

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA SALUTE**

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
*FISIOPATOLOGIA, FARMACOLOGIA, CLINICA E TERAPIA DELLE MALATTIE  
METABOLICHE*



*CICLO XXVI*

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**STUDIO DELLE CITOCHINE E DELLE  
METALLOPROTEASI NELLA  
LINFANGIOLEIOMIOMATOSI E  
NELLA SCLEROSI TUBEROSA**

Settore scientifico-disciplinare: BIO/14

DOTTORANDO: Emanuela Orpianesi  
MATRICOLA: R09274

TUTOR: Chiar.mo Prof. Alfredo Gorio

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Chiar.mo Prof Alfredo Gorio

ANNO ACCADEMICO: 2012/2013

# INDICE

INTRODUZIONE .....	3
La sclerosi tuberosa (TSC).....	4
La linfangioleiomiomatosi (LAM) .....	5
Basi genetiche della TSC .....	5
Funzione di amartina e tuberina: il complesso THC .....	6
La via intracellulare di mTOR .....	8
Teoria metastatica benigna nella LAM e nella TSC .....	10
Epithelial mesenchymal transition (EMT).....	11
Le metalloproteasi (MMPs).....	12
Citochine ed interleuchine .....	14
Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) .....	14
Interleuchine.....	14
Approcci terapeutici per la LAM e la TSC.....	16
La rapamicina.....	16
L'anti-EGFR Ab .....	17
La doxiciclina.....	18
Le statine.....	18
BACKGROUND .....	20
MATERIALI E METODI.....	27
Mantenimento delle cellule.....	28
Conservazione delle cellule.....	29
Conta delle cellule mediante camera di Neubauer .....	29
Trattamento delle cellule .....	29
Raccolta delle cellule .....	30
Elettroforesi su gel di SDS PAGE.....	30
Western blotting .....	30
Immunofluorescenza .....	34
Estrazione RNA .....	34
Analisi qualitativa dell'RNA totale estratto .....	35
Retrotrascrizione dell'RNA .....	35

Analisi dell'espressione genica.....	35
Analisi citofluorimetrica.....	37
ELISA.....	37
Wound healing.....	38
Analisi statistica dei risultati.....	38
<b>SCOPO DELLA RICERCA .....</b>	<b>39</b>
<b>RISULTATI .....</b>	<b>45</b>
Caratterizzazione biochimica delle cellule LAM/TSC in fase di adesione e sospensione.....	46
Epithelial to mesenchymal transition (EMT) nelle cellule LAM/TSC .....	48
Ruolo di FAK ( <i>Focal adhesion kinase</i> ) nelle cellule LAM/TSC nello stato di adesione e sospensione.....	49
Azione dell' anticorpo anti-EGFR e della rapamicina sullo stato di adesione e sospensione nelle cellule LAM/TSC .....	50
Livelli di espressione e secrezione delle citochine infiammatorie nelle cellule LAM/TSC .....	50
Espressione della MMP-2, MMP-7 e livelli di EMMPRIN nelle cellule LAM/TSC .....	51
Azione dell' anticorpo anti-EGFR e della rapamicina sui livelli di MMP-2, di MMP-7 e di EMMPRIN.....	53
Valutazione della capacità migratoria e invasiva delle cellule LAM/TSC.....	55
Analisi dell' espressione e della secrezione delle MMP-2 e MMP-7 nelle cellule LAM/TSC durante la migrazione cellulare ed azione dell' anticorpo anti-EGFR e della rapamicina .....	56
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>59</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>68</b>
<b>FIGURE .....</b>	<b>83</b>

