinomi metastatici ben differenziati possono formare una barriera fisica che restringe l'accesso di farmaci o anticorpi al sito tumorale, diminuendo quindi l'efficacia terapeutica. Queste evidenze mostrano che la transizione ad un fenotipo maligno aggressivo non è un evento "tutto o nulla" [Christiansen e Rajasekaran, 2006].

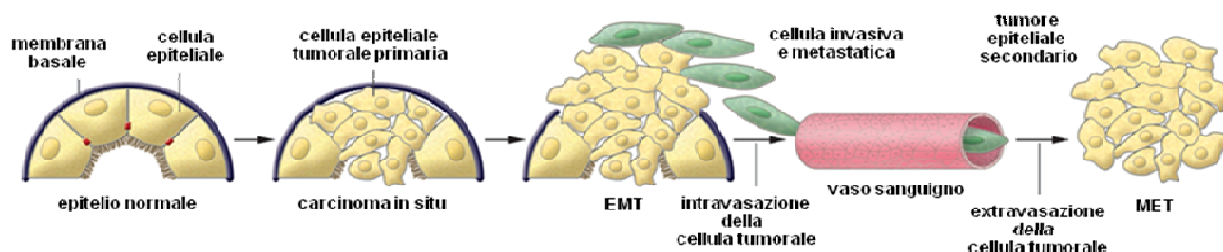


Figura 7. Figura rappresentativa delle fasi della EMT nella progressione tumorale [modificata da Kalluri e Weinberg, 2009].

Regolazione della EMT

La EMT è attivata da alcuni segnali extracellulari derivanti dall'interazione delle cellule con componenti della matrice extracellulare, come il collagene e l'acido ialuronico, e con fattori di crescita solubili come il TGF- β , l'FGF e l'EGF. Questo provoca, a livello intracellulare, l'attivazione di molecole effettrici come Ras, Src, MAPK, Rho e Rac che, a loro volta, provocano il disassemblaggio dei complessi giunzionali e i cambiamenti nell'organizzazione del citoscheletro che avvengono durante la EMT.

Due dei principali target di Ras e MAPK sono Snail e Slug, proteine contenenti domini zinc-finger, le quali inibiscono l'espressione dei geni che contengono E-box nella regione del promotore, come le caderine E e le proteine delle giunzioni occludenti, quali le occludine e le claudine [Christiansen e Rajasekaran, 2006]. Il principale target di questi regolatori trascrizionali è il gene che codifica per la caderina E, un importante marcatore del fenotipo epiteliale. La sua down-regolazione porta alla perdita dei complessi giunzionali epiteliali dipendenti dalla caderina E, con la conseguente liberazione della β -catenina, una proteina delle giunzioni aderenti che normalmente si trova legata alla caderina E, che può migrare nel nucleo dove funziona come fattore di trascrizione in grado di attivare i pathways di Wnt [Thiery e Sleeman, 2006], che a sua volta attiva geni target mediante stabilizzazione della β -catenina nel nucleo.

Il signaling del TGF- β è uno di quelli maggiormente caratterizzati. Esso si basa su meccanismi Smad-dipendenti attraverso i quali si verifica la fosforilazione di SMAD2 e SMAD3 che subito legano SMAD4 promuovendone la traslocazione nel nucleo, dove attivano il co-repressore trascrizionale SIP-1, il quale agisce come Snail e Slug inibendo geni contenenti sequenze E-box [Christiansen e Rajasekaran, 2006; Cano et al., 2010]. Nella carcinogenesi, la via di signaling del TGF- β gioca un ruolo chiave ma con effetti differenti, in quanto nelle prime fasi inibisce la proliferazione cellulare, mentre nelle fasi avanzate favorisce la formazione di metastasi inducendo la EMT [Cano et al., 2010].

Anche il fattore NF- κ B è implicato nella EMT, in quanto promuove l'espressione del fattore di trascrizione Twist, il quale a sua volta lega le sequenze E-box e down-regola la caderina E. NF- κ B può anche promuovere l'espressione di proteine mesenchimali in quanto lega sequenze regolatrici nel promotore della vimentina, una proteina dei filamenti intermedi [Christiansen e Rajasekaran, 2006].

COMPLESSO CADERINA E/ β -CATENINA

Le giunzioni aderenti

Numerosi processi biologici che coinvolgono lo sviluppo degli organismi pluricellulari, dipendono in buona parte da precisi e controllati meccanismi di adesione e comunicazione cellulare. Questi meccanismi, tramite la formazione di contatti cellula-cellula e cellula-matrice, portano alla formazione di strutture ordinate, come quella presente negli epiteli, che sono alla base della formazione e dell'organizzazione di tessuti e organi. Uno dei più importanti tipi di giunzione cellulare, presente sia negli invertebrati che nei vertebrati, è rappresentata dalle giunzioni aderenti [Gooding et al., 2004].

Le giunzioni aderenti sono particolarmente abbondanti fra le cellule epiteliali, e nel muscolo cardiaco. Negli epiteli le giunzioni aderenti possono percorrere l'intero perimetro della cellula con una disposizione "a cintura", prendendo il nome di zonula o fascia aderente, o distribuirsi a "moneta" in punti di piccola estensione, prendendo il nome di macula aderente o desmosoma. La struttura della fascia aderente comprende le interazioni tra glicoproteine transmembrana della superfamiglia delle caderine e i membri della famiglia delle catenine: β -catenina e α -catenina, che prendono poi rapporto con i filamenti del citoscheletro cellulare (Figura 8).

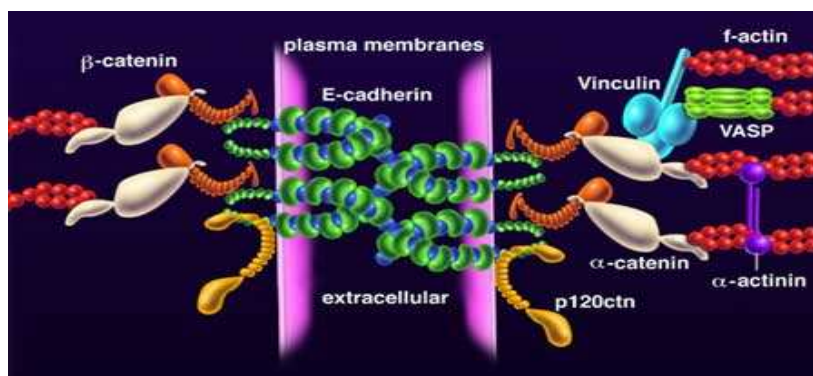


Figura 8. Struttura delle fasce aderenti.

Struttura molecolare della super famiglia delle caderine

Le caderine costituiscono una famiglia di glicoproteine di membrana, composte da un dominio extracellulare responsabile delle interazioni cellula-cellula, un dominio idrofobico transmembrana, e un dominio citoplasmatico che prende rapporto con il citoscheletro attraverso l'interazione con un complesso di β -catenina (92 kDa) o γ -catenin/plakoglobin (83 kDa), α -catenina (102 kDa) e vinculina (117 kDa). La maggior parte delle caderine sono a singolo passaggio transmembrana. Le eccezioni includono la caderina T (nota anche come caderina H), che è legata alla membrana plasmatica attraverso un'ancora lipidica di glicosil-fosfatidilinositolo, e le caderine Flamingo, che presentano sette passaggi transmembrana.

Quando non legato alla β -catenina, il dominio citoplasmatico della caderina assume funzioni non strutturali. Oltre alla sua funzione nell'adesione infatti, il complesso caderina/ β -catenina svolge anche un ruolo centrale nella via di trasduzione Wnt.

Le caderine giocano un ruolo chiave nelle interazioni cellula-cellula calcio dipendenti ed inoltre sono implicate in una serie di vie di trasduzione del segnale che regolano attivamente la vita cellulare. La principale caratteristica dei membri della famiglia delle caderine sono uno o più domini extracellulari ripetuti leganti il calcio (EC). Questi domini consistono in ripiegamenti di circa 110 aminoacidi contenenti motivi con sequenze conservate DRE, DXNDNAPXF e DXD. Il calcio è essenziale per la funzione adesiva delle caderine e per la loro protezione contro la digestione da parte delle proteasi. Studi strutturali hanno dimostrato che questo è dovuto al fatto che gli ioni calcio si legano a specifici residui in ogni dominio extracellulare per garantirne il corretto ripiegamento, conferendo così rigidità al dominio stesso.

Nell'organismo in via di sviluppo, l'espressione di ciascun membro della famiglia delle caderine è regolamentato spazio-temporalmente in modo da essere correlato con gli eventi morfogenetici in cui è coinvolto. Inoltre, data l'importanza delle caderine nell'adesione, nella polarità funzionale, e nei meccanismi di trasduzione del segnale, l'interruzione della funzione di queste proteine ha implicazioni significative in molte condizioni patologiche, incluso il cancro [Wheelock e Johnson, 2003; Gooding et al., 2004].

Classificazione delle caderine

Sono state identificate più di 100 proteine che possono essere collocate nella super-famiglia delle caderine. Sulla base della composizione dei domini proteici, dell'organizzazione genomica e della struttura globale e molecolare, la superfamiglia viene a sua volta suddivisa in sei sottogruppi. Questi includono: caderine di Tipo I (classiche), di Tipo II, caderine desmosomiali, protocaderine, caderine a sette domini transmembrana (Flamingo) e caderine FAT-like. Inoltre, sono state identificate anche numerose caderine atipiche che non rientrano in nessuno di questi gruppi (Tabella 1).

Caderine di tipo I - classiche: comprendono le caderine -E, -N, -P, -R, -H, -EP. Nelle fasce aderenti mediano l'adesione cellula-cellula e cellula-matrice. Sono composte da cinque domini extracellulari ripetuti in tandem (EC1 - EC5), un singolo dominio transmembrana e una coda citoplasmatica altamente conservata che si lega specificamente a proteine della famiglia delle catenine. Il dominio EC1 comprende nella sua porzione N-terminale il tripeptide conservato His-Ala-Val (sequenza HAV), essenziale nelle interazioni omotipiche mediate da questa famiglia di caderine. Studi strutturali sul dominio EC1 da diverse caderine di tipo I hanno dimostrato che il tripeptide HAV e gli aminoacidi circostanti mediano la auto-associazione della caderina attraverso l'interazione con un set separato di aminoacidi all'interno dell'EC1 della caderina sulla cellula adiacente.

Un pre-dominio (di circa 80 aminoacidi) all'inizio del dominio EC1 deve essere scisso per consentire l'attivazione della funzione adesiva. La scissione avviene ad opera delle convertasi della famiglia delle subtilisine/furine che rivelano una sequenza di circa 130 aminoacidi, la cui funzione è appunto quella di ostruire stericamente l'interfaccia adesiva.

Caderine di tipo II: (caderina -VE, -K, -7, -12, -18, -19, -20), sono espresse nelle cellule che interagiscono fra loro con legami meno stabili e sono quindi responsabili di una adesione intercellulare più debole. Le caderine di tipo II sono inoltre più specifiche per determinati tipi cellulari rispetto alle caderine di tipo I, in particolare durante lo sviluppo embrionale. Anche questa sottoclasse presenta cinque domini extracellulari e una coda citoplasmatica altamente conservata, ma il primo dei domini EC manca della sequenza HAV necessaria invece nell'adesione di tipo I. La coda citoplasmatica di tipo II è anch'essa in grado di interagire con la β -catenina, anche se la forza di questa interazione è significativamente inferiore a quella osservata nelle caderine di tipo I.

Caderine desmosomiali: forniscono l'adesione mediata dalle macule aderenti o desmosomi (in particolare in quelle sottoposte a sollecitazioni meccaniche) e sono collegate con i filamenti intermedi delle cellule. Ci sono due sottofamiglie di caderine desmosomiali: le desmocolline

(DSC, 90 - 100 kDa) e le desmogleine (DSG, 130-165 kDa). Ciascun gruppo è ulteriormente suddiviso in tre sottotipi, che sono espressi in modo cellula-specifico e differenziazione-specifico. Sia le DSC che le DSG sono composte da quattro domini nella porzione extracellulare (EC1 - EC4), un segmento extracellulare prossimale alla membrana plasmatica, un dominio transmembrana e un dominio citoplasmatico. La porzione C-terminale delle DSG è più lunga di quella delle caderine classiche e contiene una regione ricca di prolina, un dominio unico terminale e un dominio di grandi unità ripetute con funzione sconosciuta. Le DSC contengono una coda citoplasmatica di splicing alternativo che dà origine ad una forma "a" più lunga e ad una forma "b" più breve.

Protocaderine: sono una grande sottofamiglia di proteine di adesione calcio dipendenti caderina-like altamente espresse nelle sinapsi del sistema nervoso centrale. Queste proteine possiedono fino a sette domini extracellulari che non hanno le caratteristiche dei domini delle caderine classiche in quanto è stato studiato che la funzione principale delle protocaderine non è l'adesione cellula-cellula, ma la determinazione della specificità nelle interazioni cellulari e nella trasduzione del segnale.

Caderine Flamingo: queste caderine mediano anch'esse l'adesione omotipica e sono coinvolte soprattutto nella creazione della polarità cellulare. Il dominio extracellulare di queste proteine è composto da nove unità ripetute, il dominio centrale presenta sette passaggi transmembrana e la coda citoplasmatica non forma legami con le catenine.

Caderine FAT: strutturalmente contengono 34 domini ripetuti extracellulari. Il dominio citoplasmatico contiene sequenze omologhe alla regione che lega la β -catenina presente nelle caderine classiche. Date le grandi dimensioni della porzione extracellulare, è stato suggerito che le caderine FAT svolgano un ruolo "sensore" probabilmente coinvolto nella repulsione cellula-cellula che ponga un freno alla proliferazione cellulare.

Caderina T - o caderina-13: un membro unico all'interno della superfamiglia delle caderine, condivide l'organizzazione dei domini extracellulari con le caderine classiche, ma manca del dominio transmembrana e delle regioni citoplasmatiche. Presenta invece un'ancora di glicosilfosfatidilinositolo (GPI), tramite la quale rimane adesa alla membrana plasmatica. La caderina T media l'adesione calcio dipendente ma non è limitata ai contatti cellula-cellula; recentemente infatti è stato suggerito che possa mediare anche la segnalazione cellulare [Gooding et al., 2004].

Superfamiglia	Numero di domini EC	Dominio citoplasmatico	Legame con le catenine
Tipo I (Classiche)			
Caderina E (1)	5	Tipo C	Sì
Caderina N (2)	5	Tipo C	Sì
Caderina P (3)	5	Tipo C	Sì
Caderina R (4)	5	Tipo C	Sì
Caderina H (13)	5	Tipo C	Sì
Caderina 15	5	Tipo C	Sì
Caderina EP	5	Tipo C	Sì
Caderina C	5	Tipo C	Sì
Caderina DE (Drosophila)	6	Tipo C	Sì
Tipo II			
Non possiedono la sequenza HAV			
Caderina VE (5)	5	Tipo C	Sì
Caderina K (6)	5	Tipo C	Sì
Caderina 7	5	Tipo C	Sì
Caderina 8	5	Tipo C	Sì
Caderina 9	5	Tipo C	Sì
Caderina 10	5	Tipo C	Sì
Caderina OB (11)	5	Tipo C	Sì
Caderina 12	5	Tipo C	Sì
Caderina 18	5	Tipo C	Sì
Caderina 19	5	Tipo C	Sì
Caderina 20	5	Tipo C	Sì
Caderina 24	5	Tipo C	Sì
Caderine desmosomiali			
Desmocollina 1-3	5	Tipo D	Sì
Desmogleina 1-3	5	Tipo D	Sì
Protocaderine			
α -protocaderina	6	Tipo P	No
β -protocaderina	6	Tipo P	No
γ -protocaderina	7	Tipo P	No
Pcdh1 (caderina-like 1)	7	Tipo P	No
Pcdh2	?	Tipo P	No
Pcdh3	6	Tipo P	No
Pcdh7 (BH protocaderina)	7	Tipo P	No
Pcdh8	6	Tipo P1	No
Pcdh9	6	Tipo P/P2	No
Pcdh10	6	Tipo P	No
Pcdh11	7	Tipo P	No
Pcdh18	6	Tipo P	No
Pcdh19	6	Tipo P	No
Papc	6	Tipo P2	No
NF-protocaderina (Xenopus)	?	Tipo P3	No
CNRs	6	Tipo P4	No
Caderine a sette passaggi transmembrana (Flamingo)			
Fmi (Xenopus, Drosophila, umana)	9	Tipo S	No
Celsr1 (topo)	9	Tipo S	No
Caderine FAT-like			
FAT (Drosophila)	34 ²	Tipo F	Sì
FAT (umana-hFAT1 e hFAT2)	34	Tipo FH	Sì
Dachsous (Drosophila)	27	Tipo FD	Sì
Caderine uniche			
Caderina T	5	No	No

Tabella 1. Classificazione dei componenti della superfamiglia delle caderine e loro caratteristiche [modificata da Gooding et al., 2004].

Caderina E

La caderina E è la principale caderina presente nelle fasce aderenti dei tessuti epiteliali. Come precedentemente descritto, è una glicoproteina a singolo passaggio transmembrana che appartiene alla famiglia delle caderine classiche (Figura 9). Il suo dominio citoplasmatico lega proteine che regolano la sua endocitosi, il riciclaggio e la degradazione, e mediano la trasduzione del segnale, la trascrizione del gene stesso, e il controllo locale del citoscheletro di actina. All'interno del dominio citoplasmatico sono presenti 2 domini di legame (CBD) che comprendono un dominio juxtamembrana di 94 aminoacidi (JMD) che lega la catenina P-120, e un'estesa regione al C-terminale che lega la β -catenina.

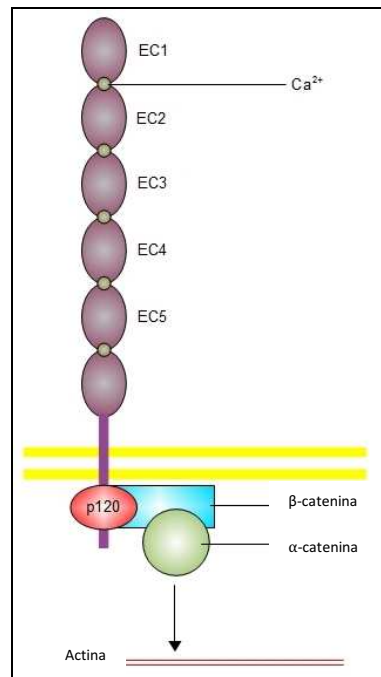


Figura 9. Struttura molecolare della caderina E.

La down-regolazione della caderina E è uno degli eventi chiave che caratterizzano la EMT ed è generalmente considerato un indicatore clinico di cattiva prognosi e metastasi.

Le fasce o zonule aderenti rivestono un ruolo fondamentale durante il processo di EMT, che induce importanti modificazioni a carico della caderina E. Studi in letteratura hanno dimostrato che la caderina E è un determinante del fenotipo epiteliale. Essa viene down-regolata durante la EMT e, *in vivo*, è stata dimostrata una correlazione fra la sua down-regolazione e la perdita del fenotipo epiteliale [Wheelock e Johnson, 2003]. La perdita di caderina E è un evento necessario, anche se non sufficiente, perché si verifichi la EMT. L'importanza della perdita di caderina E è stata ulteriormente confermata dalla dimostrazione che la sua produzione *de novo* in cellule in corso di EMT, ripristina stabili contatti cellula-cellula ed il fenotipo epiteliale, promuovendo quindi la formazione dei desmosomi e di complessi giunzionali stabili [Vleminckx et al., 1991].

I meccanismi molecolari alla base della down-regolazione della caderina E non sono completamente noti, ma si ipotizza che possa avvenire mediante una regolazione epigenetica o mutazione occasionale. Nel primo caso si verificano una ipermetilazione del promotore ed il legame ad esso di repressori; nel secondo caso si verifica la produzione di una proteina non funzionante, o la sua non produzione [Peinado et al., 2004; Huber et al., 2005].

Regolazione della caderina E

L'integrità strutturale del complesso caderina-catenina è regolata dalle chinasi, le quali risultano spesso up-regolate durante lo sviluppo e nella carcinogenesi. Tre residui di serina nel dominio citoplasmatico della caderina E vengono fosforilati dalla chinasi GSK3 β (glicogeno sintasi chinasi β) causando un aumento dell'affinità e del numero di interazioni con la β -catenina. Se invece la fosforilazione avviene sui residui di tirosina della β -catenina, ad opera della Src, si ha la rottura del legame con la caderina. L'attività di queste chinasi è bilanciata da quella delle fosfatasi [Nelson, 2008].

Anche il legame della catenina p120 alla regione iuxtamembrana del dominio citoplasmatico della caderina E è regolato dalla fosforilazione, la quale aumenta l'affinità di legame alla caderina E stessa. La catenina p120 aumenta la ritenzione del complesso della caderina alla membrana plasmatica e previene l'internalizzazione e la degradazione della caderina E [Hartsock e Nelson, 2008]. La perdita di questa stabilità è correlata alla progressione e all'invasione tumorale.

La caderina E può essere regolata sia a livello trascrizionale, sia a livello post-traduzionale. La repressione trascrizionale è mediata da una serie di fattori di trascrizione come Snail, Slug, ZEB1, ZEB2 e Twist. L'attivazione di questi repressori può portare a silenziamento epigenetico, ad esempio attraverso il richiamo di HDAC (istone deacetilasi) al promotore della caderina E,

che induce deacetilazione. Inoltre, in una grande varietà di tumori umani il gene della caderina E è altamente ipermetilato [Yilmaz e Christofori, 2009]. In entrambe le situazioni ciò che ne risulta è una down-regolazione della caderina E.

A livello post-traduzionale, il trasporto della caderina E di nuova sintesi alla membrana cellulare può essere inibito attraverso la O-glicosilazione. In alternativa, la caderina E può essere degradata da taglio proteolitico o endocitata. Attraverso taglio proteolitico possono prodursi frammenti della caderina E che esercitano funzioni di segnalazione. Ad esempio, il taglio mediato dalla γ -secretasi produce un frammento citoplasmatico C-terminale (CTF2) che viene trasportato nel nucleo in maniera catenina p120-dipendente. Nel nucleo CTF2 modula l'interazione tra catenina p120 e un repressore trascrizionale (Kaiso), modificando ad esempio la sopravvivenza cellulare [Ferber et al., 2008; Yilmaz e Christofori, 2009]. Altri frammenti noti derivanti da digestione proteolitica della caderina E sono CTF1 e CTF3. Il primo deriva dall'attività proteolitica delle MMPs a livello dell'interfaccia tra le regioni intra ed extracellulari della proteina, mentre il secondo rappresenta il frammento C-terminale di minor peso molecolare che si forma, ad esempio, per azione della caspasi-3 [Ferber et al., 2008].

Un possibile meccanismo di degradazione della caderina richiede, in seguito alla fosforilazione mediata da Src, l'azione di una E3-ubiquitina ligasi, detta Hakai, la quale lega la caderina E provocandone l'internalizzazione [Hartsock e Nelson, 2008; Nelson, 2008]. L'endocitosi può avvenire attraverso meccanismi clatrina o caveolina-dipendenti.

β -catenina

La β -catenina è una proteina citoplasmatica costituita da 13 ripetizioni di un caratteristico dominio “armadillo” che formano una tripla α -elica. Essa lega il dominio citoplasmatico C-terminale della caderina E.

La β -catenina è un componente essenziale sia del complesso proteico delle fasce aderenti, ma anche nella trasduzione del segnale associata a Wnt, una importante cascata di eventi implicata in numerosi processi di sviluppo cellulare. La struttura primaria della β -catenina comprende: un dominio N-terminale di 130 aminoacidi, un dominio centrale di 12 ripetizioni non omologhe di 42 aminoacidi (denominate “braccia”), e un dominio C-terminale di 100 aminoacidi.

La porzione N-terminale contiene siti di fosforilazione multipla che sono correlati con la down-regolazione della proteina stessa. Mutazioni di questi siti di fosforilazione possono produrre una proteina più stabile e quindi costitutivamente attiva. Il dominio C-terminale contiene invece il dominio di attivazione trascrizionale per la via di trasduzione del segnale di Wnt. In particolare, la β -catenina citosolica può legarsi al fattore di trascrizione Tcf/Lef in seguito ad attivazione da parte di Wnt e mediare la trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare, migrazione e invasione [Willert e Nusse, 1998].

A differenza della moltitudine delle diverse varianti tessuto specifiche delle caderine, la β -catenina è una proteina altamente conservata evolutivamente [Shapiro e Weis, 2009].

Proprio in virtù della stretta associazione che le catenine hanno con le caderine, rivestono anch'esse un ruolo importante nella patogenesi e nella progressione tumorale.

Quando, durante la EMT, si verificano la down-regolazione della caderina E e la disgregazione della zonula aderente, la β -catenina viene liberata dal complesso caderina E/ β -catenina e rilasciata nel citoplasma. Essa può traslocare nel nucleo e influenzare i processi di trascrizione, come precedentemente descritto.

CITOSCHELETRO ACTINICO

Il citoscheletro di actina è una struttura altamente dinamica e gioca un ruolo importante nel regolare la plasticità della membrana plasmatica, la migrazione cellulare e la forma della cellula [Pollard e Borisy, 2003; Yilmaz e Christofori, 2009].

Esso è costituito da microfilamenti di actina, che si formano per polimerizzazione di unità monomeriche di actina globulare (G-actina), una proteina che lega l'ATP. Dopo l'accrescimento del filamento l'ATP viene idrolizzato in ADP.

I microfilamenti sono caratterizzati da una polarità strutturale in quanto presentano un'estremità chiamata "barbed end", dove avviene preferenzialmente la polimerizzazione con aggiunta di G-actina-ATP, ed un'estremità chiamata "pointed end", in cui prevalgono i fenomeni di depolarizzazione del filamento.

Nelle cellule epiteliali i microfilamenti si dispongono tipicamente in fasci corticali subito al di sotto della membrana cellulare (Figura 10).

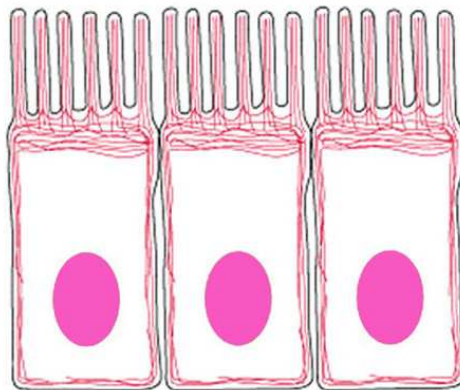


Figura 10. Disegno rappresentativo del pattern di distribuzione dei microfilamenti in cellule epiteliali. I filamenti di actina (in rosso) si dispongono a formare i fasci corticali subito al di sotto della membrana plasmatica e, nel caso siano presenti microvilli, si portano a formare l'asse di tali specializzazioni apicali.

L'actina gioca un ruolo chiave non solo nel fornire un'impalcatura che favorisce il mantenimento della forma della cellula, ma anche nei meccanismi di motilità cellulare, in quanto rappresenta il componente principale dei dispositivi che le cellule usano per migrare su di un substrato. Tali dispositivi sono i filopodi, i lamellipodi, i podosomi, e gli invadopodi (Figura 11).

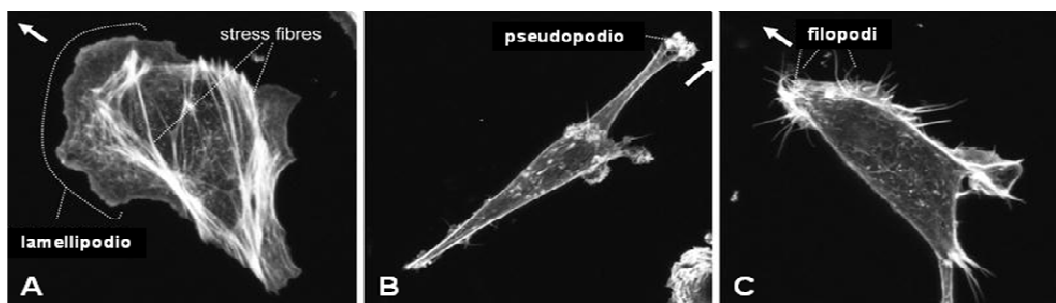


Figura 11. Microfotografie che mostrano la diversa organizzazione dei filamenti di actina in tre diverse cellule tumorali che si muovono su di un substrato. Le immagini mostrano sul fronte di migrazione della cellula la presenza di un lamellipodio (A), di uno pseudopodio (B), e di filopodi (C) [modificata da Olson e Sahai, 2009].

Queste strutture sono coinvolte nella formazione delle adesioni focali, le quali costituiscono il sistema di interazione cellula-matrice, che permette alla cellula di esercitare una trazione sul suo substrato e, quindi, di produrre la forza necessaria per il movimento.

Le adesioni focali sfruttano la presenza delle integrine, proteine di adesione transmembrana che ancorano da una parte la matrice extracellulare, e dal lato citoplasmatico il citoscheletro di actina, il quale si organizza a formare le stress fibers, costituite da filamenti contrattili di actina e miosina II, a cui si legano varie proteine, tra cui l' α -actinina. La loro formazione viene stimolata da RhoA, che attiva ROCK che, a sua volta, fosforila la catena leggera della miosina favorendone l'associazione ai filamenti di actina. I membri della famiglia delle Rho GTPasi RhoA, Rac1, e Cdc42, sono responsabili della trasmissione del segnale per il movimento cellulare e svolgono un ruolo importante anche nella EMT. La loro attivazione è posta sotto il controllo di tre gruppi di proteine regolatorie: guanine nucleotide exchange factors (GEF), GTPase activating proteins (GAP) e guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDI). In particolare le Rho GTPasi sono

attivate dalle GEF e inattivate dalle GAP; le GDI legano Rho-GDP inattivo e prevengono l'interazione con le GEF e quindi l'attivazione [Yilmaz e Christofori, 2009].

I *lamellipodi* sono delle protrusioni piatte nelle quali alla base si localizzano lunghi filamenti di actina non ramificata, arricchiti in tropomiosina e miosina II, che proseguono in un network di actina altamente ramificata procedendo in direzione della base dei filopodi [Yilmaz e Christofori, 2009].

I filamenti di actina polimerizzano dal lato del fronte di avanzamento e depolimerizzano sul lato opposto secondo un processo conosciuto come "treadmilling", nel quale intervengono diverse proteine leganti l'actina:

- la cofilina, che lega il lato del filamento legato all'ADP, favorendone la depolimerizzazione;
- la profilina, che lega l'actina monomericamente e contribuisce ad aumentare il rate di treadmilling;
- le proteine capping, che legano le barbed ends dei filamenti di actina ad alta affinità [Le Clainche e Carlier, 2008].

La ramificazione laterale è principalmente controllata dal complesso Arp2/3, composto da sette subunità conservate, la cui attività è a sua volta controllata da fattori come i complessi WASP o WAVE richiamati in membrana e attivati da Rac1 e dalla proteina legante l'actina, la cortactina [Le Clainche e Carlier, 2008; Yilmaz e Christofori, 2009].

Nel fronte di avanzamento del lamellipodio la cellula forma delle adesioni che connettono la matrice extracellulare al citoscheletro di actina per ancorare la protrusione [Le Clainche e Carlier, 2008].

L'aumentata espressione di Arp2/3 e WAVE2 è correlata, nel cancro al seno e al fegato, con una prognosi infausta, sottolineando l'importanza di strutture come i lamellipodi nella progressione tumorale [Yilmaz e Christofori, 2009].

I *filopodi* sono delle estensioni digitiformi formate da fasci di actina non ramificati strettamente impacchettati che penetrano nell'ambiente circostante originando dalla base del lamellipodio, la cui formazione è controllata dalla fascina e dalla Rho-GTPasi Cdc42. I filopodi possono essere considerati come organi di senso della cellula che vengono utilizzati per rilevare segnali come molecole chemoattraenti.

Le cellule metastatiche sono ricche di strutture simili ai filopodi e ciò correla con la loro invasività. La up-regolazione della fascina correla con una cattiva prognosi in diversi tipi di carcinoma, incluso il gastrico, ai polmoni, e al seno [Yilmaz e Christofori, 2009].

Dopo aver creato adesioni tramite lamellipodi e filopodi, per muoversi in avanti la cellula ritrae il “trailing edge” grazie al sistema acto-miosinico e al disassemblaggio delle adesioni al substrato [Le Clainche e Carlier, 2008].

Le due strutture cellulari maggiormente specializzate per l'invasione sono i podosomi e gli invadopodi.

I *podosomi* sono presenti nei macrofagi e nelle cellule endoteliali. Sono strutture altamente dinamiche, puntiformi, ricche in actina e presenti all'interfaccia tra la cellula e il substrato, che si formano nelle fasi iniziali dell'adesione al substrato stesso.

I podosomi sono composti da un core centrale formato da fasci di filamenti di actina posizionati perpendicolarmente rispetto alla membrana, fiancheggiati da un anello contenente proteine di adesione connesse al core da filamenti di actina disposti radialmente [Vignjevic e Montagnac, 2008].

Gli *invadopodi* sono protrusioni digitiformi che si formano sulla superficie ventrale della cellula e che si estendono in profondità nella matrice extracellulare grazie alla loro attività proteolitica (Figura 12) [Vignjevic e Montagnac, 2008]. Sembrano avere un ruolo importante nell'invasione delle cellule tumorali e si formano quindi durante l'EMT. Sono considerati la controparte trasformata dei podosomi, infatti entrambi hanno un core ricco in filamenti di actina contenente il macchinario di assemblamento dell'actina (WASP, cortactina e Arp2/3).

Gli invadopodi mediano la proteolisi della matrice extracellulare nelle cellule tumorali invasive tramite l'espressione delle MMPs, soprattutto MT1-MMP e MMP2 [Yilmaz e Christofori, 2009].

La loro formazione, che può essere stimolata da diversi segnali mediati da EGF, HGF, TGF- β , segue diversi steps:

- un locale arricchimento in actina e cortactina nei siti di contatto tra cellula e matrice richiama la MT1-MMP. Questo step è chiamato pre-invadopodi;
- in seguito si ha ulteriore arricchimento in actina, cortactina e MT1-MMP che porta alla degradazione della matrice e alla formazione di invadopodi maturi e invasivi;
- gli invadopodi tardivi sono caratterizzati dalla dispersione dell'actina e cortactina lasciando una struttura ricca di MT1-MMP che mantiene la degradazione della matrice [Yilmaz e Christofori, 2009].

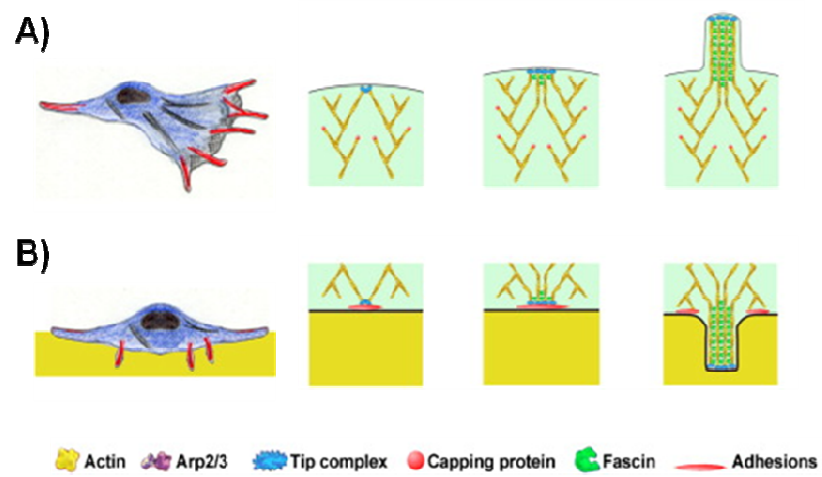


Figura 12. Rappresentazione schematica della morfologia, della struttura e delle proteine coinvolte nella formazione di filopodi (A) e invadopodi (B) [modificata da Vignjevic e Montagnac, 2008].

VIMENTINA

La vimentina è una proteina del citoscheletro appartenente alla famiglia dei filamenti intermedi espressa nelle cellule di origine mesenchimale; la rapida induzione di vimentina è stata frequentemente osservata durante la EMT.

Numerosi studi hanno dimostrato che l'aumentata espressione di vimentina nei carcinomi correla con i parametri di potenziale maligno come il grado di incidenza del tumore e la sopravvivenza. Le cellule di carcinoma che esprimono la vimentina sono quelle del carcinoma renale, polmonare, ovarico, mammario, prostatico, dell'endometrio, della tiroide, e delle ghiandole salivari [Islam et al., 2000].

METALLOPROTEINASI della MATRICE (MMPs)

Le metalloproteinasi della matrice (MMPs), note anche come matrixine, sono una famiglia di proteasi zinco-dipendenti che agiscono a livello extracellulare a pH neutro [Birkedal-Hansen et al., 1993; Nagase e Woessner, 1999]. Nei vertebrati, attualmente, si conoscono 28 tipi diversi di MMPs e in base alla specificità di substrato, all'omologia di sequenza e all'organizzazione dei diversi domini proteici, si possono distinguere sei gruppi (Tabella 2):

Classificazione delle MMPs

Collagenasi interstiziali: rappresentate dalla collagenasi 1 (MMP-1) prodotta dai fibroblasti; dalla collagenasi 2 (MMP-8), tipica dei polimorfonucleati neutrofili; dalla collagenasi 3 (MMP-13) e dalla collagenasi 4 (MMP-18) (*Xenopus*). Le MMPs appartenenti a questo gruppo principalmente degradano il collagene interstiziale di tipo I, II, III, VII e X. Tuttavia, possono digerire anche altre molecole appartenenti alla ME e non.

Gelatinasi: gelatinasi A (MMP-2) e gelatinasi B (MMP-9). Degradano il collagene di tipo IV, V, VII, la fibronectina, l'elastina e la gelatina (cioè il collagene denaturato). La MMP-2, ma non la MMP-9, degrada anche il collagene di tipo I, II, e III [Visse e Nagase, 2003].

Stromelisine: tipo 1 (MMP-3) e 2 (MMP-10). Hanno simile specificità di substrato, ma la MMP-3 è dotata di una maggiore attività proteolitica rispetto alla MMP-10. Oltre a digerire diversi componenti della ME, la MMP-3 svolge un importante ruolo nell'attivazione di diverse MMPs in forma proenzimatica, in particolar modo la sua azione è fondamentale nel convertire la forma parzialmente attivata della MMP-1 nella forma attiva. La stromelisina di tipo 3 (MMP-11) è dotata di specificità di substrato e di sequenza che differiscono dalla MMP-3, e per tale motivo spesso viene considerata a parte.

Matrilisine: 1 (MMP-7) e 2 (MMP-26). Hanno un'ampia specificità di substrato e degradano fibronectina, laminina, proteoglicani, e le regioni non-elicoideali del collagene IV. La MMP-7, in particolare, provvede alla processazione di diverse molecole di superficie come la pro- α -defensina, il ligando del Fas, il pro-tumor necrosis factor α (pro-TNF α) e la caderina E.

MMPs di membrana: (MT-MMP) sono sei: quattro proteine transmembrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16 e MMP-24) e due ancorate a residui di glicosil-fosfatidil-inositolo (MMP-17 e MMP-25). Ad eccezione della MT-MMP-4 (MMP-17), sono tutte in grado di attivare la MMP-2. Inoltre

digeriscono vari componenti della ME e la MT-MMP-1 (MMP-14) mostra attività collagenolitica sul collagene di tipo I, II e III.

L'ultimo gruppo comprende tutte le MMPs che non vengono classificate nelle precedenti categorie: sono, ad esempio, la metalloelastasi (MMP-12), la MMP-19, la enamelisina (MMP-20) e la epilisina (MMP-28).

Sottoclasse	Enzima	MMP	Substrati
	Collagenasi interstiziale	MMP-1	Collagene I, II, III, VII, VIII, X, gelatina, core proteico dei PG
	Collagenasi neutrofila	MMP-8	Come sopra
	Collagenasi-3	MMP-13	Come sopra
	Gelatinasi A	MMP-2	bFGF, collagene I, IV, V, VII, X, XI, elastina, fibrillina, fibronectina, gelatina, laminina, core proteico dei PG
	Gelatinasi B	MMP-9	Collagene I, IV, V elastina, fibrillina, gelatina, core dei PG
	Stromelisina-1	MMP-3	Caseina, collagene II, III, IV, V, IX, X, XI, elastina, fibrillina, fibronectina, gelatina, laminina, pro-MMP-1, pro-MMP-8, pro-MMP-9, pro-MMP-13, PG, tenascina, vitronectina
	Stromelisina-2	MMP-10	Come sopra
	Stromelisina-3	MMP-11	α -antiproteasi
	Matrilisina-1	MMP-7	Collagene IV, gelatina, fibronectina, laminino, proteoglicani, pro- α -defensina, pro-TNF α , caderina E
	Matrilisina-2	MMP-26	Collagene IV, gelatina, fibronectina, proMMP-1, PG
	MT-MMP-1	MMP-14	Collagene I, fibrillina, fibronectina, gelatina, pro-MMP-2, pro MMP-13, PG, tenascina
	MT-MMP-2	MMP-15	fibronectina, gelatina, pro-MMP-2, pro MMP-13, tenascina
	MT-MMP-3	MMP-16	Collagene III, fibronectina, gelatina, pro-MMP-2
	MT-MMP-4	MMP-17	sconosciuto
Altre	Metallo-elastasi	MMP-12	Collagene IV, fibronectina, fibrillina, elastina, vitronectina

Tabella 2. Classificazione dei componenti della famiglia delle MMPs indicante la specificità di substrato.

Struttura molecolare delle MMPs

Le MMPs sono costituite da vari domini molecolari, ciascuno dotato di una specifica funzione (Figura 13). In tutte le MMPs è presente, partendo dall'estremità N-terminale, un *peptide segnale* che determina la secrezione della proteina, il *propeptide*, che contiene una breve sequenza amminoacidica specifica delle MMPs (PRCG[V/N]PD) indispensabile per il corretto svolgimento del processo di attivazione, e il *dominio catalitico*, che presenta il sito di legame per un atomo di zinco.

Inoltre tutte le MMPs, con la sola eccezione della MMP-7, presentano in prossimità del terminale carbossilico un dominio con sequenza omologa all'emopexina o alla vitronectina. Le gelatinasi (MMP-2, MMP-9) sono inoltre caratterizzate da domini fibronectino-simili, importanti per la specificità di substrato, e la sola MMP-9 ha un dominio collagene-simile. Le MT-MMPs, infine, presentano un dominio transmembrana accompagnato da una sequenza citoplasmatica (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24) oppure un dominio di legame al glicosil-fosfatidil-inositolo (MMP-17, MMP-25) [Nagase e Woessner, 1999].

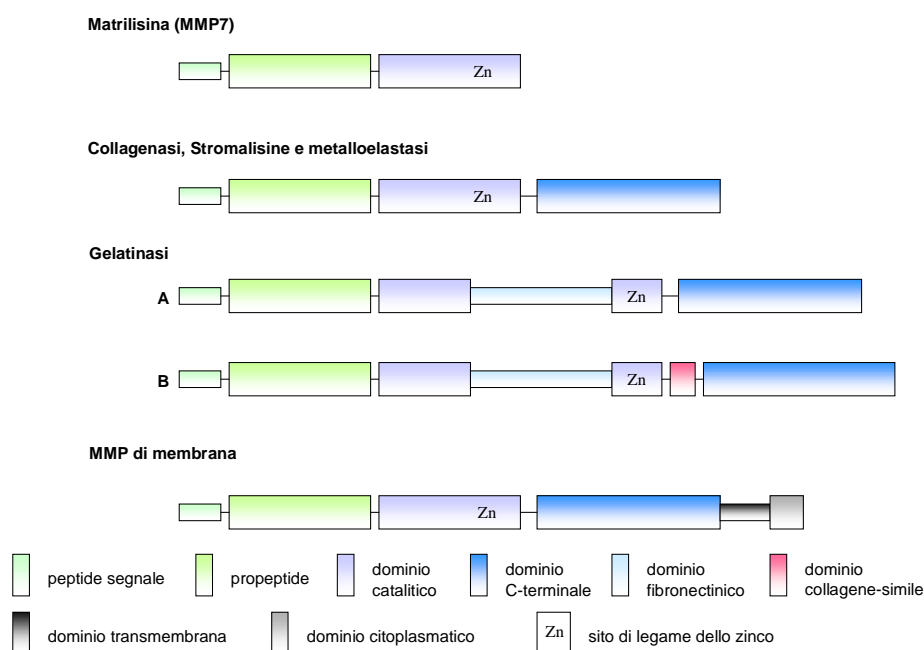


Figura 13. Struttura molecolare delle diverse MMPs.

Attivazione delle MMPs

Tutte le MMPs vengono sintetizzate come pre-pro-enzimi e la maggior parte di esse viene secreta dalle cellule come pro-enzimi inattivi. Il processo di attivazione può procedere secondo tre differenti modalità:

- attivazione extracellulare;
- attivazione sulla superficie cellulare;
- attivazione intracellulare.

Attivazione extracellulare

Le MMPs sono attivate *in vivo* da altre proteinasi ed *in vitro* da vari agenti chimici come il glutatione ossidato, il sodio-dodecil-solfato (SDS), la N-metilmaleimide ed il cloruro mercurico. L'attivazione proteolitica delle MMPs (Figura 14) procede in modo graduale ed inizia con la rimozione di una prima parte del propeptide (porzione N-terminale di 84 aminoacidi) a formare un intermedio parzialmente attivato. Il propeptide così destabilizzato viene quindi completamente rimosso ad opera di altre MMPs attive o parzialmente attivate, principalmente dalla MMP-3, che rimuovono inoltre 15 aminoacidi all'estremità C-terminale [Visse e Nagase, 2003].

La via di attivazione più rilevante, *in vivo*, è quella mediata dalla plasmina. La plasmina deriva dal plasminogeno per azione dell'attivatore tissutale del plasminogeno legato alla fibrina, e dell'urochinasi (uPA), legato invece ad uno specifico recettore sulla superficie cellulare (uPAR). Il fatto che queste molecole siano associate alla membrana determina la localizzazione del processo di attivazione delle MMPs e della conseguente degradazione della matrice extracellulare. È stato dimostrato che la plasmina attiva la proMMP-1, proMMP-7, proMMP-9, proMMP-10 e proMMP-13.

Il processo di attivazione graduale rappresenta un fine meccanismo di regolazione dell'attività di degradazione della matrice extracellulare da parte delle MMPs, in quanto un particolare gruppo di polipeptidi, gli inibitori tissutali delle MMPs (TIMPs), possono interferire con l'attivazione interagendo con gli intermedi parzialmente attivati.