# INTRODUZIONE

## LA SCLEROSI TUBEROSA (TSC)

La sclerosi tuberosa (TSC) è una patologia multisistemica caratterizzata dalla formazione di amartomi in diversi organi come il cervello, il polmone, la pelle, il cuore e i reni. Circa l'80% dei pazienti affetti da TSC sviluppano complicazioni a livello del sistema nervoso centrale che includono epilessia, difficoltà nell'apprendimento e autismo. La TSC è una malattia rara che ha un'incidenza di circa 1:6000 tra i nuovi nati (Orlova and Crino et al., 2010). La TSC può presentarsi anche in forma sporadica e nuove mutazioni sono state riconosciute in più del 75% dei casi. Maschi e femmine possono essere colpiti in egual modo e la possibilità di trasmettere la patologia alla progenie è del 50%. Le manifestazioni dermatologiche, già presenti in età pediatrica, includono macchie ipomelanotiche, che sono state riscontrate in più del 90% dei pazienti, e angiofibromi facciali, presenti nel 75% della popolazione con TSC (Jozwiak et al., 2000). Le anomalie neurologiche includono epilessia (Thiele et al., 2004), disfunzioni neurocognitive (Prather et al., 2004) e disordini dello sviluppo come l'autismo (Smalley et al., 1998). Le lesioni renali si presentano nel 50-80% dei pazienti affetti da TSC ed includono angiomiolipomi (AML), cisti renali, carcinoma renale, e oncocitoma. Gli AMLs sono tumori benigni composti, principalmente, da cellule adipose, cellule muscolari lisce e vasi sanguigni (Eble et al., 1998). Possono svilupparsi in soggetti "sani" o in associazione con la TSC o con la linfangioleiomiomatosi (LAM) sporadica. L'80% dei pazienti TSC sviluppa AMLs renali, con una frequenza maggiore nelle donne rispetto agli uomini. Questo potrebbe indicare una regolazione ormonale della crescita, infatti, spesso, gli AMLs esprimono recettori per gli estrogeni e il progesterone (Logginidou et al., 2000). Gli AMLs di pazienti affetti da TSC contengono diversi tipi di vasi sanguigni, quattro dei quali (cellulari, emangiopericitici, glomeruloidi e aneurismatici) mostrano perdita di eterozigosita' (*loss of heterozygosity*, LOH) indice della loro origine neoplastica, mentre un tipo di vaso (collagenoso) non mostra LOH. La presenza di LOH nelle tre componenti dell'AML conferma l'ipotesi che gli angiomiolipomi derivino da una cellula mesenchimale che mantiene la caratteristica neoplastica (Karbowiczek et al., 2003).

LOH nei vasi sanguigni, nelle cellule muscolari lisce e in quelle adipose, e' in accordo con l'ipotesi che gli AMLs possano derivare da un comune precursore mesenchimale che ha la capacità di differenziarsi in diverse linee cellulari (Henske et al., 2005).

## **LA LINFANGIOLEIOMIOMATOSI (LAM)**

La LAM è una malattia rara e progressiva caratterizzata da una proliferazione anormale delle cellule muscolari lisce (cellule LAM) e conseguente distruzione cistica del parenchima polmonare, tumori addominali e infiltrazione del sistema linfatico assiale nel torace e nell'addome (Taveira- DaSilva et al., 2006). La LAM colpisce quasi esclusivamente le donne in età fertile, con un'incidenza di 2, 6 casi su un milione di donne e può manifestarsi sia in forma sporadica, sia associata alla sclerosi tuberosa (TSC) (Costello et al., 2000; Taveira- DaSilva et al., 2006). Anche se è stato osservato e descritto un caso di LAM in un paziente maschio affetto da TSC, la manifestazione della LAM nel sesso maschile è controversa (Ryu et al., 2012). L'alterazione della struttura polmonare è la causa dei sintomi della LAM (come dispnea e pneumotorace) che portano ad insufficienza respiratoria e, infine, a morte con un'evoluzione estremamente variabile. Circa il 50% delle pazienti con LAM sporadica presentano AML renali e per questo motivo, è stato ipotizzato che la LAM sia il risultato di una diffusione metastatica delle cellule muscolari lisce provenienti dell'AML (Yu et al., 2009).