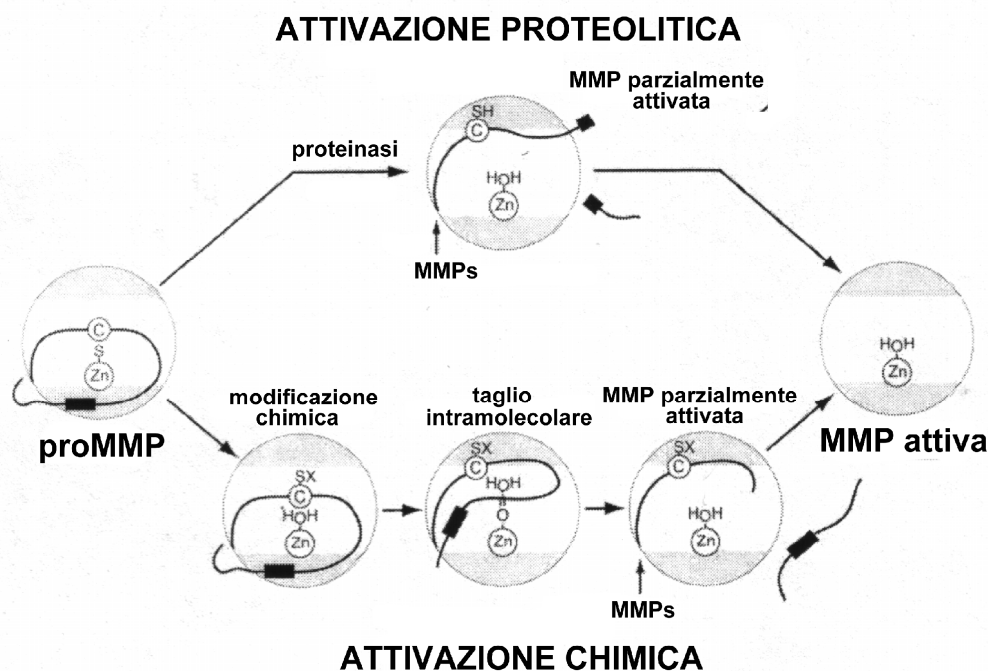


Figura 14. Schema illustrante le fasi del processo di attivazione delle MMPs.

Attivazione intracellulare

È stato dimostrato che alcune proMMPs, come la proMMP-11 [Pei e Weiss, 1995], le proMT-MMPs, la proMMP-23 e la proMMP-28, presentano nel dominio C-terminale una sequenza di riconoscimento per la furina, che permette l'attivazione intracellulare ad opera di questo enzima. La regolazione dei processi dipendenti dall'attività di questo gruppo di MMPs dipende quindi dalla regolazione dell'espressione genica e dall'interazione con inibitori endogeni [Visse e Nagase, 2003].

Attivazione sulla superficie cellulare

Il processo di attivazione della proMMP-2 e della proMMP-13 ha luogo anche sulla superficie cellulare ed è mediato dalle MMPs di membrana, con la sola eccezione della MT-MMP-4. L'attivazione ad opera della MT-MMP-1 è il fenomeno meglio caratterizzato ed è unico nel suo genere poiché richiede la presenza del TIMP-2. Infatti la proMMP-2, attraverso il dominio emopexinico, interagisce con il terminale carbossilico del TIMP-2 e questo, a sua volta, si lega ad una molecola di MT-MMP-1. La MT-MMP-1, inibita dall'interazione col TIMP-2, funge quindi da recettore per la proMMP-2. Questo complesso MT-MMP-1/TIMP-2/proMMP-2 viene quindi

presentato ad un'altra molecola di MT-MMP-1 vicina che procede all'attivazione dello zimogeno eliminando il propeptide. Il dominio emopexinico della MT-MMP-1 permette il clustering delle molecole sulla superficie cellulare, evento che facilita il processo di attivazione. Infatti, la massima attivazione della pro-MMP-2 si ha per un rapporto TIMP-2/MT-MMP-1 di 0.05, il che significa che più molecole di MT-MMP-1 libere possono circondare il complesso ternario MT-MMP-1/TIMP-2/proMMP-2. L'attivazione della pro-MMP-2 ad opera della MT-MMP-2 invece è indipendente dal TIMP-2.

Regolazione dell'attività delle MMPs

Alla luce di quanto esposto, si può evincere come la regolazione delle MMPs possa avvenire a livelli diversi (Figura 15):

- regolazione della trascrizione: l'espressione dei geni delle MMPs è controllata da numerose citochine che agiscono sia in modo positivo, stimolandone la trascrizione, sia in modo negativo, inibendola. Nei fibroblasti è stato evidenziato che l'interleuchina 1 (IL-1), il tumor necrosis factor α (TNF- α) e gli esteri del forbolo, come il 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA), sono in grado di stimolare la trascrizione delle collagenasi e delle stromelisine inducendo i fattori di trascrizione c-jun e c-fos (AP1) che interagiscono con i TPA responsive element (TRE) e i siti per AP1 presenti a livello del promotore. Il transforming growth factor- β (TGF- β), invece, ne inibisce l'espressione, inducendo un fattore di trascrizione della famiglia di fos che si lega a livello di una sequenza, detta TGF- β inhibitory element (TIE) posta a monte del promotore. Quindi, in base alle vie di trasduzione del segnale che vengono attivate e alle caratteristiche genetiche e ambientali della cellula, le proteine della famiglia di AP1 possono sia cooperare che contrastarsi durante la transattivazione dei geni delle MMPs. A differenza delle altre MMPs, la gelatinasi A (MMP-2), invece, manca nel proprio promotore di sequenze per transattiviatori noti come pure della sequenza TIE. Ne consegue che l'espressione della MMP-2 non è inibita dal TGF- β ma, al contrario, lievemente stimolata [Corcoran e Stetler-Stevenson, 1995].
- regolazione post-trascrizionale: è stato dimostrato che la regolazione di alcune MMPs può avvenire anche mediante modulazione della stabilità del messaggero. È il caso della MMP-2 in cui TPA e TGF- β alterano l'emivita dell'mRNA. Per le collagenasi e le stromelisine, invece, la stabilità del trascritto è mediata da IL-1, TNF- α , come pure dal TPA e dal fattore di crescita dell'epidermide (EGF) [Corcoran e Stetler-Stevenson, 1995].

- regolazione dell'attivazione: è un processo particolarmente complesso che coinvolge la regolazione delle diverse proteine che partecipano all'attivazione (plasminogeno /plasmina, attivatori del plasminogeno e relativi inibitori, nonché i TIMPs) [Hay, 1991].
- inibizione dell'attività proteolitica: avviene ad opera principalmente dei TIMPs, che si legano al sito attivo di queste proteine in rapporto stechiometrico 1:1, inibendo così la loro attività. Oltre ad inibirne l'attività, i TIMPs agiscono anche impedendo la conversione da forma inattiva a forma attiva di queste proteasi, grazie ad un legame a livello del dominio C-terminale [Harris et al., 1984]. È da considerare, infine, che il TGF- β 1 agisce indirettamente anche a questo livello, aumentando l'attività di tali inibitori.

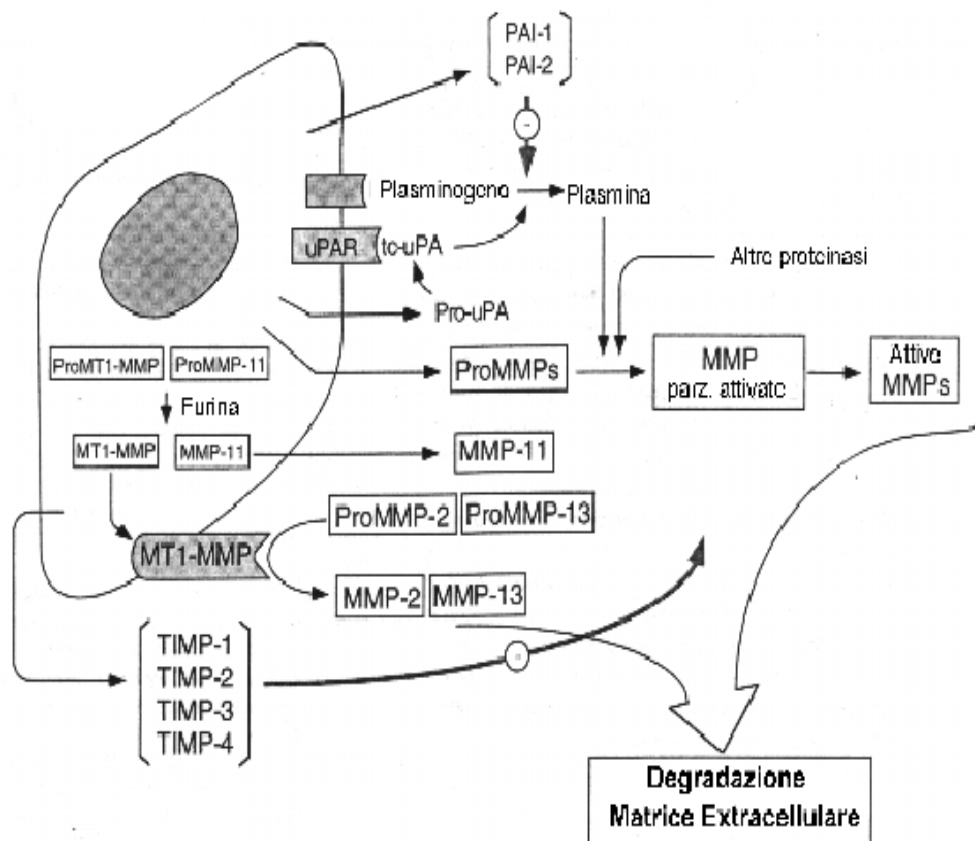


Figura 15. Attivazione e regolazione delle MMPs.

MMPs ed invasività tumorale

Durante l'invasione tumorale, la digestione ed il rimodellamento della ME dei tessuti circostanti il tumore gioca un ruolo chiave. Numerosi studi hanno messo in evidenza la correlazione esistente tra elevati livelli di MMPs e aggressività tumorale in numerosi carcinomi umani quali il carcinoma ovarico, del colon, del seno, del polmone, del pancreas, della prostata, e del rene [McCawley e Matrisian, 2000; Catania et al., 2007]. Le MMPs favoriscono l'invasività tumorale degradando le proteine della matrice extracellulare, attivando sistemi a cascata di trasduzione del segnale, e solubilizzando i fattori di crescita che inducono i legami all'interno della matrice stessa. Inoltre, le MMPs possono attivare altri fattori di crescita implicati nella mobilità e nella proliferazione delle cellule tumorali come, ad esempio, il TGF- β [Kessenbrock et al., 2010].

Fra le MMPs, le gelatinasi MMP-2 ed MMP-9 sono le proteasi maggiormente coinvolte, in quanto in grado di degradare il collagene di tipo IV delle membrane basali. In particolare, la MMP-2 è stata indicata quale uno dei principali mediatori dell'invasività tumorale, risulta up-regolata in tumori altamente maligni e inoltre la sua espressione è stata correlata al grado di invasività del tumore stesso [McCawley e Matrisian, 2000].

In particolare, per quanto riguarda il carcinoma renale umano, dati in letteratura suggeriscono che la MMP-2 sia coinvolta nei fenomeni di espansione tumorale associati con la progressione del tumore stesso, con l'invasione del microcircolo, e con la diffusione di metastasi a distanza [Abdel-Wahed et al., 2004].

La MMP-9 risulta anch'essa up-regolata nel RCC e la sua over-espressione correla con una prognosi infausta [Kallakury et al., 2001].

Pertanto, la valutazione dell'espressione di MMP-2 e MMP-9 è di notevole importanza in questa neoplasia, e l'approfondita comprensione del ruolo di queste gelatinasi contribuirebbe notevolmente nella ricerca di nuove strategie terapeutiche per il RCC.

SECRETED PROTEIN ACIDIC AND RICH IN CYSTEINE (SPARC)

La Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC), nota anche come osteonectina, BM40 o proteina 43K, è una glicoproteina di 32 KDa appartenente ad un gruppo di componenti della matrice extracellulare che mediano le interazioni cellula-matrice, ma che non svolgono alcuna funzione strutturale (da qui la definizione di proteine matricellulari) [Lane et al., 1994]. La SPARC, isolata per la prima volta nei tessuti mineralizzati, è espressa in diversi tipi cellulari ed è dotata di molteplici funzioni, fra cui la modulazione dell'attività di vari fattori di crescita e la regolazione del ciclo cellulare. Ha, inoltre, proprietà antiadesive, essendo in grado di modulare le interazioni fra cellule e matrice extracellulare. Gli alti livelli di espressione della SPARC durante le fasi del rimodellamento tissutale suggeriscono un suo coinvolgimento nell'omeostasi dei tessuti connettivi [Lane et al., 1994]. Infatti, nell'adulto è espressa quasi unicamente nei tessuti in fase di cicatrizzazione o di rimodellamento.

Da un punto di vista genetico, la SPARC è codificata da un gene in singola copia posto sul cromosoma 5 (5q31-33), altamente conservato. Il suo promotore manca di un classico TATA box ma contiene ripetuti GC box e diversi elementi responsivi all'adenosin-monofosfato-ciclico (cAMP), alle heat-shock proteins e ai glucocorticoidi [Brekken e Sage, 2001].

La trascrizione di questo gene è influenzata da diversi fattori di crescita. Il TGF- β 1 e l'activina aumentano l'espressione della SPARC di 3-4 volte dopo 24 ore di stimolazione, come pure il fattore di crescita insulino-simile (IGF1) e il PDGF. Il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF2) invece, sopprime l'espressione della SPARC agendo sulla stabilità del messaggero, mentre non ha alcun effetto sul livello di trascrizione. La sua trascrizione è invece inibita da IL-1 e TNF- α [Brekken e Sage, 2001].

Da un punto di vista biochimico e strutturale, la SPARC è una proteina di 298-304 amminoacidi in cui sono riconoscibili tre moduli distinti (Figura 16):

- il primo corrisponde ai 50 residui dell'estremità ammino-terminale ed è dotato di attività inibente la chemiotassi;
- il secondo, invece, noto come dominio follistatina-simile, è costituito dagli 80 amminoacidi centrali ed è responsabile delle attività antiadesiva e antiproliferativa;
- il terzo, infine, è costituito dalla restante regione C-terminale ed è in grado di legare stabilmente ioni calcio. Anch'esso partecipa all'inibizione dell'adesione cellulare e della proliferazione, ma è importante soprattutto per la capacità di legare specifici

componenti della matrice extracellulare (collagene di tipo I e vitronectina) e della superficie cellulare [Brekken e Sage, 2001].

Per quanto riguarda invece il ruolo biologico, è necessario ricordare che, oltre alla funzione antiadesiva e antiproliferativa già citate, è nota la capacità della SPARC di interagire con importanti fattori di crescita e, principalmente, con il PDGF- α e β , il VEGF e, soprattutto, il TGF- β 1. In riferimento a quest'ultimo, è stato dimostrato che cellule mesangiali provenienti da topi knock-out per il gene della SPARC esprimevano livelli inferiori di TGF- β 1 [Francki et al., 1999]. Come queste due molecole interagiscano attualmente non è ancora noto. È noto però che hanno un pattern di espressione simile durante lo sviluppo embrionale e, soprattutto, durante i processi di cicatrizzazione e di rimodellamento tissutale.

Inoltre è stato anche dimostrato che la SPARC agisce come modulatore positivo delle vie di trasduzione del segnale TGF- β 1-dipendenti [Wrana, 2000]. La SPARC sembra essere infine coinvolta in diverse patologie che comportano abnorme deposizione di matrice extracellulare, come i processi fibrotici [Reed e Sage, 1996].

Allo stato attuale, comunque, molte questioni sono ancora da chiarire riguardo alla SPARC. Non è ancora completamente compreso il meccanismo di regolazione del gene e, soprattutto, non sono stati individuati i recettori di membrana attraverso i quali esplica le proprie funzioni, sebbene alcuni dati provino il coinvolgimento sicuro di una tirosina-chinasi di membrana, mediatrice dell'attività antiadesiva, e di un recettore accoppiato a proteine G, responsabile dell'attività antiproliferativa [Motamed e Sage, 1998; Young et al., 1998].

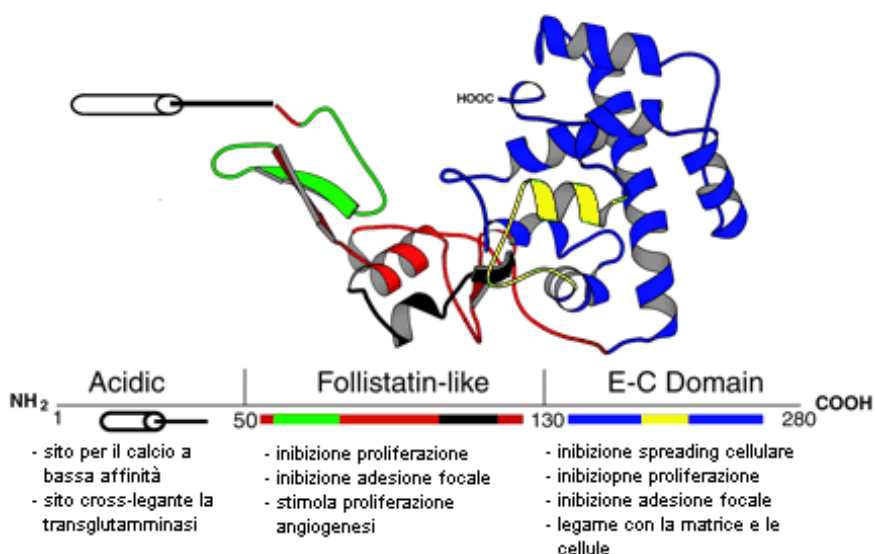


Figura 16. Struttura modulare della SPARC [modificata da Bradshaw e Sage, 2001].

SPARC e proliferazione cellulare

La SPARC è coinvolta nella regolazione di importanti processi biologici quali il differenziamento e la proliferazione cellulare. Essa è infatti un potente inibitore del ciclo cellulare, essendo in grado di bloccare le cellule nelle fasi G0 e G2 (Figura 17), rallentando la loro entrata nel ciclo cellulare stesso. In particolare, è stato dimostrato che la SPARC è in grado di inibire la proliferazione delle cellule di glioma *in vitro* [Rempel et al., 2001], ed è in grado di ritardare la crescita tumorale *in vivo* nel cervello di ratto [Schultz et al., 2002].

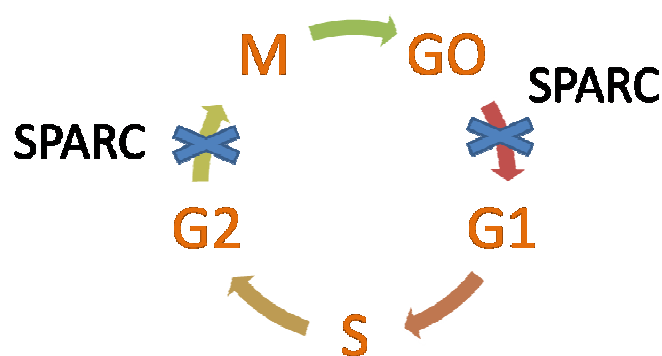


Figura 17. Ciclo cellulare e fasi in cui la SPARC agisce determinando l'inibizione del ciclo cellulare stesso.

L'ipotesi di un coinvolgimento di SPARC quale importante regolatore del ciclo cellulare è stata ulteriormente rafforzata da uno studio in cui è stata dimostrata la presenza della proteina fra i componenti della matrice nucleare [Gooden et al., 1999].

SPARC ed invasività tumorale

La modulazione delle interazioni cellula/matrice extracellulare riveste un ruolo fondamentale nel processo di invasività tumorale. Infatti, grazie alle sue proprietà antiadesive, la SPARC ha un ruolo funzionale importante nel favorire l'invasione delle cellule tumorali nei tessuti circostanti ed essere quindi uno dei fattori chiave in questo processo. Studi precedenti [Reed e Sage, 1996] hanno dimostrato che i livelli di SPARC risultano up-regolati in tumori altamente maligni, suggerendo pertanto, per questa proteina, un ruolo quale marker di invasività tumorale.

Una over-espressione di SPARC è stata riscontrata in molteplici tumori umani, tra cui il melanoma, il glioma, il meningioma, del colon-retto, del seno, carcinomi epatocellulari e i carcinomi renali. Inoltre, l'over-espressione di SPARC correla anche con le metastasi a distanza. Pertanto, l'espressione inappropriata di SPARC nei tessuti tumorali sembra contribuire alla loro progressione, invasione, e capacità metastatica [Sakai et al., 2001]. Nel caso del glioma, la SPARC svolge il ruolo di marcatore del grado di malignità del tumore [Rempel et al., 1999].

APOPTOSI

Il termine apoptosi viene attualmente impiegato per indicare un tipo di morte programmata della cellula. Si tratta di un fenomeno biologico, fisiologico ed estremamente frequente, che interviene in quelle situazioni in cui un organismo multicellulare deve eliminare cellule senescenti e regolare in modo preciso il numero di cellule di un tessuto senza danneggiare strutturalmente il tessuto stesso. L'apoptosi interviene durante l'embriogenesi e la morfogenesi, ed è un processo fisiologico nei tessuti adulti con elevato turnover cellulare, quali il midollo osseo emopoietico ed il fegato, negli organi linfoidi per l'eliminazione dei cloni autoreattivi, e negli organi endocrini.

La morte cellulare per apoptosi si verifica anche in condizioni patologiche, come ad esempio, dopo la radioterapia e chemioterapia per eliminare le cellule danneggiate, dopo infezione da parte di virus, in caso di atrofia tissutale, e nelle cellule neoplastiche.

Il processo di apoptosi è finemente regolato e prevede l'attiva partecipazione della cellula alla sua morte. Si distingue dalla necrosi, che è un fenomeno nettamente patologico. Nella necrosi, infatti, si assiste ad una compromissione grave e rapida del potenziale metabolico della cellula, che diventa incapace di mantenere i gradienti ionici ai lati della membrana cellulare. Si verifica, quindi, un movimento di acqua verso l'interno con rigonfiamento del citoplasma, dei mitocondri e del reticolo endoplasmatico, cui fa seguito la flocculazione della cromatina nucleare e la degradazione aspecifica del DNA. Durante la necrosi, la cellula va incontro a lisi e il contenuto cellulare viene liberato nell'ambiente circostante, con conseguente infiammazione dei tessuti dell'ospite. La necrosi è generalmente dovuta a insulti cellulari importanti, quali quelli prodotti da ischemia, ipotermia ed esposizione ad agenti citotossici.

L'apoptosi, a differenza della necrosi, è una via di morte cellulare indotta da un programma intracellulare strettamente regolato, in cui le cellule destinate a morire attivano enzimi che degradano il proprio DNA e le proteine nucleari e citoplasmatiche.

Durante questo processo, la membrana plasmatica rimane intatta, e la cellula morta per apoptosi viene rapidamente eliminata mediante fagocitosi da parte delle cellule circostanti, prima che il suo contenuto venga riversato all'esterno, evitando in questo modo la reazione infiammatoria dei tessuti dell'ospite (Figura 18).

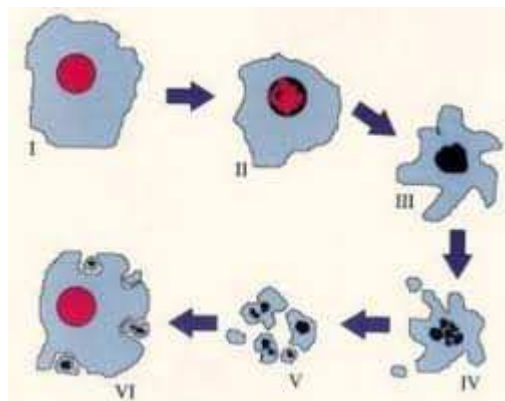


Figura 18. Rappresentazione schematica degli eventi che caratterizzano le modificazioni cellulari durante l'apoptosi (I-V), e fagocitosi dei frammenti cellulari formati da parte delle cellule vicine (VI).

Caratteristiche dell'apoptosi

Dal punto di vista morfologico, le cellule che vanno incontro ad apoptosi sono caratterizzate dalla riduzione del volume cellulare, con addensamento del citoplasma. La cromatina si presenta condensata e, in particolare, si aggrega alla periferia del nucleo, al di sotto della membrana nucleare (Figura 19). Si osserva, infine, la presenza di corpi apoptotici, i quali sono estroflessioni della membrana di varia misura, il cui significato funzionale nell'apoptosi non è ancora stato definito. Sembra che queste strutture siano coinvolte negli eventi di segnalazione provenienti dalle cellule apoptotiche [Gregory e Pound, 2010].

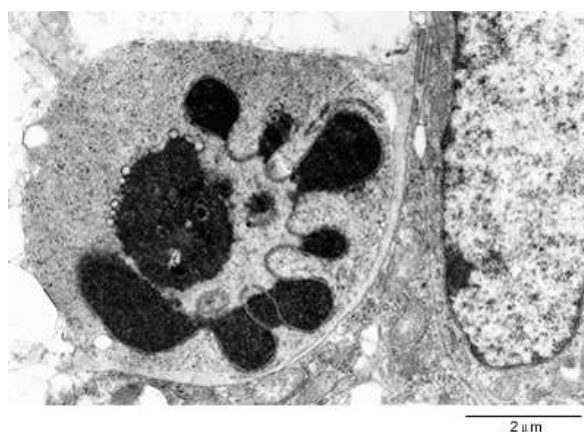


Figura 19. Microfotografia al microscopio elettronico che presenta la condensazione della cromatina in una cellula apoptotica.

Dal punto di vista biochimico, le cellule apoptotiche vanno incontro al clivaggio delle proteine. Si tratta di idrolisi proteica, che coinvolge l'attivazione di diversi membri della famiglia delle cisteina-proteasi, dette caspasi. Esse sono presenti nella cellula normale come proenzimi inattivi che devono essere attivati per indurre apoptosi. Le caspasi attive sono in grado di tagliare molte proteine cellulari vitali, distruggendo l'impalcatura nucleare e il citoscheletro; inoltre, attivano le DNAsi, che degradano il DNA nucleare. Il taglio del DNA in grossi frammenti da parte delle endonucleasi, infatti, è una delle principali caratteristiche dell'apoptosi.

Le cellule apoptotiche presentano modificazioni a carico della membrana plasmatica. Esse, infatti, esprimono la fosfatidilserina, che generalmente si localizza sul foglietto interno del bilayer lipidico, sullo strato esterno della membrana plasmatica, permettendo il legame

dell'Annessina V marcata con FITC, che ne permette l'evidenziazione mediante analisi al microscopio a fluorescenza.

Meccanismi dell'apoptosi

L'apoptosi è indotta da una cascata di eventi molecolari che possono essere innescati in diversi modi e culminare nell'attivazione delle caspasi.

Questo processo può essere suddiviso in una fase di inizio, durante la quale si attivano le caspasi, e in una fase effettrice, in cui questi enzimi agiscono per causare morte cellulare.

L'innescamento si verifica per mezzo di segnali che provengono da due vie distinte ma convergenti: la via estrinseca o la via intrinseca [Kumar et al, 2006].

La **via estrinseca** è quella innescata dai recettori di morte presenti sulla superficie cellulare. Questi recettori sono membri della famiglia dei recettori del fattore di necrosi tumorale (tumor necrosis factor receptor, TNFR) che contengono un dominio citoplasmatico implicato nelle interazioni proteina-proteina, detto dominio di morte. Tra i più conosciuti ricordiamo il TNFR1 e il Fas. Quando il ligando di Fas lega il recettore, tre o più molecole di questo si aggregano e i loro domini di morte citoplasmatici formano un sito di legame per una proteina adattatrice, che contiene anch'essa un dominio di morte ed è chiamata FADD (Fas-associated death domain). Il FADD, a sua volta lega la forma inattiva della caspasi 8 (pro-caspasi 8). Vengono così richiamate molte molecole di pro-caspasi 8 che vanno incontro a un reciproco clivaggio, passando alla forma attiva.

Questa via può essere bloccata da una proteina chiamata FLIP, che pur legando la pro-caspasi 8, non è in grado di clivarla e attivarla.

La **via intrinseca** è detta anche mitocondriale, in quanto è caratterizzata da danni a carico di questi organuli. Fattori di crescita e altri segnali di sopravvivenza stimolano la produzione di proteine anti-apoptotiche della famiglia Bcl-2, di cui le principali sono Bcl-2 e Bcl-xL. Queste proteine anti-apoptotiche in condizioni normali risiedono sulle membrane mitocondriali e all'interno del citoplasma. Se le cellule sono sottoposte a stress o perdono i segnali di sopravvivenza, Bcl-2 e/o Bcl-xL vengono rilasciate dalla membrana mitocondriale e sostituite da membri della famiglia a funzione pro-apoptotica, come Bak, Bax, e Bim. Inoltre, la permeabilità della membrana mitocondriale aumenta e vengono rilasciate diverse proteine in grado di attivare la cascata delle caspasi, come ad esempio il citocromo c. Una volta nel citosol, il citocromo c lega una proteina chiamata Apaf-1 e insieme attivano la caspasi 9.

Un'altra proteina rilasciata è AIF, fattore inducente l'apoptosi, che una volta nel citoplasma lega e neutralizza diversi inibitori dell'apoptosi.

Entrambe le vie di attivazione convergono nella fase effettrice, la quale è mediata dalle caspasi. Queste cisteina-proteasi sono divise in due gruppi, le caspasi iniziatrici e le caspasi effettrici. Le iniziatrici comprendono la caspasi 8 e la caspasi 9, mentre le caspasi 3 e 6 sono effettrici. Le caspasi effettrici agiscono su molte componenti cellulari, clivano le proteine citoscheletriche e quelle della matrice nucleare, distruggendo il citoscheletro e portando alla frammentazione del nucleo. Nel nucleo i bersagli principali sono proteine coinvolte nella trascrizione, nella replicazione e nella riparazione del DNA.

Nelle prime fasi dell'apoptosi, le cellule secernono fattori solubili che reclutano i fagociti; ciò consente una rapida eliminazione delle cellule apoptotiche prima che esse vadano incontro a necrosi secondaria e al rilascio del loro contenuto.

SCOPO dello STUDIO

|

Numerosi studi clinici hanno dimostrato che Ukrain è un farmaco efficace nella terapia di diversi tumori solidi, quali i tumori del colon, del retto, della mammella, della vescica, del pancreas, dell'ovaio, e del rene. Tuttavia, i meccanismi alla base della sua attività anti neoplastica non sono ancora completamente noti.

In questo studio abbiamo caratterizzato *in vitro* l'effetto di Ukrain su cellule di ccRCC, al fine di contribuire alla comprensione dei meccanismi alla base della sua azione terapeutica. A tale scopo abbiamo valutato l'effetto di Ukrain sulla morfologia cellulare, sulla proliferazione, e sui meccanismi di apoptosi.

Considerato il ruolo chiave del processo di EMT nella progressione dei carcinomi, abbiamo caratterizzato il fenotipo delle cellule di ccRCC, e la sua possibile modulazione dopo trattamento con Ukrain, in relazione all'espressione in tali cellule dei marcatori di EMT.

Infine, considerato il ruolo del rimodellamento della matrice extracellulare del microenvironment circostante il tumore, abbiamo analizzato l'espressione della SPARC, una proteina della matrice che non solo è in grado di modulare le interazioni cellula-matrice, ma agisce anche come regolatore del ciclo cellulare.

MATERIALI e METODI

MODELLO SPERIMENTALE

Colture cellulari

Sono state utilizzate tre linee cellulari umane commerciali di carcinoma renale a cellule chiare: Caki-1, Caki-2, e ACHN (ATCC).

Le cellule sono state coltivate in fiasche T75, in terreno di coltura RPMI-1640 addizionato con il 10% di siero bovino fetale (FBS) inattivato al calore (30 minuti a 56°C), glutammina 2 mM, antibiotici (100 U/ml penicillina, 0.1 mg/ml streptomicina), anfotericina B 0.25 µg/ml, e incubate a 37°C con il 5% di CO₂.

Le colture sono state propagate fino ad ottenere il numero di cellule necessario per le diverse valutazioni. La propagazione della coltura prevede, una volta giunta all'80% di confluenza, che le cellule siano sub-coltivate in nuove fiasche T75 per il successivo passaggio in coltura secondo il seguente protocollo:

- il terreno di coltura viene eliminato e le cellule sono lavate con Dulbecco Phosphate Buffer Saline (PBS) per eliminare eventuali residui di di FBS e facilitare in questo modo il distacco delle cellule stesse dalla fiasca;
- la coltura viene incubata con 3 ml di tripsina (tripsina 0.025% + EDTA 0.01% in PBS), a 37°C al fine di ottenere il distacco delle cellule dal substrato;
- la tripsina viene inattivata con 3 volumi di RPMI-1640 completo;
- le cellule sono centrifugate (200 xg per 6 minuti) e, dopo rimozione del surnatante, il pellet ottenuto viene risospeso in RPMI-1640 completo;
- la sospensione cellulare viene trasferita in nuove fiasche T75.

Il terreno delle colture è stato sostituito due volte alla settimana con RPMI-1640 completo.

La vitalità cellulare ad ogni passaggio è stata verificata mediante l'esclusione del Trypan blue, il quale non è in grado di penetrare nelle cellule vive. Esse possono quindi essere distinte da quelle morte, che al microscopio appaiono colorate in blu.

Disegno sperimentale e trattamento con Ukrain

Il farmaco Ukrain è stato fornito dalla ditta produttrice (Nowicky Pharma, Vienna) in soluzione acquosa alla concentrazione di 1 mg/mL.

Per le valutazioni molecolari le cellule sono state coltivate e trattate in fiasche T75. Quando le cellule hanno raggiunto la sub-confluenza in fiasca T75, il terreno di coltura è stato sostituito con RPMI-1640 privo di siero nel quale è stato disciolto il farmaco alle concentrazioni di 5, 10, 20 e 40 μM ; cellule non trattate sono state utilizzate come controllo (CT).

Al termine delle incubazioni di 24 e 48 ore, i terreni di coltura sono stati prelevati e conservati a -20°C . Le cellule sono state recuperate dopo distacco con tripsina-EDTA e processate per le successive analisi. Ogni campione è stato valutato in duplicato.

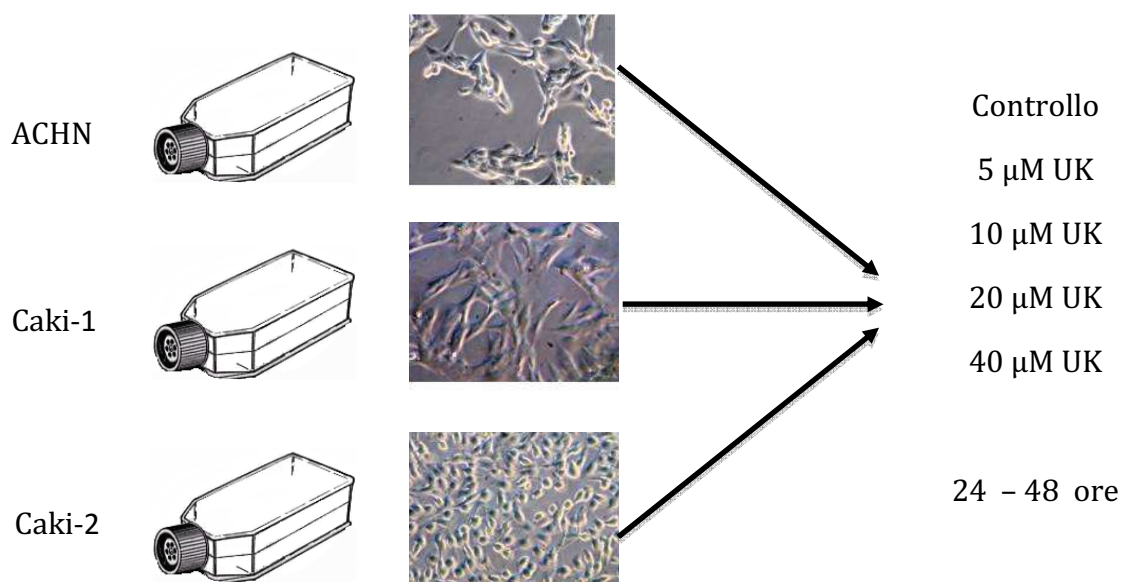


Figura 20. Disegno sperimentale del trattamento con Ukrain delle tre linee di carcinoma renale.

VITALITÀ e MORFOLOGIA CELLULARE

Per caratterizzare l'effetto di Ukrain sulla vitalità e sulla crescita cellulare, sono state allestite curve di crescita coltivando le cellule in piastre multiwell da 6 pozzetti (300.000 cellule/pozzetto). Dopo il completo attacco delle cellule alla superficie di crescita, è stato effettuato il trattamento con Ukrain come sopra descritto.

Dopo 0, 24, 48, e 72 ore, le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA e contate mediante la camera di Neubauer con il metodo di esclusione del Trypan blue. Ogni campione è stato valutato in triplicato.

Per l'analisi della morfologia cellulare le cellule sono state piastrate in piastre multiwell da 6 pozzetti (300.000 cellule/pozzetto). Dopo che le cellule si sono attaccate al pozzetto è stato effettuato il trattamento con Ukrain alle concentrazioni sopra descritte. Dopo 48 ore di trattamento le cellule sono state fotografate al microscopio in contrasto di fase (Leica DM IL) a ingrandimento 20x, mediante una fotocamera (Leica DFC 420) collegata al microscopio rovesciato. Ogni campione è stato valutato in duplicato.

TEST di APOPTOSI

La percentuale di cellule apoptotiche o necrotiche dopo trattamento con Ukrain alle concentrazioni sopra descritte è stata analizzata a intervalli di tempo di 24 e 48 ore utilizzando il test dell'Annessina V (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Calbiochem) secondo le istruzioni fornite dal produttore.

Mano a mano che il processo apoptotico progredisce, la permeabilità della membrana cellulare aumenta progressivamente. Quello che si verifica è un cambiamento conformazionale della membrana plasmatica e precisamente della sua composizione asimmetrica in fosfolipidi, che vede il passaggio delle molecole di fosfatidilserina (PS) dallo strato interno della membrana a quello esterno.

In questo saggio l'annessina V coniugata con il fluorocromo FITC, legandosi ai residui di fosfatidilserina che vengono esposti sulla superficie cellulare durante le prime fasi dell'apoptosi, permette il rilevamento di cellule in apoptosi mediante microscopia a fluorescenza. Lo ioduro di propidio invece, che si intercala al DNA, permette la rilevazione di cellule in tarda apoptosi e cellule necrotiche.

La differenza tra queste due forme di morte cellulare consiste nel fatto che nelle fasi iniziali di apoptosi la membrana cellulare rimane intatta mentre nel momento in cui si verifica la necrosi la membrana cellulare perde la sua integrità. Di conseguenza, le cellule necrotiche sono facilmente colorate sia con annessina V sia con ioduro di propidio (che invece è escluso dalle cellule normali e da quelle apoptotiche), mentre le cellule apoptotiche sono colorate solo con annessina V.

ANALISI del CICLO CELLULARE

La distribuzione delle cellule CT e trattate con Ukrain 5, 10, 20 μM nelle diverse fasi del ciclo cellulare è stata determinata analizzando il contenuto di DNA, come precedentemente descritto [Erba et al., 2002]. Brevemente, il protocollo utilizzato ha previsto i seguenti passaggi:

- le cellule sono state staccate con tripsina (tripsina 0.025% + EDTA 0.01% in PBS), centrifugate (200 xg per 6 minuti), e risospese in PBS-EDTA 0.5 mM (0.02%);
- le cellule sono state fissate dispensando (goccia a goccia) la sospensione cellulare in una provetta da citofluorimetria contenente 3 ml di etanolo 100% freddo. Dopo essere stato accuratamente risospeso, il campione è stato incubato in ghiaccio per 30 minuti;
- le cellule fissate sono state pellettate e incubate con RNase A (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) per 15 minuti a 37°C e, successivamente, con 1 ml di una soluzione contenente ioduro di propidio (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e RNase A (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) per almeno 12 ore. L'analisi del ciclo cellulare è stata eseguita tramite FacsCanto II dotato del software 6,1 FacsDiva (Becton Dickinson) ed è stata calcolata la distribuzione delle diverse fasi del ciclo cellulare.

TEST di MIGRAZIONE e di INVASIVITÀ

Test di migrazione

Il potenziale migratorio delle tre linee cellulari di ccRCC è stato determinato mediante un test di migrazione utilizzando un sistema transwell a 24 pozzetti, con inserti di 6.5 mm di diametro e con pori di 8 μm di diametro.

Le cellule sono state seminate ad una densità di 1×10^5 cellule/pozzetto in terreno completo, e incubate per 24 ore.

Quando le cellule si sono adese alla superficie del pozzetto, il terreno è stato rimosso dall'inserto e sostituito con terreno privo di siero contenente Ukrain alla concentrazione di 5, 10, e 20 μM . Nel pozzetto sottostante è stato posto terreno contenente FBS al 10% come chemoattrattivo e Ukrain alla stessa concentrazione presente nell'inserto.

Dopo 24 ore di incubazione le cellule rimaste sulla superficie superiore dell'inserto sono state rimosse mediante l'utilizzo di un cotton fioc. Le cellule che, invece, sono state in grado di migrare al di sotto della membrana dell'inserto sono state lavate con PBS e incubate con calceina-AM 3 μM (Invitrogen) per 30 minuti a 37°C, 5% CO_2 . Infine, le cellule migrate attraverso i pori della membrana sono state raccolte tramite tripsinizzazione e la fluorescenza è stata rilevata (485 nm eccitazione - 520 nm emissione) e quantificata tramite lo strumento Wallac VICTOR² 1420 multilabel counter (Perkin Elmer) e software associato.

Test di invasività

Il potenziale invasivo delle tre linee cellulari di ccRCC è stato determinato mediante un test di invasività su matrigel utilizzando un sistema transwell a 24 pozzetti, con inserti di 6.5 mm di diametro e con pori di 8 μm di diametro. Gli inserti sono stati rivestiti con matrigel (GeltrexTM, Invitrogen), contenente una miscela dei principali componenti delle membrane basali, seguendo la procedura fornita dalla casa produttrice.

Le cellule sono state seminate ad una densità di 1×10^5 cellule/pozzetto in terreno completo, e incubate per 24 ore.

Quando le cellule si sono adese alla superficie del pozzetto, il terreno è stato rimosso dall'inserto e sostituito con terreno privo di siero contenente Ukrain alla concentrazione di 5, 10, e 20 μM . Nel pozzetto sottostante è stato posto terreno contenente FBS al 10% come chemo-attrattivo e Ukrain alla stessa concentrazione presente nell'inserto.

Dopo 24 ore di incubazione le cellule rimaste sulla superficie superiore dell'inserto sono state rimosse mediante l'utilizzo di un cotton fioc. Le cellule che invece sono state in grado di degradare e invadere il matrigel sono state lavate con PBS e incubate con calceina-AM 3 μ M (Invitrogen) per 30 minuti a 37°C, 5% CO₂. Infine sono state raccolte le cellule migrate attraverso i pori della membrana tramite tripsinizzazione e la fluorescenza è stata rilevata (485 nm eccitazione - 520 nm emissione) e quantificata tramite lo strumento Wallac VICTOR² 1420 multilabel counter (Perkin Elmer) e software associato.

Per entrambi gli esperimenti la sola calceina-AM è stata utilizzata come bianco e il numero di cellule migranti/invasive è stato espresso in unità di fluorescenza relativa; i risultati sono stati calcolati come percentuale di cellule migrate/invasive in relazione al numero totale delle cellule presenti.

Ogni esperimento è stato eseguito in duplicato, e i dati sono stati espressi come valori medi \pm SD di tre esperimenti indipendenti.

IMMUNOFLUORESCENZA

La tecnica di immunofluorescenza è stata utilizzata per verificare il pattern di espressione delle proteine caderina E, β -catenina, actina, vimentina, e tubulina. Tali valutazioni sono state effettuate dopo 48 ore di trattamento con Ukrain.

Per tale analisi le cellule sono state seminate su vetrini coprioggetto rotondi del diametro di 12 mm posti in piastre multiwell da 24 pozzetti ad una densità di 5×10^5 cellule/pozzetto, in 500 μ l di terreno RPMI-1640 completo al fine di permettere la loro completa adesione al vetrino. Una volta adese, il terreno di coltura è stato sostituito con terreno privo di siero contenente Ukrain alle concentrazioni di 5, 10 e 20 μ M.

Al termine delle 48 ore di trattamento i pozzetti sono stati lavati 3 volte con PBS al fine di eliminare completamente il terreno di coltura e le cellule sono state fissate in una soluzione di formaldeide al 4% e saccarosio al 2% per 5 minuti a temperatura ambiente. Sono stati poi effettuati 3 lavaggi con PBS per rimuovere l'eccesso di fissativo. Dopo i lavaggi le cellule sono state post-fissate in etanolo al 70% al fine di permeabilizzarle per la successiva incubazione e consentirne la conservazione a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

Il protocollo di immunofluorescenza indiretta utilizzato ha previsto i seguenti passaggi:

- 3 lavaggi in PBS;
- incubazione con gli anticorpi primari per 1 ora a temperatura ambiente: anticorpo primario monoclonale anti-caderina E (1:500 in PBS, Becton Dickinson), anticorpo monoclonale anti-vimentina (1:100 in PBS, Novocastra), anticorpo monoclonale anti- β -catenina (1:150 in PBS, Novocastra), anticorpo monoclonale anti-actina (1:1000 in PBS, Sigma), anticorpo monoclonale anti-tubulina (1:2000 in PBS, Sigma);
- 3 lavaggi in PBS per rimuovere l'eccesso di anticorpo primario;
- per l'analisi di caderina E, vimentina e tubulina, incubazione per 1 ora a temperatura ambiente, al buio, con un anticorpo secondario coniugato con Alexa 488 (1:500 in PBS, Molecular Probes, Invitrogen);
- per l'analisi di β -catenina e actina, incubazione per 1 ora a temperatura ambiente, al buio, con un anticorpo secondario coniugato con TRITC (1:1000 in PBS, Molecular Probes, Invitrogen)
- dopo rimozione dell'eccesso di anticorpo secondario mediante 3 lavaggi in PBS, le cellule sono state incubate per 15 min a temperatura ambiente, al buio, con DAPI (1:100000 in PBS, Sigma);

- dopo 3 lavaggi in PBS, i vetrini coprioggetto sono stati montati su vetrino portaoggetti utilizzando il montante mowiol.

I controlli negativi sono stati processati in ugual modo, omettendo l'anticorpo primario.

Le cellule marcate sono state osservate al microscopio ottico a fluorescenza (Nikon Eclipse 80i) e fotografate tramite camera digitale (Nikon Ds-5Mc). Le immagini sono state in seguito elaborate con uno specifico software (Adobe Photoshop).