## **BASI GENETICHE DELLA TSC**

*TSC1* (localizzato sul cromosoma 9q34) e *TSC2* (localizzato sul cromosoma 16q13.3) sono i geni coinvolti nella sclerosi tuberosa; l'inattivazione dei due geni può essere causata da mutazioni nonsense, missenso, inserzioni e delezioni. Studi mutazionali hanno dimostrato che le mutazioni nel gene *TSC2* sono cinque volte più comuni rispetto a mutazioni in *TSC1* nei pazienti affetti da TSC sporadica. In accordo con questo dato, i pazienti affetti da *TSC1* sembrano avere complicazioni meno severe rispetto a quelli colpiti da *TSC2*. La diversa natura degli amartomi osservati nei pazienti con TSC ha suggerito che questi tumori si possano sviluppare secondo la teoria del "doppio colpo" (second hit) proposta da Knudson (Knudson. 1971). Nei casi ereditari una prima alterazione

genetica (“primo colpo”) viene ereditata nella linea germinale da un genitore affetto, e la seconda mutazione (“secondo colpo”) avviene sull’allele sano causando la completa inattivazione di uno dei due geni della TSC, *TSC1* o *TSC2*, e, di conseguenza, la perdita di eterozigosità. LOH per *TSC1* o per *TSC2* è stata osservata con un’incidenza superiore al 50% negli AML e in percentuale di poco inferiore nei rhabdomiomi e nelle cellule LAM; nei tuberi corticali cerebrali e negli astrocitomi a cellule giganti subependimali l’LOH è stato osservato con una percentuale molto bassa (SEGA) (Carbonara et al., 1994; Henske et al., 1995; Henske et al., 2005; Han et al., 2004). Tuttavia, non è chiaro se l’inattivazione di entrambi gli alleli sia una condizione necessaria per la formazione degli amartomi. L’incapacità di determinare la seconda mutazione che causa il silenziamento dei geni TSC è stata attribuita alle metodiche fin’ora a disposizione e alla eterogenità cellulare degli amartomi. Recentemente è stato dimostrato che l’LOH nella TSC può essere causata da fattori epigenetici, come la metilazione del promotore del gene *TSC2* (Lesma et al., 2009). La metilazione del DNA è un evento epigenetico che causa modificazioni della cromatina. Consiste nel legame covalente di gruppi metilici alle basi azotate del DNA. La metilazione delle citosine negli eucarioti è molto frequente ed è associata a ridotti livelli di trascrizione dei geni. Grazie all’azione di alcuni enzimi, metiltransferasi specifiche, un gruppo metile viene legato al C-5 della citosina che la modifica in 5-metilcitosina. La metilazione delle isole CpG a livello della regione regolatrice di un gene determina il silenziamento del gene stesso poiché la cromatina non è più accessibile ai complessi di trascrizione.

## **FUNZIONE DI AMARTINA E TUBERINA: IL COMPLESSO THC**

*TSC1* o *TSC2* codificano rispettivamente per amartina e tuberina, due proteine in grado di interagire tra loro per formare un complesso funzionale che prende il nome di complesso tuberina-amartina (THC) (Yu et al., 2001; Plank et al., 1998; van Slegtenhorst et al., 1998).

*TSC1* è formato da 23 esoni, con sequenza codificante dall’esone 3 all’esone 23, e l’esone 2 può subire *splicing* alternativo. Amartina, il prodotto di *TSC1* è una proteina di 130 kDa espressa ubiquitariamente. A livello strutturale amartina

presenta un dominio *coiled-coil* tra gli aminoacidi 730-996, in prossimità della porzione C-terminale, dove sono presenti numerosi siti d'interazione con altre proteine. La regione tra i residui 145-510, vicino alla porzione N-terminale, è sede dell'interazione con Rho, che gioca un ruolo fondamentale nella regolazione e nel rimodellamento dell'actina del citoscheletro, mentre i residui 881-1084 interagiscono con la regione N-terminale delle proteine ezrina-radaxina-moesina (ERM), anch'esse implicate nella cascata delle Rho GTPasi e nel rimodellamento dell'actina (Krymskaya 2003; Lamb et al., 2000). Nella porzione C-terminale è stato individuato il sito di legame per i neurofilamenti L (NF-19), molto importante nei neuroni corticali (Haddad et al., 2002). Sempre nella regione N-terminale si trova il sito di legame per la tuberina (aa 302-430).