ZIMOGRAFIA

La zimografia è una tecnica elettroforetica utilizzata per valutare l'attività proteolitica di enzimi separati su gel di poliacrilammide. Per quanto concerne lo studio delle MMPs, la metodica prevede la copolimerizzazione di un substrato idoneo (gelatina o collagene, ad esempio) nel gel di separazione, al fine di visualizzare sia i proenzimi sia le forme attive degli stessi. Tale procedimento permette di visualizzare sul gel, come bande chiare su fondo scuro, le bande di lisi che corrispondono sia alle forme attivate delle MMPs, sia delle forme pro-enzimatiche.

I campioni contenenti l'enzima di interesse vengono sottoposti ad elettroforesi in presenza di SDS in condizioni non riducenti; tale condizione permette, una volta terminata la migrazione elettroforetica, il refolding delle proteine mediante eliminazione dell' SDS da parte di un altro detergente (Triton X-100), che permette di visualizzare sul gel, oltre alle forme attive delle MMPs, anche le forme proenzimatiche che non sono state attivate per digestione proteolitica.

La concentrazione proteica dei terreni di coltura condizionati derivati dalle fiasche delle 3 linee cellulari CT e trattate con Ukrain è stata determinata mediante metodo di Lowry [Lowry et al., 1951]. I campioni sono stati quindi addizionati con sample buffer (10% SDS, 4% saccarosio, 0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% blu di bromofenolo) in rapporto 3:1. Ogni campione (15 µg di proteine totali) è stato sottoposto a SDS-PAGE in condizioni non denaturanti/non riducenti su un gel di poliacrilammide al 10% contenente gelatina alla concentrazione di 1 mg/ml. La corsa elettroforetica è stata effettuata a 4°C in tampone tris-glicina. Una volta terminata l'elettroforesi, il gel è stato lavato due volte in tampone Tris-HCl 50 mM contenente Triton X-100 al 2.5% per 30 minuti, e successivamente incubato overnight a 37°C in un tampone di incubazione contenente Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM, NaN₃ 0.02%, pH 7,5 che permette la reazione enzimatica di digestione proteolitica della gelatina contenuta nel gel da parte delle MMPs. Dopo tale incubazione, il gel è stato colorato con blu di Coomassie R250 per almeno 30 minuti, e successivamente decolorato fino all'evidenziazione delle bande di lisi che corrispondono alla presenza dell'attività gelatinolitica delle MMPs e che appaiono come bande bianche all'interno del gel che rimane colorato in blu [Kleiner e Stetler-Stevenson, 1994].

Le bande di lisi sono infine sottoposte a quantificazione mediante analisi densitometrica (UVBand, Eppendorf).

WESTERN BLOT

Elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-page)

Le cellule sono state lisate in Tris-HCl 50 mM pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Triton X100, 5 mM EDTA, 150 mM MgCl₂, 1% SDS, in presenza di inibitori delle proteasi e 1 mM sodio ortovanadato. La concentrazione proteica dei lisati cellulari e dei terreni di coltura è stata determinata con metodo di Lowry [Lowry et al., 1951] allo spettrofotometro, utilizzando una curva standard di albumina bovina sierica.

I campioni così ottenuti (da 40 a 60 µg di proteine totali per i lisati cellulari e 15 µg per i terreni di coltura) sono stati diluiti (1:3) in tampone Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, contenente il 10% di glicerolo, il 2% di SDS e lo 0.001% di Blu di bromofenolo, e denaturati a 95°C per 5 minuti in condizioni riducenti.

L'elettroforesi è stata condotta in accordo con il procedimento di Laemmli [Laemmli, 1970], utilizzando un gel di poliacrilamide al 10%.

La corsa elettroforetica è stata effettuata in cella verticale (Bio-Rad) a temperatura ambiente per circa 2 ore a voltaggio costante (120 V) in tampone Tris-glicina 25 mM, pH 8.3 e SDS 0.1%.

Immunoblotting

Le proteine, separate in base al loro peso molecolare, sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa in una cella transblot (Bio-Rad) a voltaggio costante (90 V) per 90 minuti a 4°C, in tampone Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3, e metanolo al 20% [Burnette, 1981]. Al termine del trasferimento, le membrane sono state lasciate asciugare all'aria per almeno 30 minuti e incubate in TBST (TBS contenente Tween-20 0.05%) con aggiunta di latte scremato in polvere al 5% per 1 ora a temperatura ambiente, per bloccare i siti di legame aspecifici.

Mediante la tecnica di Western blot sono stati analizzati i livelli proteici di SPARC intracellulari (40-60 µg di proteine totali) e secreti nel medium di coltura (25 µg di proteine totali), e di vimentina citoscheletrica (40-60 µg di proteine totali).

Le membrane sono state incubate 1 ora con un anticorpo monoclonale anti-SPARC (1:100 in TBST, Novocastra) o anti-vimentina (1:1000 in TBST, Novocastra).

Dopo aver lavato le membrane in TBST (3 x 5 minuti) per rimuovere l'eccesso di anticorpo primario, le membrane sono state incubate un anticorpo anti-mouse coniugato con perossidasi (1:6000 in TBST, Sigma).

Dopo 3 lavaggi in TBST (3 x 5 minuti) per rimuovere l'eccesso di anticorpo secondario, le bande immunoreattive sono state rivelate mediante utilizzo di un opportuno substrato (Opti-4CN, Biorad), seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. Le bande immunoreattive sono state sottoposte a quantificazione mediante analisi densitometrica (UVBand, Eppendorf).

Per normalizzare l'espressione intracellulare di SPARC e vimentina, le membrane sono successivamente state incubate con un anticorpo monoclonale anti-tubulina (1:2000 in TBST, Sigma).

ANALISI STATISTICA

I campioni sono stati coltivati in duplicato, ed ogni valutazione è stata effettuata in doppio.

I dati ottenuti, espressi come media \pm deviazione standard (DS), sono stati confrontati mediante analisi della varianza ad una via (ANOVA), seguita dal test di Student-Newman-Keuls (Prism GraphPad). Si sono considerati statisticamente significativi i valori di P inferiori a 0.05.

RISULTATI

Vitalità e proliferazione cellulare

L'analisi della proliferazione cellulare ha mostrato che la somministrazione del farmaco Ukrain riduce la crescita in coltura delle tre linee cellulari di ccRCC in modo dose-dipendente (Figura 21). In particolare, l'inibizione della proliferazione cellulare è evidente dopo 24 ore dopo somministrazione di Ukrain alle dosi 10, 20, e 40 μM di Ukrain, e dopo 48 ore a tutti i dosaggi del farmaco. Inoltre, la somministrazione della dose 40 μM , ha indotto la morte di tutte le cellule della linea ACHN già 48 ore dopo il trattamento.

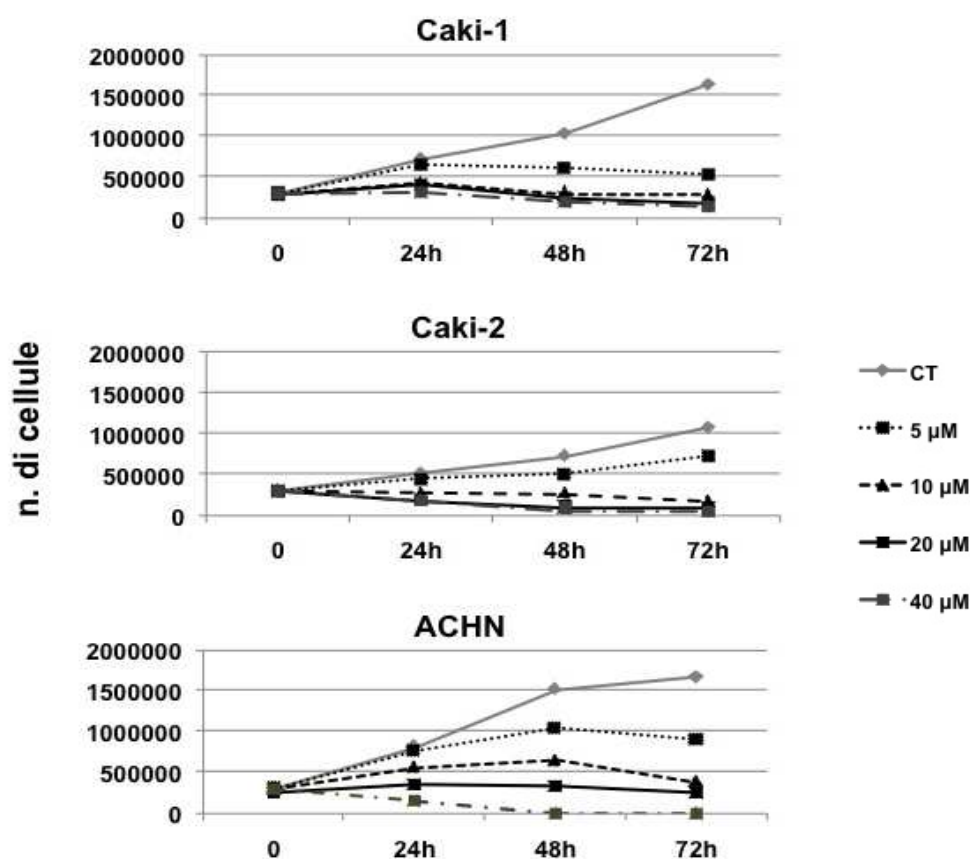


Figura 21. Curve di crescita che mostrano l'effetto di Ukrain sulla proliferazione cellulare delle cellule di ccRCC, valutato dopo 24, 48, 72 ore. Ukrain è stato somministrato alle dosi di 5, 10, 20, 40 μM . Cellule non trattate sono state usate come controlli (CT). UK: Ukrain.

Abbiamo quindi esaminato l'efficacia del farmaco nell'indurre apoptosi cellulare mediante il test dell'annexina V.

In accordo con i dati delle curve di crescita, i nostri risultati indicano un aumento dose-dipendente del numero di cellule apoptotiche 24 e 48 ore dopo somministrazione di Ukrain. In particolare, Ukrain incrementa la percentuale di cellule apoptotiche nella linea cellulare Caki-1 a partire dalla dose 10 μM , e a partire dalla dose 5 μM nelle cellule Caki-2 e ACHN (Figura 22).

Questi dati suggeriscono che il farmaco possa esercitare il suo potenziale terapeutico inducendo le cellule di ccRCC ad entrare in apoptosi.

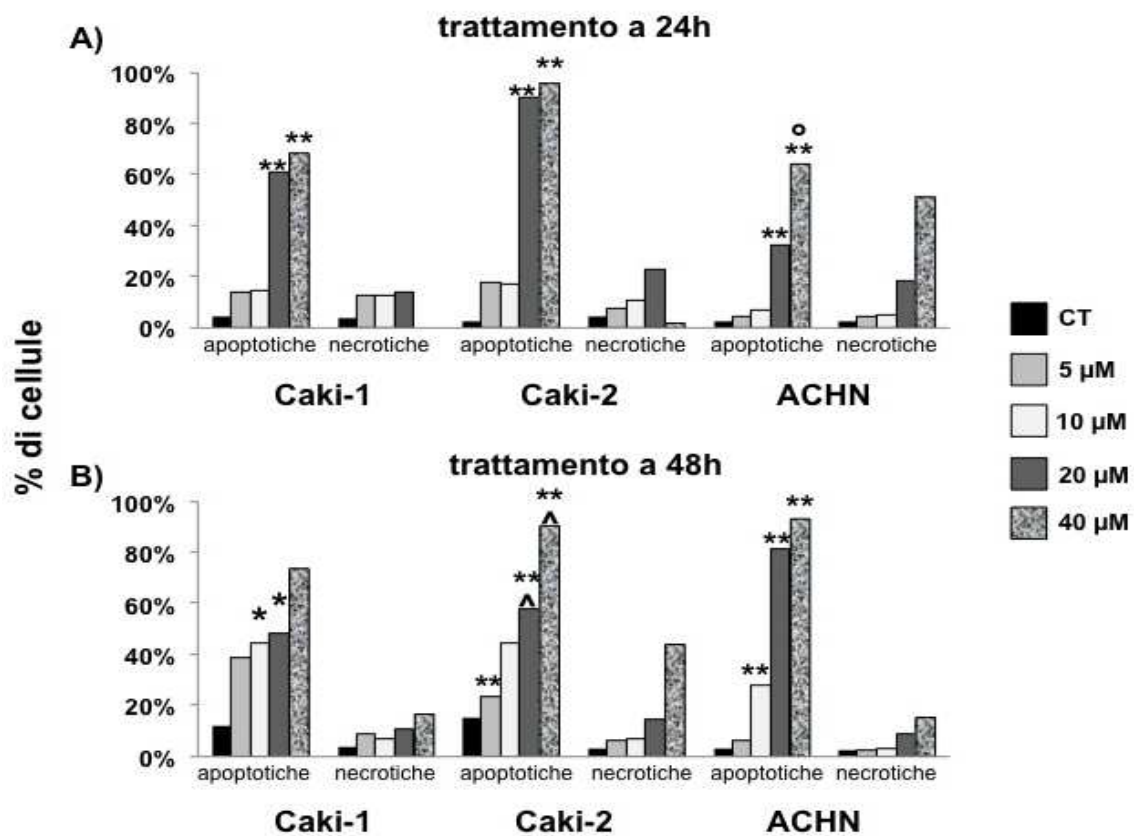


Figura 22. Istogrammi rappresentativi della percentuale di cellule apoptotiche e necrotiche nelle linee cellulari di ccRCC, non trattate (CT) e dopo trattamento con Ukrain alle dosi di 5, 10, 20, 40 μM , ai tempi di 24 e 48 ore. Dati espressi come media \pm SD.

* P < 0.05 vs CT; ** P < 0.005 vs CT; ^ P < 0.05 vs 5 μM ; ° P < 0.05 vs 20 μM

Morfologia cellulare

L'analisi delle cellule di ccRCC al microscopio a contrasto di fase ha rivelato che la morfologia cellulare è stata similmente influenzata dalla somministrazione di Ukrain dopo 24 (dati non riportati) e dopo 48 ore. (Figura 23).

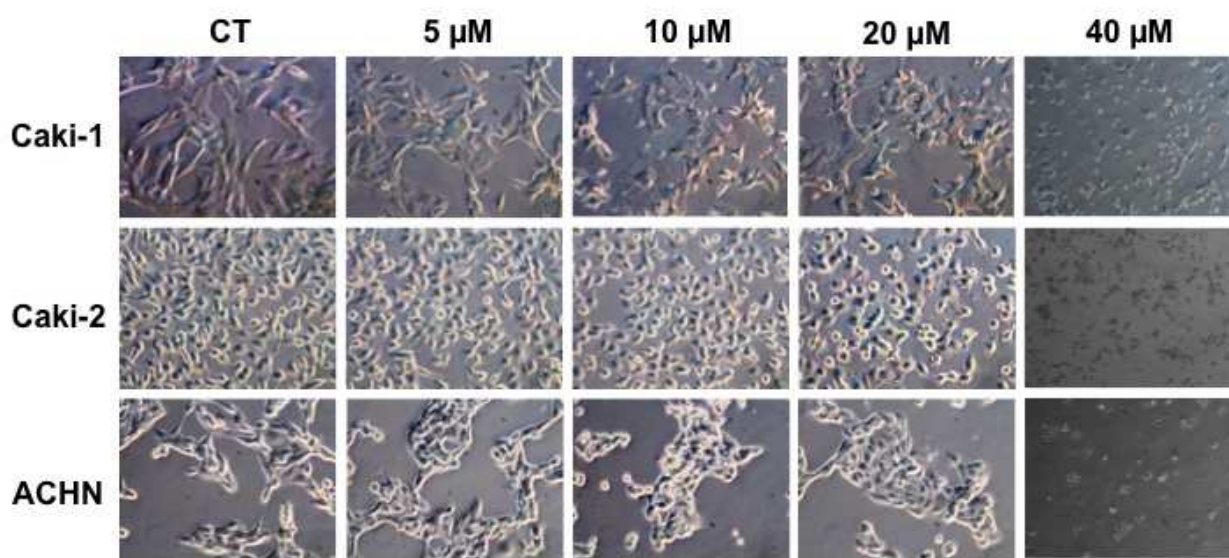


Figura 23. Microfotografie al microscopio a contrasto di fase delle linee cellulari di ccRCC, non trattate (CT) e dopo trattamento con Ukrain alle dosi di 5, 10, 20, e 40 μM , dopo 48 ore. Ingrandimento originale 20x per CT e Ukrain 5, 10, 20 μM ; 10x per Ukrain 40 μM .

In particolare i cambiamenti morfologici più evidenti sono stati osservati nelle cellule Caki-1 e ACHN. Caki-1 e ACHN non trattate, infatti, crescono presentando una forma leggermente fusata e simile a quella dei fibroblasti, indicativa di un fenotipo simil-mesenchimale. Dopo la somministrazione di Ukrain, queste cellule tendono invece a crescere in aggregati abbastanza stretti, mostrando una forma poligonale e più arrotondata, compatibile con quella delle cellule con un fenotipo simil-epiteliale.

Le cellule della linea Caki-2, invece, crescono in aggregati e presentano una forma poligonale simil-epiteliale, il cui aspetto non viene modificato dopo la somministrazione di Ukrain.

La Figura 23 mostra che 48 ore dopo la somministrazione di Ukrain 40 μM la maggior parte delle cellule Caki-1 e Caki-2, e la totalità delle ACHN, sono morte suggerendo che tale dose supera la massima dose di farmaco tollerata per le linee cellulari di ccRCC. Di conseguenza, tutte le

successive valutazioni molecolari e di immunofluorescenza dopo 48 ore di trattamento sono state effettuate utilizzando solo le dosi di Ukrain 5, 10, e 20 μM .

Espressione della tubulina

L'analisi mediante immunofluorescenza per la tubulina ha mostrato che l'organizzazione dei microtubuli del citoscheletro è rimasta conservata e non presenta modificazioni nelle cellule trattate con tutte le dosi di Ukrain, rispetto ai controlli (Figura 24). Tale evidenza sperimentale suggerisce che il meccanismo d'azione del farmaco non agisce modificando i microtubuli.

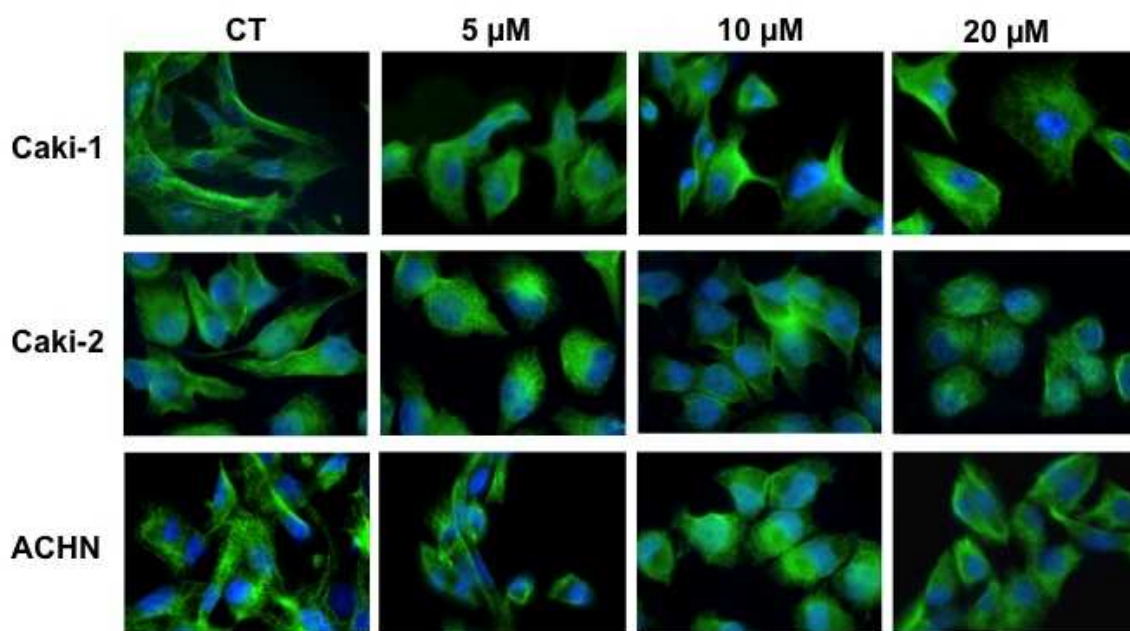


Figura 24. Microfotografie rappresentative del pattern di espressione della tubulina nelle linee cellulari di ccRCC, non trattate (CT) e 48 ore dopo trattamento con Ukrain alle dosi di 5, 10, 20 μM . Verde: tubulina; blu: dapi. Ingrandimento originale: 100x.

Espressione dei marcatori di transizione epitelio-mesenchimale

Dal momento che lo switch fenotipico da cellule epiteliali a cellule mesenchimali gioca un ruolo chiave nella progressione dei carcinomi, abbiamo analizzato l'effetto di Ukrain sui principali marcatori di EMT per meglio comprendere il ruolo di tale processo nella progressione del ccRCC, e la sua possibile modulazione da parte di Ukrain.

Mediante immunofluorescenza abbiamo analizzato il pattern di espressione della caderina E e della β -catenina, le principali proteine costituenti le zonule aderenti. Il loro pattern di espressione è risultato molto simile 24 e 48 ore dopo la somministrazione di Ukrain. In tutte le tre linee cellulari analizzate, sia la caderina E che la β -catenina sono risultate similmente espresse nel citoplasma dei controlli e delle cellule trattate con il farmaco (Figura 25). Il trattamento con Ukrain, quindi, non sembra essere in grado di indurre la rilocalizzazione di queste proteine giunzionali nei siti di contatto cellula-cellula, come invece si osserva nelle cellule epiteliali differenziate.