TSC2 è costituito da 41 esoni, di cui tre (25, 26 e 31) sono soggetti a *splicing* alternativo, e codifica per la proteina tuberina che ha peso molecolare di 200kDa (Cheadle et al., 2000).

Tuberina è una proteina altamente conservata nell'evoluzione e ha un elevato grado di omologia tra le varie specie. Il sito di legame responsabile dell'interazione con amartina è nella regione N-terminale, tra gli aminoacidi 1-418. Nella porzione C-terminale, tuberina presenta una piccola regione di omologia con la proteina ad attività GTPasica Rap1 che si estende per 157 aa tra i residui 1517-1674 (Maheshwar et al., 1997). Questo dominio permette a tuberina di svolgere la sua attività GAP (*GTPase activating protein*) su substrati come Rheb, Rap1 e Rab5. Rheb è il più importante target dell'attività GAP di tuberina. Il complesso amartina-tuberina tramite mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) agisce come un eterodimero inibendo la chinasi ribosomiale S6 (S6K) e regolando il fattore di elongazione 4EBP1 (*4 Elongation Binding protein 1*) e controlla, quindi, la crescita cellulare.

Il complesso THC è costituito da due subunità di amartina e da una di tuberina ed è localizzata prevalentemente a livello citosolico (Nellist et al., 1999).

L'interazione tra le due proteine è importante per la stabilità di entrambe, infatti, mentre amartina stabilizza tuberina prevenendone la degradazione, tuberina agisce come *chaperon* citosolica nei confronti di amartina (Nellist et al., 1999; Benvenuto et al., 2000). THC esplica la sua funzione integrando diverse vie di trasduzione del segnale mediate dallo stato energetico cellulare e da fattori di



crescita come l'EGF e l'IGF-1. Questi fattori agiscono tramite i loro recettori e attivano rispettivamente la via delle MAPK (Mitogen activated protein kinase) e della PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*). Tuberina possiede diversi siti di fosforilazione e la sua funzione può essere regolata da numerosi chinasi. Tra queste, Akt/PKB fosforila tuberina sui residui aminoacidici Ser 939, Thr993, Ser1130 e Thr1462, mentre ERK2 fosforila la Ser664. La fosforilazione ad opera di queste due chinasi causa il distacco di tuberina da amartina e l'inibizione di THC. La funzione principale di THC è il controllo di mTOR, una serina-treonina chinasi che regola la crescita e le funzioni cellulari (Hay et al., 2004). mTOR esercita la sua funzione fosforilando due molecole effettrici, S6K1 e 4E-BP1. Le cellule TSC e LAM, che hanno mutazioni nei geni *TSC*, sono caratterizzate da elevati livelli di fosforilazione della proteina S6 dovuta alla mancata inibizione di mTOR da parte di THC (Goncharova et al., 2002).

## **LA VIA INTRACELLULARE DI mTOR**

Il complesso THC è il principale regolatore cellulare di mTOR. Tuberina agisce come una GTPasi che attiva Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), una proteina G della famiglia di Ras (Garami et al., 2003). Quando Rheb lega il GTP è in grado di attivare mTOR prevenendo la sua associazione con l' inibitore endogeno FKBP38 (Long et al., 2005; Bai et al., 2007). Il complesso THC inibisce l'attività di mTOR stimolando la conversione della forma attiva di Rheb legato al GTP alla forma inattiva legata al GDP (Inoki et al., 2003).

mTOR è una serina/treonina chinasi di 280kDa conservata nel corso dell'evoluzione che regola una gran numero di processi biologici che includono la crescita cellulare, la trasduzione, la trascrizione, la biogenesi ribosomale, l'autofagia e il metabolismo (Wullschleger et al., 2006).

mTOR è il componente centrale dei due complessi: TORC1 e TORC2.