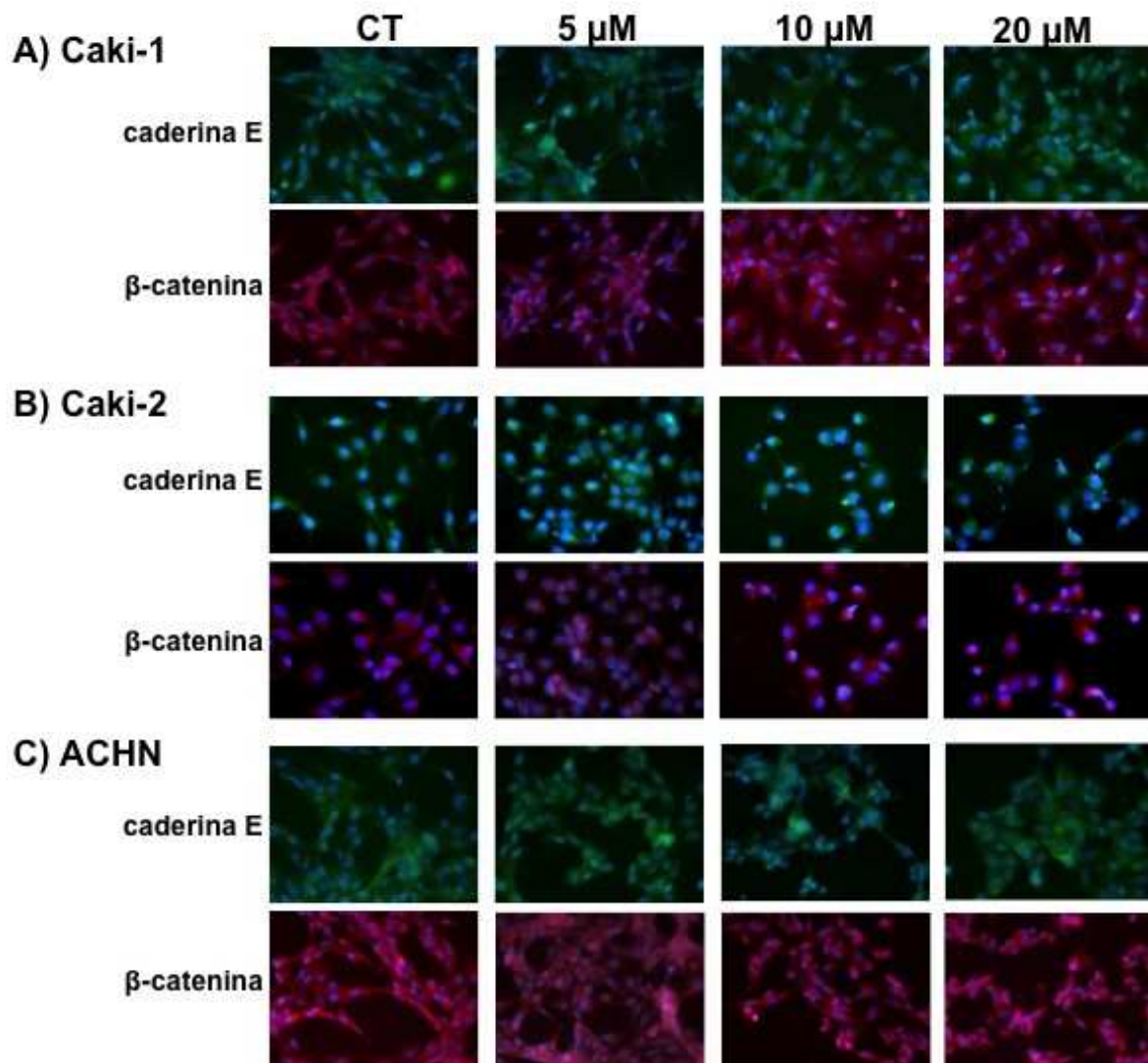


Figura 25. Microfotografie rappresentative dell'analisi in immunofluorescenza dell'espressione di caderina E e β-catenina nelle linee cellulari di ccRCC, non trattate (CT) e 48 ore dopo trattamento con Ukrain alle dosi di 5, 10, 20 μM. Verde: caderina E; rosso: β-catenina; blu: dapi. Ingrandimento originale 40x.

Mediante immunofluorescenza è stata analizzata la localizzazione dell'actina, proteina del citoscheletro legata alle proteine delle fasce aderenti tramite interposizione della β -catenina. In tutte le cellule di ccRCC non trattate l'actina è risultata espressa in modo diffuso nel citoplasma, senza una evidente localizzazione corticale (Figura 26). La somministrazione di Ukrain non sembra influenzare la disposizione di tali filamenti nelle cellule Caki-1. Diversamente, nelle cellule Caki-2 e ACHN, dopo somministrazione di Ukrain alle dosi di 5 e 10 μM rispettivamente, l'immunolocalizzazione dell'actina è stata rilevata al confine tra le cellule, suggerendo che la somministrazione di Ukrain sia in grado di indurre una riorganizzazione del citoscheletro di actina nelle cellule di ccRCC. Questo effetto è stato osservato anche in alcune cellule della linea ACHN 24 ore dopo la somministrazione delle dosi di Ukrain 20 e 40 μM (dati non riportati). Tale riscontro suggerisce il ripristino di un fenotipo simil-epiteliale, caratterizzato dalla disposizione corticale del network dei filamenti di actina, dopo somministrazione del farmaco.

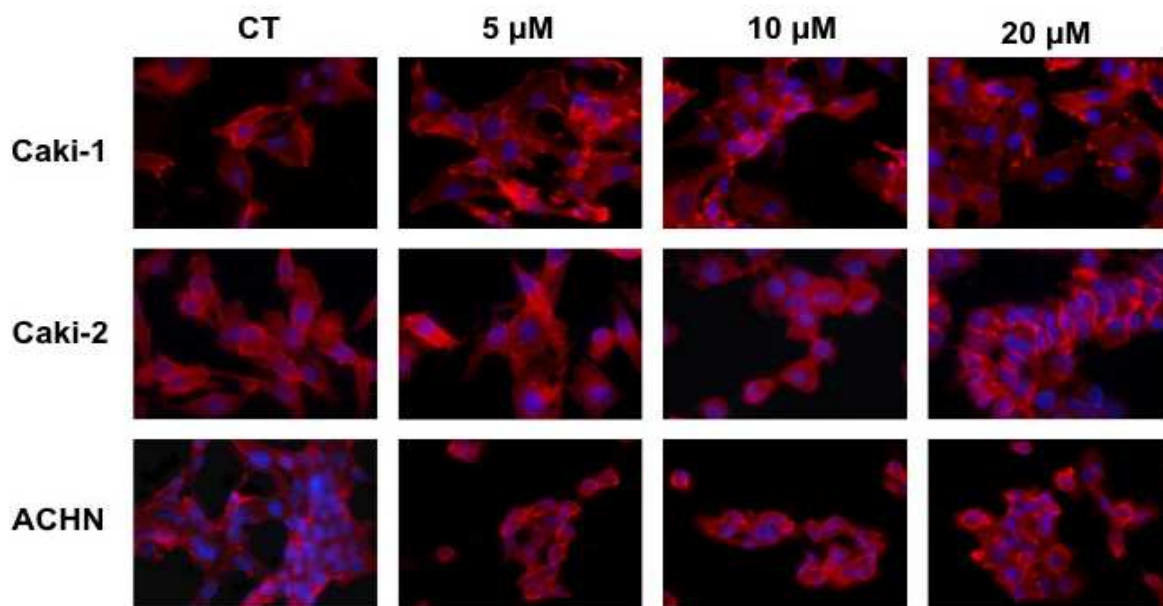


Figura 26. Microfotografie rappresentative del pattern di espressione dell'actina citoscheletrica evidenziato mediante tecnica di immunofluorescenza nelle cellule di ccRCC, non trattate (CT) e 48 ore dopo trattamento con Ukrain alle dosi di 5, 10, 20 μM . Rosso: actina; blu: dapi. Ingrandimento originale 60x.

La vimentina è una delle proteine che costituiscono i filamenti intermedi delle cellule mesenchimali. Essa viene generalmente espressa dalle cellule che vanno incontro a EMT. Abbiamo quindi analizzato la sua espressione nelle cellule di ccRCC prima e dopo trattamento con Ukrain mediante immunofluorescenza. Nella maggior parte delle cellule la vimentina si è presentata organizzata formando una rete di filamenti, come osservato nelle cellule mesenchimali (Figura 27). Sia nei controlli che nelle cellule trattate con tutte le dosi di Ukrain, sono presenti filamenti di vimentina, che irradiano verso la periferia cellulare (riquadro rappresentativo in Figura 27).

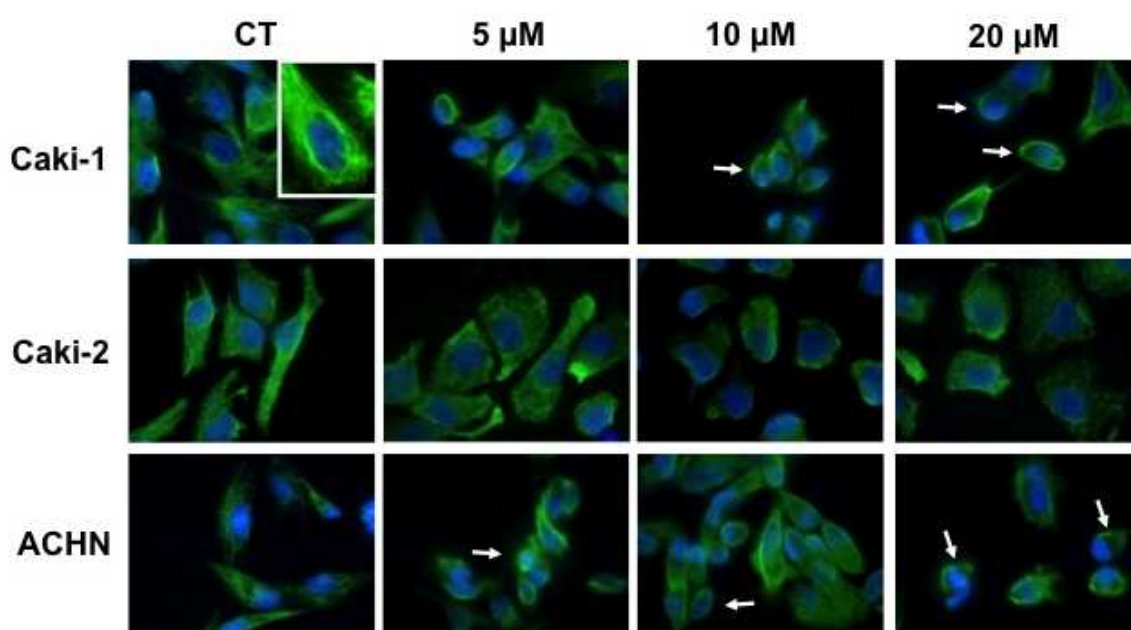


Figura 27. Microfotografie al microscopio a fluorescenza che mostrano il pattern di espressione della vimentina nelle linee cellulari di ccRCC, non trattate (CT) e 48 ore dopo trattamento con Ukrain alle dosi di 5, 10, e 20 μM . Verde: vimentina; blu: dapi. Ingrandimento originale 100x.

Questo pattern di espressione suggerisce che le cellule di ccRCC esprimono la vimentina quale marcatore di fenotipo mesenchimale, e che Ukrain non è in grado di modificare tale fenotipo.

Ciononostante, in alcune cellule delle linee Caki-1 e ACHN, dopo somministrazione di Ukrain 5 μM , è stato possibile evidenziare un riarrangiamento dei filamenti di vimentina, caratterizzato dal loro addensamento nella zona perinucleare e con una limitata estensione in lunghezza

(Figura 27, frecce); tale pattern di espressione è stato descritto come indice di down-regolazione della proteina.

Sebbene in alcune cellule, quindi, il trattamento con Ukrain potrebbe essere in grado di revertire il fenotipo da mesenchimale a epiteliale mediante down-regolazione della vimentina, l'analisi mediante western blot ha confermato che, complessivamente, l'espressione della vimentina non è quantitativamente modificata dalla somministrazione del farmaco (Figura 28). Nelle cellule Caki-2 l'espressione della vimentina tende ad aumentare dopo 48 ore alle dosi di Ukrain 10 e 20 μM , ma tale variazione non è risultata statisticamente significativa.

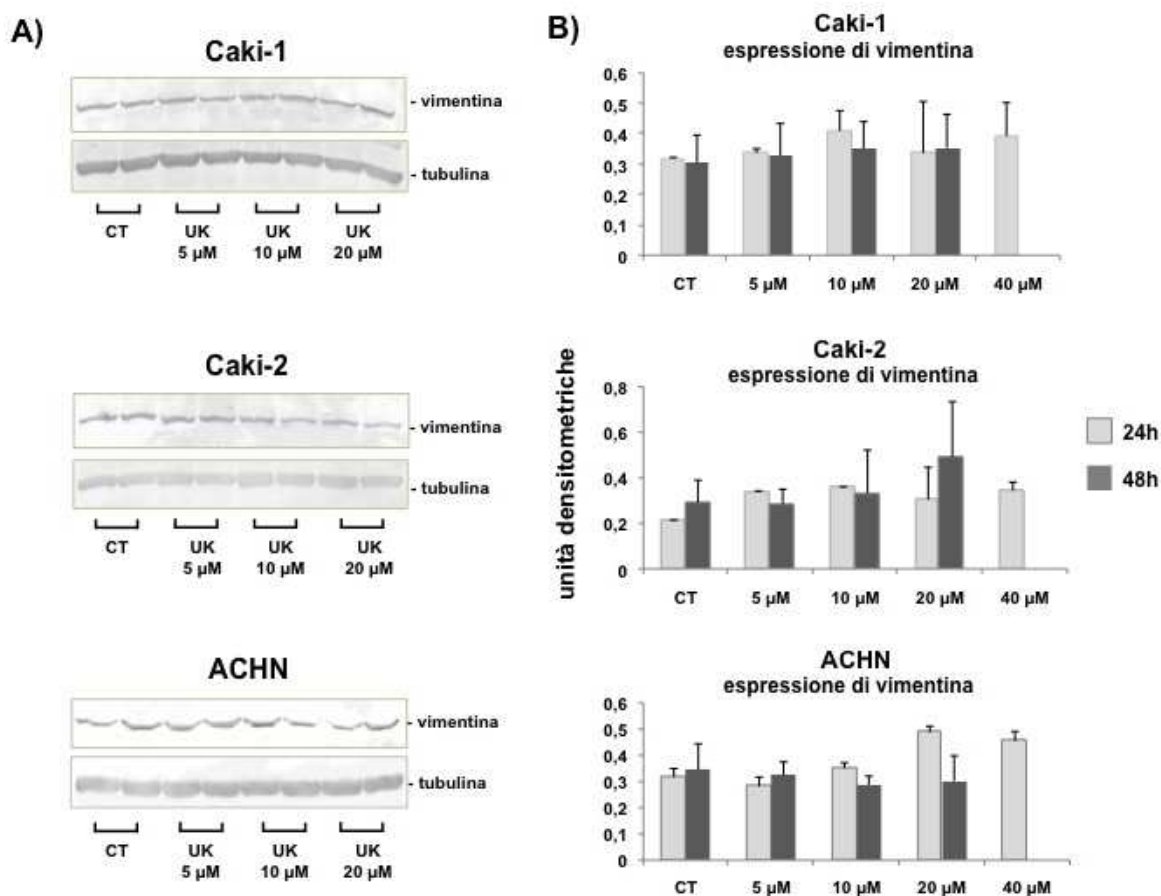


Figura 28. (A) Western blot rappresentativi dei livelli proteici di vimentina e di tubulina nelle tre linee cellulari di ccRCC, non trattate (CT) e 48 ore dopo trattamento con Ukrain alle dosi di 5, 10, e 20 μM . (B) Istogrammi rappresentativi dei livelli proteici di vimentina ottenuti dopo analisi densitometrica delle bande immunoreattive e normalizzazione sull'espressione della tubulina. Dati espressi come media \pm DS.

Espressione e attività delle MMPs

Le MMPs ad attività gelatinolitica MMP-2 e MMP-9 sono marcatori di EMT e giocano un ruolo chiave nel processo di invasività neoplastica. La loro attività è stata valutata tramite SDS-zimografia sui terreni di coltura delle cellule di ccRCC, sia CT che dopo trattamento con Ukrain. L'analisi densitometrica delle bande di lisi degli zimogrammi dei surnatanti delle tre linee di ccRCC 24 ore dopo trattamento con Ukrain mostra che l'attività delle MMP-2 e MMP-9 è comparabile a quella dei controlli (Figura 29 B).

Dopo 48 ore dalla somministrazione di Ukrain, invece, l'attività della MMP-2 (Figura 29 A, B) diminuisce significativamente dopo trattamento con Ukrain 20 μ M nelle cellule Caki-1 ($P < 0.0005$ per Ukrain 20 μ M vs 10 μ M; $P < 0.005$ per Ukrain 20 μ M vs CT e 5 μ M), nelle Caki-2 ($P < 0.005$ per Ukrain 20 μ M vs CT e 10 μ M), e nelle ACHN ($P < 0.005$ per Ukrain 20 μ M vs CT).

L'attività dell'MMP-9 è risultata significativamente down-regolata dalla somministrazione di Ukrain nelle cellule Caki-1 ($P < 0.0005$ per Ukrain 20 μ M vs 10 μ M; $P < 0.005$ per Ukrain 20 μ M vs CT e 5 μ M), e tende a diminuire alla dose 20 μ M Ukrain nelle cellule Caki-2 e ACHN (P non significativa).

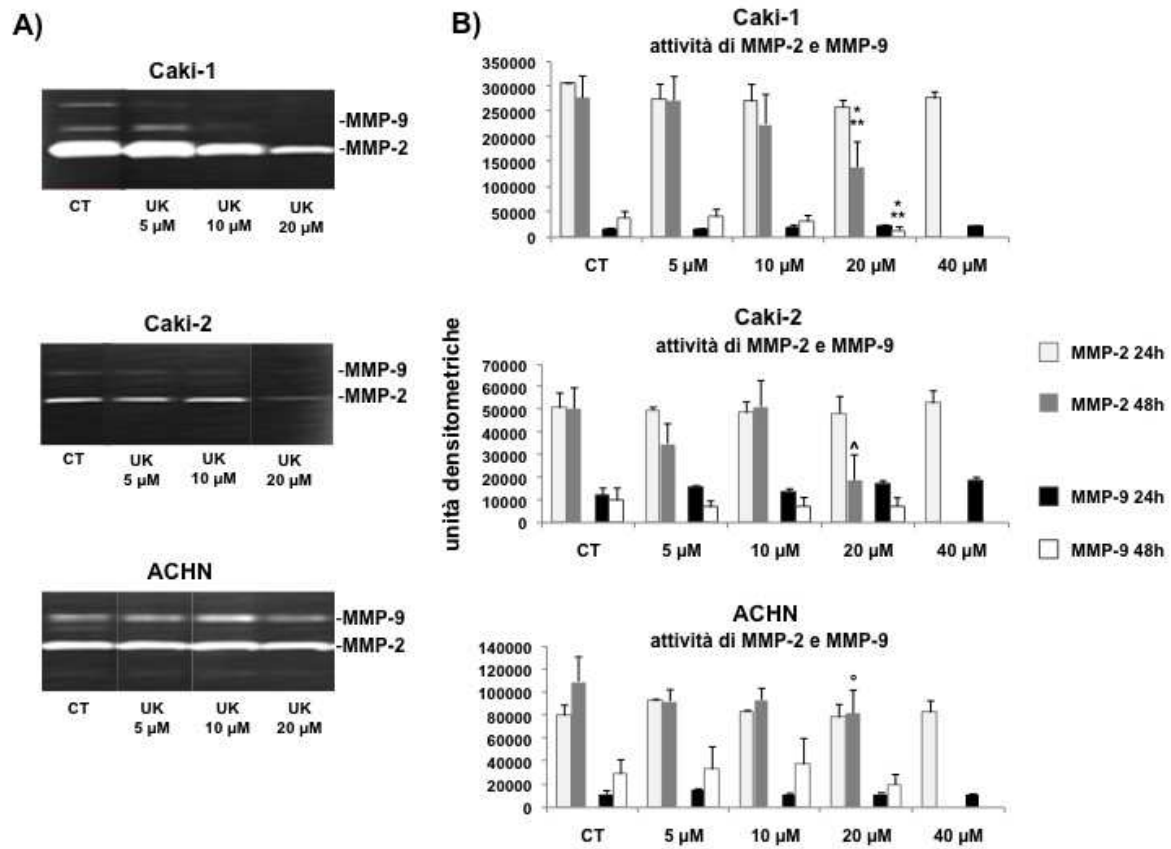


Figura 29. (A) Zimogrammi rappresentativi in cui si evidenziano le bande di lisi corrispondenti ai livelli di MMP-2 e MMP-9 nelle linee cellulari di ccRCC, non trattate (CT) e 48 ore dopo trattamento con Ukrain alle dosi di 5, 10, e 20 µM. (B) Istogrammi rappresentativi dei livelli di MMP-2 e MMP-9 ottenuti dopo analisi densitometrica delle bande di lisi. Dati espressi come media \pm DS.

* $P < 0.0005$ vs 10 µM; ** $P < 0.005$ vs CT e 5 µM; ^ $P < 0.005$ vs CT e 10 µM; ° $P < 0.05$ vs CT

Migrazione e invasività

Al fine di analizzare il potenziale invasivo delle cellule di ccRCC e la sua eventuale modulazione da parte di Ukrain, sono stati allestiti un test di migrazione ed un test di invasività su matrigel utilizzando un sistema transwell, come descritto nei Materiali e Metodi. Entrambi i test funzionali sono stati eseguiti su campioni trattati per 48 ore con Ukrain, in quanto dai dati precedenti è emerso che dopo 24 ore di somministrazione del farmaco non sono risultate evidenti differenze dell'attività delle MMPs tra i controlli e cellule trattate con Ukrain.

La Figura 30 A mostra che il tasso di migrazione cellulare è fortemente ridotto dalla somministrazione di Ukrain nelle cellule Caki-1 ($P < 0.05$ per Ukrain 5 e 20 μM vs CT), nelle cellule Caki-2 ($P < 0.0005$ per Ukrain 20 μM vs CT, 5 e 10 μM ; $P < 0.05$ per i CT vs Ukrain 5 e 10 μM), e nelle cellule ACHN ($P < 0.005$ per Ukrain 10 e 20 μM vs 5 μM).

Ukrain induce anche una diminuzione significativa della percentuale di cellule invasive a tutte le dosi (Figura 30 B) (per Caki-1, Caki-2, e ACHN $P < 0.005$ per Ukrain 10 e 20 μM vs CT e 5 μM ; per Caki-1 e Caki-2 $P < 0.05$ per Ukrain 5 μM vs CT).

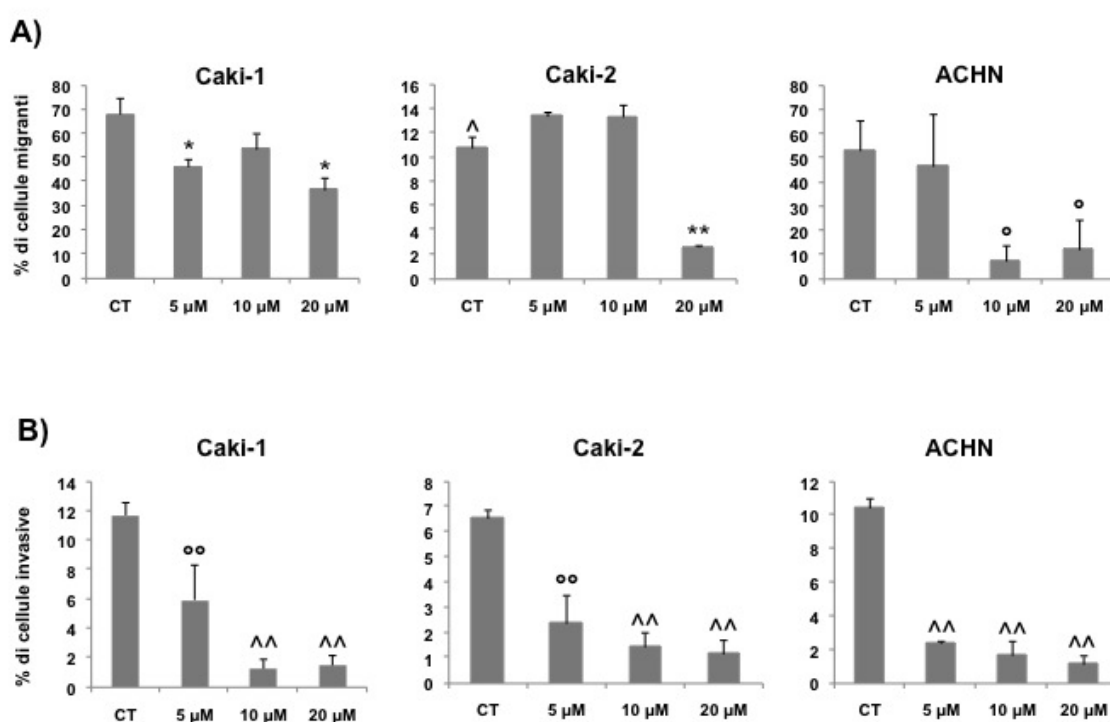


Figura 30. Istogrammi rappresentativi delle percentuali di cellule migranti (A) e invasive (B) nelle linee cellulari di ccRCC, non trattate (CT) e 48 ore dopo trattamento con Ukrain alle dosi di 5, 10, e 20 μM . Dati espressi come media \pm DS.