TORC1: In questo complesso mTOR è legato a due proteine, mLst8/GβL e raptor. Raptor interagisce con S6K1 e 4E-BP1 i quali possiedono un motivo TOS (*Tor Signaling*) che viene fosforilato (Schalm et al., 2002). La fosforilazione di S6K1 e 4EBP1 da parte di mTOR è inibita da interazioni specifiche su mTOS. Mutazioni di TOS in 4E-BP1 inibiscono la capacità della proteina di essere

fosforilata da mTOR. mLst8/GβL è invece necessaria per un efficace risosta del complesso ai segnali provenienti dai nutrienti e dallo stato energetico cellulare (Kim et al., 2002).

La via di attivazione di TORC1 è in grado di comunicare, tramite un cross-talk, con la via in cui agisce TORC2 e con altre vie metaboliche che operano nella cellula (Bauer et al., 2005). È stato dimostrato che l'aumento del glucosio da solo può stimolare la sintesi proteica del muscolo con elevata attività glicolitica (*fast-twitch glycolytic muscle*). La risposta del muscolo alla stimolazione del glucosio è stata associata ad un aumento della fosforilazione di Akt/PKB e della formazione del complesso d'inizio della trasduzione eIF4E-eIF4G, ma non a cambiamenti nella fosforilazione della AMPK, del complesso TSC, di mTOR, di 4EBP1, di p70S6K1 o di eEIF2. L'aumento di glucosio stimola la sintesi proteica nei neonati, e questa risposta è specifica per i muscoli ad elevata attività glicolitica e si attua attraverso una via indipendente da mTOR e AMPK (Jeyapalan et al., 2007). mTOR regola la trascrizione attraverso l'inibizione di 4E-BP1, che nel suo stato defosforilato si lega e inibisce il fattore eucariotico d'inizio della trascrizione 4E (eIF4E) che a sua volta riconosce e lega la porzione 5' dell'mRNA.

Il segnale mediato da mTOR è coinvolto anche nella regolazione dell'angiogenesi. mTOR regola i livelli di trascrizione e trasduzione del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) (Brugarolas et al., 2003). L'inattivazione del complesso THC che determina l'attivazione del segnale di mTOR, causa un aumento dei livelli intracellulari del fattore di trascrizione indotto dall'ipossia 1α (HIF1α), che a sua volta agisce sull'espressione di VEGF (Brugarolas et al., 2003).

La rapamicina, un agente immunosoppressore, inibisce mTORC1 determinando una marcata riduzione della fosforilazione dei suoi substrati: S6K1 (Chung et al., 1992), S6K2 (Lee-Fruman et al., 1999), 4EBP1 (Gingras et al., 1998) e PRAS40 (Chung et al., 1992; Lee-Fruman et al., 1999; Gingras et al., 1998; Oshiro et al., 2007). La rapamicina non è in grado di inibire la funzionalità di mTORC2, anche se è stato osservato un effetto che dipende dal tipo cellulare, probabilmente per un'indiretta interferenza di mTORC1 (Sarbasov et al., 2006).

TORC2: È stato dimostrato che questo complesso fosforila direttamente

Akt/PKB sul suo dominio carbossi-terminale (Sarbasov et al., 2005). TORC2 non è direttamente inibito dalla rapamicina, tuttavia, in alcuni tipi cellulari, è stato dimostrato che un trattamento prolungato con il farmaco può inibire indirettamente la formazione e l'attività del complesso TORC2 (Sarbasov et al., 2006).

E' stato dimostrato che mTOR è fosforilato in maniera specifica: in TORC1 mTOR è fosforilato sulla Ser2448, mentre in TORC2 sulla Ser2481 (Copp et al., 2009). Copp e colleghi (2009) hanno proposto che questa specifica fosforilazione può essere usata come *biomarker* per la sensibilità di TORC2 alla rapamicina. L'importanza funzionale di questa fosforilazione è tuttavia sconosciuta.