* $P < 0.05$ vs CT; ** $P < 0.0005$ vs CT, 5 μM e 10 μM ; ^ $P < 0.05$ vs 5 e 10 μM ; ° $P < 0.005$ vs CT e 5 μM ; ^^ $P < 0.005$ vs CT; °° $P < 0.05$ vs CT

Espressione di SPARC

I livelli proteici di SPARC sono stati analizzati sia nei lisati cellulari che nel medium di coltura, in quanto la proteina è in grado di svolgere effetti biologici differenti a seconda che si trovi nella cellula o venga secreta nel microambiente circostante (Figura 31).

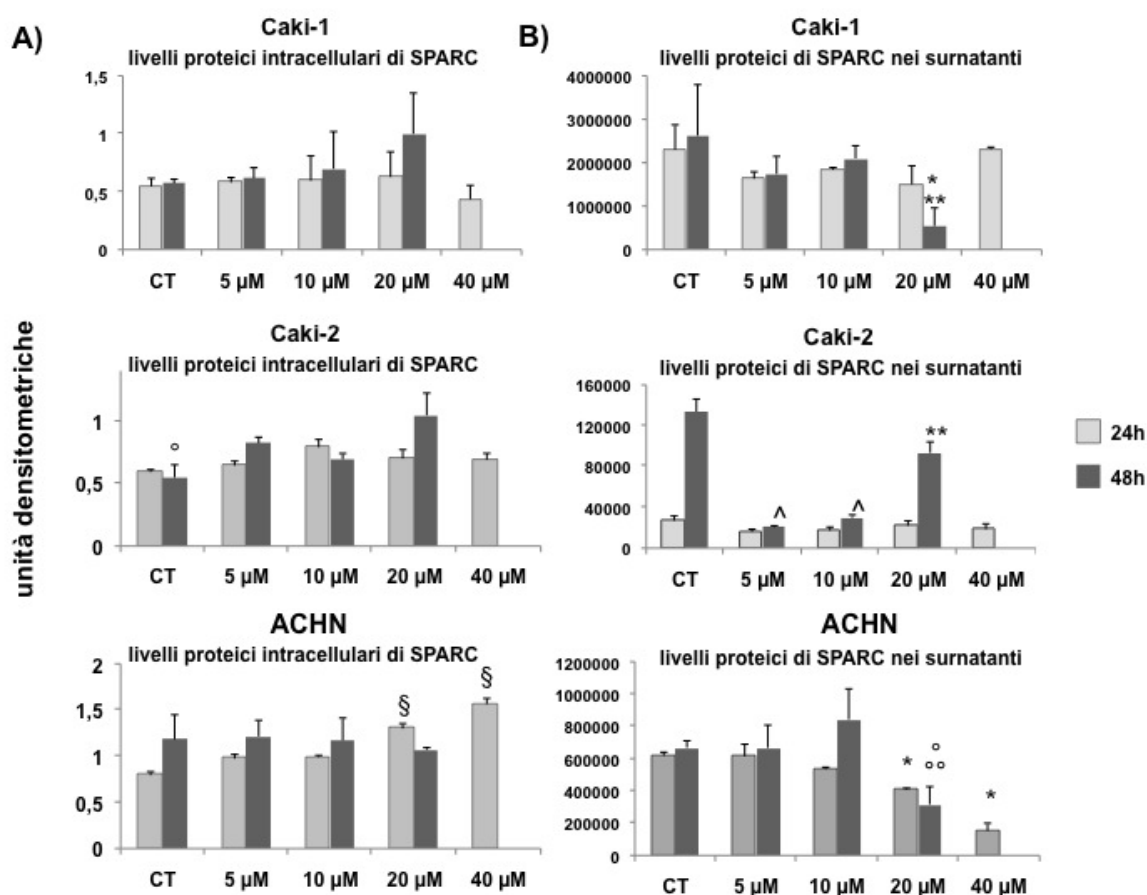


Figura 31. Istogrammi rappresentativi dei livelli proteici di SPARC intracellulari (A) e secreti nei surnatanti (B), ottenuti dopo analisi densitometrica delle bande immunoreattive, nelle linee cellulari di ccRCC, non trattate (CT) e 48 ore dopo trattamento con Ukrain alle dosi di 5, 10, e 20 μM. Dati espressi come media ± DS.

§ P < 0.05 vs CT, 5 e 10 μM; * P < 0.005 vs CT; ** P < 0.05 vs 5 e 10 μM; ^ P < 0.0005 vs CT; ° P < 0.05 vs CT; °° P < 0.005 vs 5 e 10 μM.

Dopo 24 ore dalla somministrazione di Ukrain, l'espressione di SPARC risulta influenzata significativamente solo nelle cellule ACHN. Infatti, il farmaco induce una up-regolazione dei livelli intracellulari di SPARC ($P < 0.05$ per 20 e 40 μM vs CT, 5 μM e 10 μM) e la concomitante down-regolazione della proteina secreta nei cellulari medium di coltura ($P < 0.05$ per 20 e 40 μM vs CT).

Dopo 48 ore, l'espressione di SPARC nei lisati cellulari tende ad essere up-regolata nelle cellule Caki-1 trattate con Ukrain, ed è significativamente aumentata dopo somministrazione della dose di Ukrain 20 μM nelle Caki-2, rispetto ai CT ($P < 0.05$); nelle cellule ACHN non sono state osservate differenze tra CT e cellule trattate, anche se in questa linea cellulare Ukrain è risultato in grado di indurre significativamente l'aumento di SPARC 24 ore dopo somministrazione della dose 20 e 40 μM (Figura 31 A).

Al contrario, 48 ore dopo la somministrazione di Ukrain i livelli di SPARC secreti nei surnatanti cellulari mostrano un pattern di espressione opposto rispetto a quello dei livelli proteici intracellulari. Infatti, i livelli di SPARC diminuiscono significativamente nelle cellule Caki-1 dopo trattamento con la dose 20 μM di Ukrain ($P < 0.005$ per Ukrain 20 μM vs CT; $P < 0.05$ per Ukrain 20 μM vs 5 e 10 μM), nelle Caki-2 ($P < 0.0005$ per Ukrain 5 e 10 μM vs CT; $P < 0.005$ per Ukrain 20 μM vs CT), e nelle ACHN ($P < 0.05$ per Ukrain 20 μM vs CT; $P < 0.005$ per Ukrain 20 μM vs 5 e 10 μM) (Figura 31 B).

Analisi del ciclo cellulare

L'analisi del contenuto di DNA è stata effettuata mediante citometria a flusso nelle cellule di ccRCC. L'analisi del ciclo cellulare mostra un aumento, nelle tre linee cellulari considerate, della percentuale di cellule nella fase G2/M 48 ore dopo il trattamento con Ukrain (Figura 32); tale riscontro è particolarmente evidente dopo trattamento con la dose 20 μM . Questo risultato supporta l'ipotesi che Ukrain possa contribuire ad indurre un arresto del ciclo cellulare in questa fase del ciclo, bloccando la proliferazione delle cellule di ccRCC.

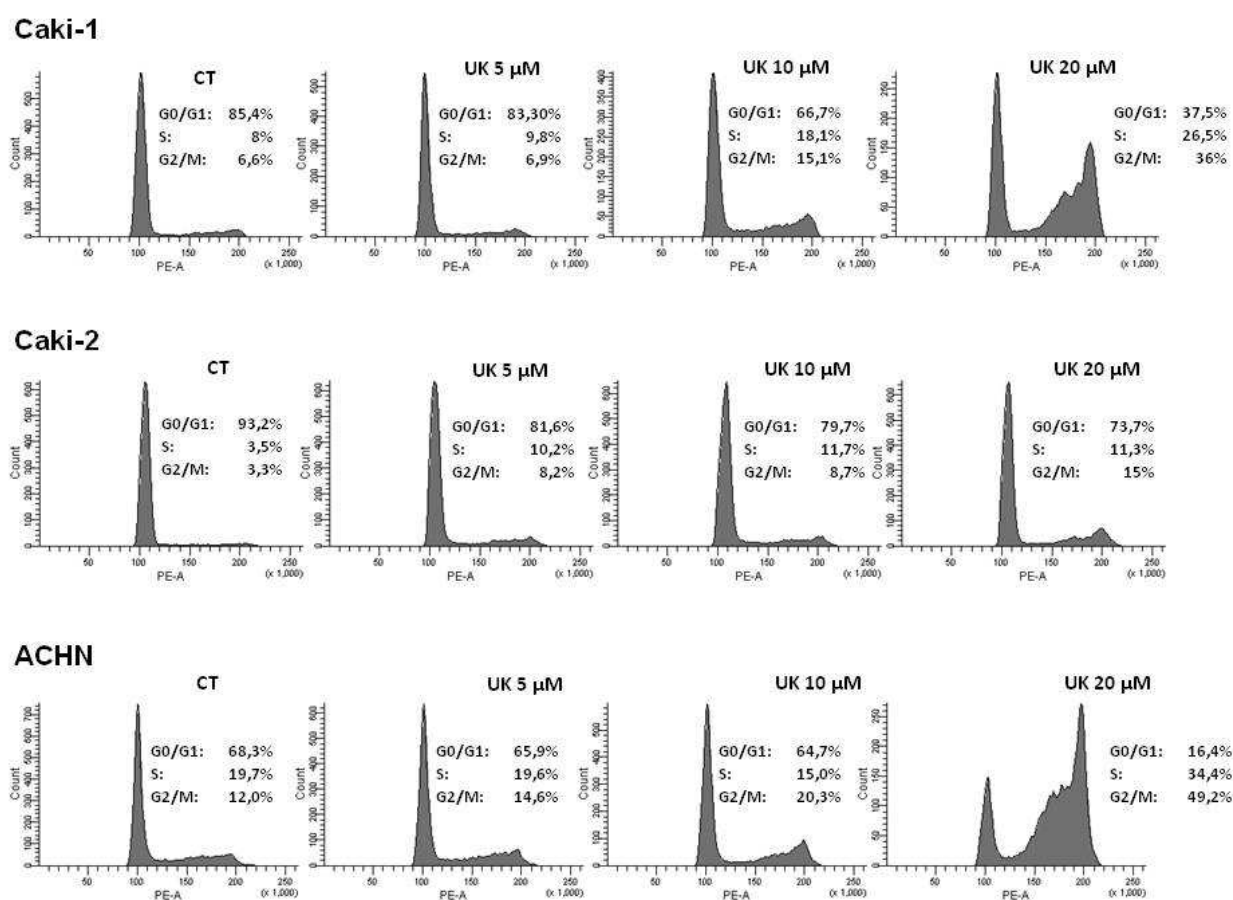


Figura 32. Distribuzione delle fasi del ciclo cellulare nelle tre linee cellulari di ccRCC, non trattate (CT) e 48 ore dopo trattamento con Ukrain alle dosi di 5, 10, e 20 μM . La figura mostra la percentuale di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare, analizzata tramite citometria a flusso. UK: Ukrain.

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

DISCUSSIONE

Il carcinoma renale rappresenta l'80-85% dei tumori del rene e, fra questi, il 75% dei RCC è rappresentato dal carcinoma renale a cellule chiare, derivante dalla trasformazione neoplastica delle cellule che rivestono i tubuli contorti prossimali. Esso è caratterizzato dalla presenza di cellule con fenotipo altamente aggressivo e invasivo, da elevata recidiva dopo la resezione chirurgica, e da prognosi infausta [Motzer et al., 1996; Cohen e McGovern, 2005].

La progressione della maggior parte dei carcinomi è spesso accompagnata dal fenomeno di EMT che, portando le cellule alla perdita delle caratteristiche epiteliali e all'acquisizione di un fenotipo mesenchimale, svolge un ruolo fondamentale nel rendere le cellule tumorali invasive e in grado di diffondere nell'organismo formando metastasi a distanza.

Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare *in vitro* l'effetto del farmaco Ukrain su tre linee cellulari di ccRCC (Caki-1, Caki-2, e ACHN), con particolare attenzione agli aspetti legati alla proliferazione cellulare, all'espressione dei marcatori di EMT e di geni e proteine coinvolte nei meccanismi di invasività tumorale. Dati in letteratura hanno suggerito che Ukrain possa svolgere un potenziale effetto terapeutico nel trattamento di una gamma di tumori solidi tra cui il carcinoma del colon, del retto, della mammella, del pancreas, della vescica, dell'ovaio, e anche del rene [Ernst e Schmidt, 2005].

Gli esperimenti di **proliferazione cellulare** hanno evidenziato che Ukrain riduce la proliferazione delle cellule di ccRCC 24, 48, e 72 ore dopo il trattamento con Ukrain in modo dose-dipendente. Questo effetto è risultato evidente soprattutto dopo somministrazione di Ukrain 10 μ M e suggerisce che il farmaco abbia un effetto citostatico sulle cellule, verosimilmente determinato, in accordo con dati precedenti, dall'inibizione della sintesi di DNA, RNA e proteica, e dall'induzione di apoptosi cellulare [Nowicky et al., 1996; Gagliano et al., 2007]. Quest'ultima ipotesi è supportata dall'analisi dell'espressione dell'annexina V, che ha evidenziato un aumento dose-dipendente della percentuale di cellule apoptotiche nelle cellule di ccRCC trattate con Ukrain rispetto ai controlli.

Inoltre, è stato precedentemente dimostrato che Ukrain è in grado di diminuire la proliferazione cellulare e indurre il blocco delle cellule nella fase G2/M del ciclo cellulare mediante la depolimerizzazione della tubulina [Panzer et al., 2001] e il conseguente "mitotic slippage" che ne deriva. Su questo aspetto i nostri dati sono discordanti in quanto le analisi in immunofluorescenza sulle tre linee cellulari hanno mostrato una normale organizzazione del citoscheletro di tubulina, con evidenti microtubuli astrali integri e l'assenza di mitosi anomale, suggerendo che l'effetto antimitotico e antiproliferativo di Ukrain non sia basato sull'alterazione

della tubulina del citoscheletro.

Morfologia cellulare e transizione epitelio-mesenchimale

La perdita di adesione intercellulare e l'aumento della motilità, sono fenomeni che favoriscono l'invasività delle cellule tumorali. L'acquisizione del fenotipo metastatico è un processo costituito da più step, tra cui la EMT, che è un complesso processo biologico in cui la perdita di adesione cellulare fra le cellule epiteliali, la degradazione della membrana basale, la migrazione, e la conseguente invasione del microenvironment sono eventi necessari per il completamento dell'intero meccanismo [Yang e Liu, 2001]. La perdita di adesione cellula-cellula è una caratteristica della EMT che permette alle cellule tumorali di acquisire la capacità di infiltrare i tessuti circostanti e formare metastasi a distanza [Lee et al., 2006]. È noto, infatti, che le fasce aderenti sono significativamente ridotte nei pazienti con ccRCC rispetto ai tessuti normali [Kim et al., 2005]. Inoltre, la perdita graduale della **caderina E**, la principale proteina transmembrana delle fasce aderenti delle cellule epiteliali differenziate e polarizzate, si correla con l'aggressività di numerosi carcinomi, tra cui il ccRCC, e con il peggioramento della prognosi, mentre l'espressione forzata di caderina E tramite transfezione sopprime lo sviluppo del tumore in diversi modelli sperimentali tumorali *in vitro* e *in vivo* [Nelson e Nusse, 2004].

A livello intracellulare la caderina E lega la **β -catenina** che, a sua volta, collega il complesso della caderina al citoscheletro di actina. Il rilascio del complesso caderina E/ β -catenina dalla membrana plasmatica è stato precedentemente studiato ed è noto che esso non solo diminuisce i contatti cellula-cellula mediante la disgregazione della giunzione aderente [Marambaud et al., 2002], ma consente la liberazione della β -catenina e la sua traslocazione nel nucleo, dove può così svolgere la sua funzione di coattivatore trascrizionale [van Es et al., 2003].

I dati ottenuti dall'analisi al microscopio a fluorescenza mostrano che la localizzazione di entrambe le proteine caderina E e β -catenina è diffusa nel citoplasma nelle cellule controllo, in contrasto con quanto si osserva nelle cellule epiteliali differenziate, in cui la localizzazione del complesso caderina E/ β -catenina è situata a livello della membrana plasmatica e dei confini cellulari dove le cellule adiacenti sono in contatto fra loro. Dai dati emerge, inoltre, che il trattamento con Ukrain non è in grado di influenzare l'espressione della caderina E e della β -catenina, né di indurre la loro riespressione a livello della membrana plasmatica, suggerendo che il farmaco non sia quindi in grado di modulare questi marcatori di EMT ad entrambi i tempi di trattamento considerati.

Il fenotipo delle cellule trasformate è frequentemente caratterizzato da una evidente alterazione del citoscheletro actinico: la disgregazione del network di **actina** corticale favorisce la

diminuzione dell'adesione cellula-cellula e, di conseguenza, la mobilità delle cellule epiteliali trasformate [Ayollo et al., 2009]. Abbiamo, quindi, caratterizzato mediante tecnica di immunofluorescenza il pattern di espressione dei microfilamenti, il cui cambiamento può essere suggestivo della trasformazione cellulare [Pawlak e Helfman, 2001]. In particolare, durante la EMT si verifica una importante riorganizzazione del citoscheletro, e i filamenti actinici subcorticali presenti nelle cellule epiteliali vengono dissociati [Savagner, 2001].

I risultati dello studio mostrano che filamenti di actina nelle cellule controllo si localizzano diffusamente nel citoplasma, e che questo pattern di espressione non risulta influenzato dal trattamento con Ukrain nelle cellule della linea Caki-1. È interessante notare, invece, che nelle cellule Caki-2 e ACHN la somministrazione di Ukrain induce una evidente localizzazione dell'actina a livello dei contatti cellula-cellula, suggerendo che il farmaco può effettivamente indurre una riorganizzazione del citoscheletro di actina e la formazione di fasci di filamenti corticali, tipici del fenotipo epiteliale. I dati ottenuti sulle linee Caki-2 e ACHN suggeriscono che Ukrain possa indurre in queste cellule un fenotipo simil-epiteliale caratterizzato da presenza di actina corticale e polarità, sebbene non sia in grado di modificare complessivamente il pattern di espressione di caderina E e β -catenina.

La **vimentina** è una proteina del citoscheletro appartenente alla famiglia dei filamenti intermedi espressa nelle cellule di origine mesenchimale ed è un marcatore di EMT ampiamente utilizzato [Mendez et al., 2010]. Dati in letteratura suggeriscono che il silenziamento della vimentina induce le cellule mesenchimali ad adottare morfologie epiteliali, e che la trasfezione di vimentina in cellule epiteliali le induce ad adottare morfologie mesenchimali in seguito all'assemblaggio dei filamenti intermedi di vimentina. L'induzione del fenomeno di EMT in cellule renali Madin-Darby di cane è caratterizzata da una ridotta espressione di caderina E, da un aumento dell'espressione di vimentina [Martel et al., 1997], e da un'aumentata motilità cellulare [Mendez et al., 2010]. Diversi studi hanno dimostrato che la up-regolazione della vimentina nei carcinomi correla con i parametri di malignità quali il grado di incidenza del tumore e la sopravvivenza [Hendrix et al., 1996], e dalla letteratura è noto che il RCC è caratterizzato dall'espressione costante di vimentina [Iyer e Leong, 1992]. I nostri dati mostrano che la vimentina è espressa nelle cellule di ccRCC utilizzate, e che Ukrain non è in grado di down-regolarne l'espressione complessiva. Tuttavia, in alcune cellule delle linee Caki-1 e ACHN è stata osservata un'intensa localizzazione perinucleare dei filamenti intermedi di vimentina dopo somministrazione della dose 5 μ M di Ukrain. Questa riorganizzazione è coerente con l'incapacità di formare filamenti estesi e con la down-regolazione della vimentina stessa, ed è concomitante, nelle stesse cellule, con l'osservazione di filamenti di actina subcorticali, localizzati subito al di sotto della membrana plasmatica, organizzazione tipica del fenotipo epiteliale. Questi risultati

suggeriscono, in accordo con i dati dell'analisi morfologica, che alcune cellule di ccRCC siano in grado di revertire il loro fenotipo da mesenchimale a simil-epiteliale dopo trattamento con Ukrain

Considerati nel loro insieme, i dati sulla EMT suggeriscono una diversa risposta in base al tipo di cellula. In tutte le linee cellulari considerate, il trattamento con Ukrain non ha modificato l'immunoreattività per la caderina E e la β -catenina. Al contrario, Ukrain ha provocato diversi effetti sul citoscheletro, inducendo una riorganizzazione dei filamenti di actina nella linea Caki-2 ma non nella linea Caki-1, mentre ha avuto l'effetto opposto per quanto riguarda l'espressione della vimentina. Nella linea ACHN, l'espressione dell'actina e della vimentina sono entrambe influenzate da Ukrain a partire dalla somministrazione della dose più bassa di farmaco, suggerendo che le cellule della linea ACHN probabilmente rispondono in misura maggiore al farmaco nell'acquisizione di un fenotipo simil-epiteliale.

Per meglio comprendere i dati ottenuti relativamente all'effetto di Ukrain sui marcatori di EMT e sulla morfologia cellulare, è necessario considerare che è stato precedentemente dimostrato che cellule invasive e metastatiche possono conservare un fenotipo epiteliale differenziato [Rajasekaran et al., 2004]. Tale apparente controversia può essere spiegata come un fenomeno di EMT incompleta, suggerendo che la transizione di cellule epiteliali verso il fenotipo mesenchimale, così come delle cellule tumorali verso un fenotipo aggressivo maligno, non è un evento "tutto o nulla", bensì un processo a più fasi che si manifesta una vasta gamma di cambiamenti fenotipici [Christiansen e Rajasekaran, 2006]. Inoltre, le fasi che caratterizzano il processo di EMT non necessariamente si verificano consecutivamente e non sono tutte obbligatoriamente presenti in un dato campione. Sulla base di queste indicazioni, si può ipotizzare che Ukrain possa contribuire a revertire il fenotipo maligno delle cellule di ccRCC tramite modificazione del citoscheletro di actina e vimentina, portando così le cellule ad acquisire un fenotipo più simile a quello epiteliale polarizzato, anche se in queste stesse cellule il pattern di espressione del complesso caderina E/ β -catenina non sembra modificato.

Attività delle metalloproteinasi della matrice e potenziale invasivo

Perturbazioni nell'omeostasi finemente regolata dei processi fisiologici di rimodellamento della matrice extracellulare (ME) possono avere un ruolo importante in molte malattie, quali la fibrosi e la progressione tumorale [Kessenbrock et al., 2010]. I processi di invasione tumorale, che prevedono il distacco delle cellule dal loro microambiente, seguito dalla degradazione dei componenti della ME circostante, dal movimento delle cellule, e dal ripristino del microambiente

tumorale in un nuovo sito, permettono alle cellule della massa tumorale sul fronte invasivo di superare la barriera della ME, e penetrare nei tessuti adiacenti. Questo fenomeno è consentito dal rimodellamento della ME, che coinvolge le MMPs e la SPARC [McCawley e Matrisian, 2000].

Le **gelatinasi MMP-2** e **MMP-9** sono le proteasi maggiormente coinvolte nei meccanismi di rimodellamento della ME e di invasività tumorale, e sono marcatori di EMT. Studi *in vitro* hanno dimostrato che il rimodellamento e la degradazione proteolitica della ME da parte delle MMPs consente l'invasione delle cellule tumorali nelle zone adiacenti al tumore stesso [Liotta e Stetler-Stevenson, 1991] determinando una diffusione di cellule neoplastiche nel circolo ematico e la conseguente formazione di metastasi a distanza.

In numerosi tipi di tumore, tra cui anche il RCC, l'up-regolazione della MMP-2 e MMP-9 correla con prognosi scarsamente favorevoli [Kallakury et al., 2001]. Dati in letteratura indicano che i pazienti con ccRCC che presentano elevata attivazione della MMP-2 o MMP-9 hanno avuto una minor sopravvivenza, e più alta frequenza di metastasi, soprattutto dopo aumento dell'attività della MMP-9 [Kawata et al., 2006; Kawata et al., 2007]. I pazienti con carcinoma renale con coinvolgimento delle vene maggiori o invasione di tessuti perirenali presentano una più alta espressione di MMP-2 attiva rispetto a quelli i cui tumori sono limitati ai soli reni [Takahashi et al., 2002]. Inoltre, una tendenza ad una più elevata espressione e attivazione della MMP-2 è stata descritta nei tumori T3, rispetto ai T1 e T2, questo a ulteriore conferma dell'ipotesi che la MMP-2 svolge un ruolo chiave nel promuovere l'invasione metastatica del carcinoma renale [Takahashi et al., 2002].

In questo studio è stato analizzato se Ukrain sia in grado di influenzare l'espressione delle gelatinasi MMP-2 e MMP-9 che, come sopra citato, svolgono un ruolo rilevante durante l'invasione dei carcinomi, a causa della loro attività nella degradazione del collagene di tipo IV della membrana basale [Collier et al., 1988]. Considerati nel loro insieme, i risultati relativi all'espressione delle MMP-2 e MMP-9 mostrano che Ukrain è in grado di diminuire significativamente la loro attività 48 ore dopo la somministrazione, suggerendo che il farmaco possa effettivamente modulare il potenziale invasivo delle cellule di ccRCC. Questo suggerimento è stato confermato dal test di invasività eseguito sulle linee di ccRCC, che ha mostrato come le cellule trattate con Ukrain abbiano un potenziale meno invasivo rispetto ai controlli.

Espressione di SPARC

L'invasività tumorale e i fenomeni metastatici che si verificano nel contesto della ME, come anche la maggioranza delle interazioni cellula-ME, sono mediate da **SPARC**, una glicoproteina non strutturale della matrice coinvolta in diversi processi biologici correlati con il rimodellamento della ME, il differenziamento cellulare, la migrazione e la proliferazione [Bradshaw e Sage, 2001; Brekken e Sage, 2001]. SPARC è altamente espressa in una vasta gamma di tumori maligni umani, e alterazioni della sua espressione sono spesso correlate con la progressione della malattia e/o con la cattiva prognosi [Wewer et al., 1988; Massi et al., 1999; Thomas et al., 2000; Yamanaka et al., 2001]. Sebbene SPARC sia generalmente over-espressa nei tumori maligni, è stato dimostrato che in cellule di carcinoma ovarico essa svolge anche una funzione di onco-soppressore [Yiu et al., 2001], suggerendo così che le proprietà biologiche di SPARC possono essere variabili nei diversi tipi di cancro.

Per quanto riguarda la funzione di SPARC nella regolazione delle interazioni con la ME, essa è dotata di proprietà antiadesive mediante un'azione antagonista che coinvolge la famiglia delle integrine [Motamed e Sage, 1997], permettendo la regolazione delle interazioni cellula-matrice. Nei meccanismi che portano all'invasione del tumore, la capacità delle cellule tumorali di migrare e invadere l'ambiente circostante dipende dalla modulazione delle interazioni tra cellule tumorali e componenti della ME. Pertanto, SPARC può giocare un ruolo funzionale durante l'invasione delle cellule tumorali nei tessuti adiacenti.

I risultati di questo studio mostrano che i livelli di SPARC secreta nel medium di coltura delle cellule di ccRCC considerate sono significativamente ridotti dal trattamento con Ukrain, suggerendo che il farmaco può essere efficace nel ridurre il rimodellamento della ME, rendendo il microambiente tumorale meno permissivo per l'invasione tumorale e la migrazione. I livelli di SPARC nei lisati cellulari mostrano invece un pattern di espressione opposto rispetto alla proteina secreta. Infatti, i nostri risultati mostrano che i livelli intracellulari di SPARC, anche se invariati nelle cellule ACHN dopo il trattamento con Ukrain, risultano aumentati nelle cellule Caki-1 e Caki-2 dopo 48 ore di trattamento. Questo è un dato molto interessante alla luce della dimostrazione dell'attività di SPARC come potente agente antiproliferativo in grado di inibire il ciclo cellulare nelle fasi G0 e G2 [Rempel et al., 2001]. La down-regolazione intracellulare di SPARC, a causa della metilazione del suo promotore, è stata precedentemente descritta nel carcinoma ovarico umano [Said e Motamed, 2005; Socha et al., 2009], ed è correlata ad una maggiore proliferazione e progressione del ciclo cellulare [Rempel et al., 2001]. Pertanto, elevati livelli di SPARC intracellulare indotti dalla somministrazione di Ukrain possono essere correlati ad una ridotta capacità delle cellule di progredire nel ciclo, e di conseguenza, ad una ridotta

proliferazione cellulare [Funk e Sage, 1993].

I nostri dati sui livelli intracellulari di SPARC sono in accordo con i risultati ottenuti dall'analisi del ciclo cellulare, che mostrano che un numero considerevole di cellule trattate con Ukrain hanno subito un arresto nella fase G2/M, rispetto ai controlli, e forniscono una forte evidenza che Ukrain possa contribuire a indurre l'arresto del ciclo cellulare e, di conseguenza, l'inibizione della divisione cellulare nelle cellule di ccRCC. Tuttavia, saranno necessari ulteriori studi per meglio comprendere la relazione esistente tra i livelli intracellulari di SPARC e la ridotta proliferazione cellulare dopo la somministrazione di Ukrain.

Complessivamente, l'espressione di SPARC suggerisce che Ukrain è in grado di influenzare i livelli di SPARC extracellulare e intracellulare, verosimilmente riducendo il rimodellamento della ME del microambiente circostante il tumore ed eventualmente riducendo la proliferazione cellulare. Questa ipotesi si basa sul suggerimento che SPARC possa sortire effetti diversi nell'ambiente intra ed extracellulare, ed è supportata dalla dimostrazione che essa possa essere traslocata nel nucleo mediante endocitosi [Gooden et al., 1999], dove può esercitare i suoi effetti sul ciclo cellulare. Tuttavia, i complessi meccanismi che portano in concomitanza alla differenza dei livelli di SPARC intracellulare e secreta rimane una questione aperta.

CONCLUSIONI

Studi recenti hanno dimostrato l'importanza della EMT e dell'invasività tumorale nella prognosi, nella scelta delle terapie, e nella ricerca e sviluppo di nuovi farmaci per la cura dei più comuni carcinomi umani, incluso il RCC.

Considerati nel loro insieme, i nostri risultati sullo studio degli effetti del farmaco Ukrain su cellule di ccRCC umane suggeriscono che esso possa esercitare effetti rilevanti sulla modulazione *in vitro* del carcinoma renale a cellule chiare. In particolare, si è potuto dimostrare che Ukrain ha come target nelle cellule di ccRCC alcuni marcatori di EMT, inducendo in queste cellule il ripristino di un fenotipo simil-epiteliale. Inoltre, è risultato evidente che Ukrain è in grado di influenzare significativamente i due aspetti principali coinvolti nella tumorigenesi del RCC, quali il rimodellamento della ME e la proliferazione cellulare.

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Wahed, M. M., N. Y. Asaad, et al. (2004). "Expression of matrix metalloproteinase-2 in renal cell carcinoma." J Egypt Natl Canc Inst **16**(3): 168-77.
- Ayollo, D. V., I. Y. Zhitnyak, et al. (2009). "Rearrangements of the actin cytoskeleton and E-cadherin-based adherens junctions caused by neoplastic transformation change cell-cell interactions." PLoS One **4**(11): e8027.
- Birkedal-Hansen, H., W. G. Moore, et al. (1993). "Matrix metalloproteinases: a review." Crit Rev Oral Biol Med **4**(2): 197-250.
- Bradshaw, A. D. and E. H. Sage (2001). "SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury." J Clin Invest **107**(9): 1049-54.
- Brekken, R. A. and E. H. Sage (2001). "SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication." Matrix Biol **19**(8): 816-27.
- Burnette, W. N. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.
- Cano, C. E., Y. Motoo, et al. (2010). "Epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic adenocarcinoma." ScientificWorldJournal **10**: 1947-57.
- Catania, J. M., G. Chen, et al. (2007). "Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology." Am J Physiol Renal Physiol **292**(3): F905-11.
- Christiansen, J. J. and A. K. Rajasekaran (2006). "Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis." Cancer Res **66**(17): 8319-26.
- Cohen, H. T. and F. J. McGovern (2005). "Renal-cell carcinoma." N Engl J Med **353**(23): 2477-90.
- Collier, I. E., S. M. Wilhelm, et al. (1988). "H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen." J Biol Chem **263**(14): 6579-87.
- Corcoran, M. L. and W. G. Stetler-Stevenson (1995). "Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism." J Biol Chem **270**(22): 13453-9.
- Costa, L. J. and H. A. Drabkin (2007). "Renal cell carcinoma: new developments in molecular biology and potential for targeted therapies." Oncologist **12**(12): 1404-15.
- Erba, E., L. Bassano, et al. (2002). "Cell cycle phase perturbations and apoptosis in tumour cells induced by apilidine." Br J Cancer **86**(9): 1510-7.
- Ernst, E. and K. Schmidt (2005). "Ukrain - a new cancer cure? A systematic review of randomised clinical trials." BMC Cancer **5**: 69.
- Facchini, G., F. Perri, et al. (2009). "New treatment approaches in renal cell carcinoma." Anticancer Drugs **20**(10): 893-900.
- Ferber, E. C., M. Kajita, et al. (2008). "A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus." J Biol Chem **283**(19): 12691-700.
- Ficarra, V., M. Brunelli, et al. (2010). "Prognostic and therapeutic impact of the histopathologic definition of parenchymal epithelial renal tumors." Eur Urol **58**(5): 655-68.

- Francki, A., A. D. Bradshaw, et al. (1999). "SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor-beta1 in mesangial cells." J Biol Chem **274**(45): 32145-52.
- Friedl, P. (2004). "Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration." Curr Opin Cell Biol **16**(1): 14-23.
- Funk, S. E. and E. H. Sage (1993). "Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts." J Cell Physiol **154**(1): 53-63.
- Gagliano, N., C. Moscheni, et al. (2007). "Ukrain modulates glial fibrillary acidic protein, but not connexin 43 expression, and induces apoptosis in human cultured glioblastoma cells." Anticancer Drugs **18**(6): 669-76.
- Gnarra, J. R., K. Tory, et al. (1994). "Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma." Nat Genet **7**(1): 85-90.
- Gooden, M. D., R. B. Vernon, et al. (1999). "Cell cycle-dependent nuclear location of the matricellular protein SPARC: association with the nuclear matrix." J Cell Biochem **74**(2): 152-67.
- Gooding, J. M., K. L. Yap, et al. (2004). "The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures." Bioessays **26**(5): 497-511.
- Gregory, C. D. and J. D. Pound (2010). "Microenvironmental influences of apoptosis in vivo and in vitro." Apoptosis **15**(9): 1029-49.
- Harris, E. D., Jr., H. G. Welgus, et al. (1984). "Regulation of the mammalian collagenases." Coll Relat Res **4**(6): 493-512.
- Hartsock, A. and W. J. Nelson (2008). "Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton." Biochim Biophys Acta **1778**(3): 660-9.
- Hay, E. D. (1991). Cell biology of extracellular matrix. New York, Plenum Publishing Co, N Y.
- Hendrix, M. J., E. A. Sefror, et al. (1996). "Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis." Cancer Metastasis Rev **15**(4): 507-25.
- Hohenwarter, O., K. Strutzenberger, et al. (1992). "Selective inhibition of in vitro cell growth by the anti-tumour drug Ukrain." Drugs Exp Clin Res **18** **Suppl**: 1-4.
- Huber, M. A., N. Kraut, et al. (2005). "Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression." Curr Opin Cell Biol **17**(5): 548-58.
- Islam, S., J. B. Kim, et al. (2000). "Vimentin expression in human squamous carcinoma cells: relationship with phenotypic changes and cadherin-based cell adhesion." J Cell Biochem **78**(1): 141-50.
- Iyer, P. V. and A. S. Leong (1992). "Poorly differentiated squamous cell carcinomas of the skin can express vimentin." J Cutan Pathol **19**(1): 34-9.
- Jellin, J. M., P. Gragory, et al. (2000). Pharmacist's Letter / Prescriber's Letter Natural Medicines Comprehensive Database. Stockton, CA: Therapeutic Research Faculty.
- Kallakury, B. V., S. Karikhalli, et al. (2001). "Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma." Clin Cancer Res **7**(10): 3113-9.

- Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-8.
- Kawata, N., Y. Nagane, et al. (2007). "Significant relationship of matrix metalloproteinase 9 with nuclear grade and prognostic impact of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 for incidental clear cell renal cell carcinoma." Urology **69**(6): 1049-53.
- Kawata, N., Y. Nagane, et al. (2006). "Strong significant correlation between MMP-9 and systemic symptoms in patients with localized renal cell carcinoma." Urology **68**(3): 523-7.
- Kessenbrock, K., V. Plaks, et al. (2010). "Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment." Cell **141**(1): 52-67.
- Kim, G., S. A. Rajasekaran, et al. (2005). "Renal clear-cell carcinoma: an ultrastructural study on the junctional complexes." Histol Histopathol **20**(1): 35-44.
- Kleiner, D. E. and W. G. Stetler-Stevenson (1994). "Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases." Anal Biochem **218**(2): 325-9.
- Kreitmair, H. (1950). "[Hypericum perforatum, St. John's wort]." Pharmazie **5**(11): 556-7.
- Kumar, V., A. K. Abbas, et al. (2006). Le basi patologiche delle malattie, patologia generale. Milan, Elsevier.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- LaGamba, D., A. Nawshad, et al. (2005). "Microarray analysis of gene expression during epithelial-mesenchymal transformation." Dev Dyn **234**(1): 132-42.
- Lam, J. S., T. Klatte, et al. (2009). "Staging of renal cell carcinoma: Current concepts." Indian J Urol **25**(4): 446-54.
- Lam, J. S., J. T. Leppert, et al. (2005). "Novel approaches in the therapy of metastatic renal cell carcinoma." World J Urol **23**(3): 202-12.
- Lane, T. F., M. L. Iruela-Arispe, et al. (1994). "SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis." J Cell Biol **125**(4): 929-43.
- Lang, S. H., C. Hyde, et al. (2002). "Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma." Prostate **52**(4): 253-63.
- Le Clainche, C. and M. F. Carlier (2008). "Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration." Physiol Rev **88**(2): 489-513.
- Lee, J. M., S. Dedhar, et al. (2006). "The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease." J Cell Biol **172**(7): 973-81.
- Liotta, L. A. and W. G. Stetler-Stevenson (1991). "Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation." Cancer Res **51**(18 Suppl): 5054s-5059s.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- Marambaud, P., J. Shioi, et al. (2002). "A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions." Embo J **21**(8): 1948-56.

- Martel, C., F. Harper, et al. (1997). "Inactivation of retinoblastoma family proteins by SV40 T antigen results in creation of a hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop associated with an epithelial-fibroblastoid conversion and invasiveness." Cell Growth Differ **8**(2): 165-78.
- Massi, D., A. Franchi, et al. (1999). "Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas." Hum Pathol **30**(3): 339-44.
- McCawley, L. J. and L. M. Matrisian (2000). "Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression." Mol Med Today **6**(4): 149-56.
- Mendez, M. G., S. Kojima, et al. (2010). "Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition." Faseb J **24**(6): 1838-51.
- Mendoza, J., R. Zamora, et al. (2006). "NF-kappaB does not influence the induction of apoptosis by Ukrain." Cancer Biol Ther **5**(7): 788-93.
- Motamed, K. and E. H. Sage (1997). "Regulation of vascular morphogenesis by the matricellular protein SPARC." Kidney Int **51**(5): 1383-7.
- Motamed, K. and E. H. Sage (1998). "SPARC inhibits endothelial cell adhesion but not proliferation through a tyrosine phosphorylation-dependent pathway." J Cell Biochem **70**(4): 543-52.
- Motzer, R. J., N. H. Bander, et al. (1996). "Renal-cell carcinoma." N Engl J Med **335**(12): 865-75.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem **274**(31): 21491-4.
- Nelson, W. J. (2008). "Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex." Biochem Soc Trans **36**(Pt 2): 149-55.
- Nelson, W. J. and R. Nusse (2004). "Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways." Science **303**(5663): 1483-7.
- Nowicky, J. W., W. Hiesmayr, et al. (1996). "Influence of Ukrain on DNA, RNA and protein synthesis in malignant cells." Drugs Exp Clin Res **22**(3-5): 81-91.
- Olson, M. F. and E. Sahai (2009). "The actin cytoskeleton in cancer cell motility." Clin Exp Metastasis **26**(4): 273-87.
- Panzer, A., A. M. Joubert, et al. (2001). "The effects of chelidonine on tubulin polymerisation, cell cycle progression and selected signal transmission pathways." Eur J Cell Biol **80**(1): 111-8.
- Panzer, A., A. M. Joubert, et al. (2000). "The antimitotic effects of Ukrain, a Chelidonium majus alkaloid derivative, are reversible in vitro." Cancer Lett **150**(1): 85-92.
- Pawlak, G. and D. M. Helfman (2001). "Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis." Curr Opin Genet Dev **11**(1): 41-7.
- Pei, D. and S. J. Weiss (1995). "Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen." Nature **375**(6528): 244-7.
- Peinado, H., F. Portillo, et al. (2004). "Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis." Int J Dev Biol **48**(5-6): 365-75.
- Pollard, T. D. and G. G. Borisy (2003). "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." Cell **112**(4): 453-65.

- Potenta, S., E. Zeisberg, et al. (2008). "The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression." Br J Cancer **99**(9): 1375-9.
- Rajasekaran, S. A., J. Gopal, et al. (2004). "HPAF-II, a cell culture model to study pancreatic epithelial cell structure and function." Pancreas **29**(3): e77-83.
- Rathmell, W. K., R. Pruthi, et al. (2010). "Neoadjuvant treatment of renal cell carcinoma." Urol Oncol **28**(1): 69-73.
- Reed, M. J. and E. H. Sage (1996). "SPARC and the extracellular matrix: implications for cancer and wound repair." Curr Top Microbiol Immunol **213** (Pt 1): 81-94.
- Rempel, S. A., S. Ge, et al. (1999). "SPARC: a potential diagnostic marker of invasive meningiomas." Clin Cancer Res **5**(2): 237-41.
- Rempel, S. A., W. A. Golembieski, et al. (2001). "SPARC modulates cell growth, attachment and migration of U87 glioma cells on brain extracellular matrix proteins." J Neurooncol **53**(2): 149-60.
- Said, N. and K. Motamed (2005). "Absence of host-secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) augments peritoneal ovarian carcinomatosis." Am J Pathol **167**(6): 1739-52.
- Sakai, N., M. Baba, et al. (2001). "SPARC expression in primary human renal cell carcinoma: upregulation of SPARC in sarcomatoid renal carcinoma." Hum Pathol **32**(10): 1064-70.
- Savagner, P. (2001). "Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition." Bioessays **23**(10): 912-23.
- Schuetz, A. N., Q. Yin-Goen, et al. (2005). "Molecular classification of renal tumors by gene expression profiling." J Mol Diagn **7**(2): 206-18.
- Schultz, C., N. Lemke, et al. (2002). "Secreted protein acidic and rich in cysteine promotes glioma invasion and delays tumor growth in vivo." Cancer Res **62**(21): 6270-7.
- Shapiro, L. and W. I. Weis (2009). "Structure and biochemistry of cadherins and catenins." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(3): a003053.
- Socha, M. J., N. Said, et al. (2009). "Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer." Neoplasia **11**(2): 126-35.
- Strutz, F., M. Zeisberg, et al. (2002). "Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation." Kidney Int **61**(5): 1714-28.
- Takahashi, M., N. Oka, et al. (2002). "Prognostic significance of matrix metalloproteinases-2 activation ratio in renal cell carcinoma." Int J Urol **9**(10): 531-8.
- Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-54.
- Thiery, J. P. and J. P. Sleeman (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(2): 131-42.
- Thomas, R., L. D. True, et al. (2000). "Differential expression of osteonectin/SPARC during human prostate cancer progression." Clin Cancer Res **6**(3): 1140-9.
- van Es, J. H., N. Barker, et al. (2003). "You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway." Curr Opin Genet Dev **13**(1): 28-33.

- Vicovac, L. and J. D. Aplin (1996). "Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation." Acta Anat (Basel) **156**(3): 202-16.
- Vignjevic, D. and G. Montagnac (2008). "Reorganisation of the dendritic actin network during cancer cell migration and invasion." Semin Cancer Biol **18**(1): 12-22.
- Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-39.
- Vleminckx, K., L. Vakaet, Jr., et al. (1991). "Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role." Cell **66**(1): 107-19.
- Wewer, U. M., R. Albrechtsen, et al. (1988). "Osteonectin/SPARC/BM-40 in human decidua and carcinoma, tissues characterized by de novo formation of basement membrane." Am J Pathol **132**(2): 345-55.
- Wheelock, M. J. and K. R. Johnson (2003). "Cadherins as modulators of cellular phenotype." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 207-35.
- Willert, K. and R. Nusse (1998). "Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling." Curr Opin Genet Dev **8**(1): 95-102.
- Woessner, J. F., Jr. (1991). "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling." Faseb J **5**(8): 2145-54.
- Wrana, J. L. (2000). "Regulation of Smad activity." Cell **100**(2): 189-92.
- Yamanaka, M., K. Kanda, et al. (2001). "Analysis of the gene expression of SPARC and its prognostic value for bladder cancer." J Urol **166**(6): 2495-9.
- Yan, Q. and E. H. Sage (1999). "SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions." J Histochem Cytochem **47**(12): 1495-506.
- Yang, J. and Y. Liu (2001). "Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis." Am J Pathol **159**(4): 1465-75.
- Yilmaz, M. and G. Christofori (2009). "EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion." Cancer Metastasis Rev **28**(1-2): 15-33.
- Yiu, G. K., W. Y. Chan, et al. (2001). "SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells." Am J Pathol **159**(2): 609-22.
- Young, B. A., P. Wang, et al. (1998). "The counteradhesive protein SPARC regulates an endothelial paracellular pathway through protein tyrosine phosphorylation." Biochem Biophys Res Commun **251**(1): 320-7.
- Zambrano, N. R., I. A. Lubensky, et al. (1999). "Histopathology and molecular genetics of renal tumors toward unification of a classification system." J Urol **162**(4): 1246-58.
- Zavadil, J. and E. P. Bottinger (2005). "TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions." Oncogene **24**(37): 5764-74.