La funzione principale descritta di TORC2 è la regolazione dell'actina citoscheletrica. Il *knockdown* di specifici componenti del complesso di TORC2 *in vitro* causa l'alterazione dell'actina citoscheletrica (Jacinto et al., 2004). TORC2 svolge la sua azione di regolazione dell'actina attraverso Rho e la fosfochinasi C (PKC) (Sarbasov et al., 2004). La deregolazione dell'attività di TORC2 causa l'alterazione della motilità cellulare anche in alcuni tipi di cellule tumorali, controllando quindi il processo metastatico tumorale (Dada et al., 2008).

## **TEORIA METASTATICA BENIGNA NELLA LAM E NELLA TSC**

E' stato ipotizzato che la LAM possa essere il risultato di un processo metastatico in cui un precursore cellulare sia in grado di migrare al polmone e invadere il parenchima (Henske, 2003). Le cellule LAM sono in grado di migrare *in vitro* e sono state identificate nei fluidi corporei, come il sangue e le urine, indicando che le cellule LAM sono in grado di staccarsi dal tumore primario ed entrare nel circolo (Goncharova et al., 2006; Crooks et al., 2004). In supporto a questa ipotesi è stato osservato che la LAM si ripresenta dopo il trapianto di polmone e che la stessa mutazione sul gene *TSC2* presente nelle cellule del polmone si trova anche nelle cellule dei linfonodi dello stesso individuo (Bittmann et al., 2003; Karbowniczek et al., 2003). Il fenotipo delle cellule LAM non è né di origine epiteliale né mesenchimale, ma piuttosto una miscela di cellule di origine epitelioide e di tipo muscolare, che suggerisce un *pattern* di differenziamento variabile pur avendo un'origine clonale (Krymskaya et al.,

2008). E' stato supposto che la presenza di tumori di origine mesenchimale nei reni dei pazienti TSC possa indicare che amartina e tuberina siano responsabili della regolazione del differenziamento di un precursore cellulare renale coinvolto nelle patogenesi degli AML TSC (Karbowniczek et al., 2005). Queste osservazioni riguardo alla capacità migratoria delle cellule LAM, al loro potenziale metastatico e all'alterato differenziamento sono in accordo con l'ipotesi che queste cellule potrebbero andare incontro ad *epithelial mesenchymal transition* (EMT).

### ***Epithelial mesenchymal transition (EMT)***

L'EMT è un processo fondamentale durante lo sviluppo dell'organismo e la formazione dei diversi organi e tessuti. La transizione da cellula epiteliale a mesenchimale non è un evento irreversibile, poiché infatti la cellula può subire anche il processo inverso: *mesenchymal-epithelial transition* (MET). Entrambi questi processi sono necessari per il differenziamento finale dei diversi tipi cellulari e per l'acquisizione della struttura tridimensionale degli organi interni durante l'embriogenesi. Durante il processo di EMT le cellule acquisiscono capacità migratorie e di invasività; l'EMT è coinvolto anche durante la riparazione dei tessuti e la progressione della metastasi tumorale. Nello stato mesenchimale la cellula possiede capacità migratorie e caratteristiche di staminalità, essendo in grado di staccarsi dal tumore primario e di migrare nel circolo sanguigno e/o linfatico per raggiungere il sito di metastasi dove può differenziarsi in diversi tipi cellulari.

La LAM e gli AMLs sono stati definiti come tumori mesenchimali costituiti da cellule epiteliodi perivascolari distinte a livello istologico e immunoistochimico (Folpe et al., 2002). Questi tumori sono caratterizzati istologicamente dal loro aspetto epitelioide e dalla presenza di vasi sanguigni (Folpe et al., 2002); l'immunofenotipo include cellule positive ai marcatori di melanociti (es. gp100) e ai marcatori di cellule muscolari lisce (es.  $\alpha$ -actina), ma non sono presenti cellule che esprimono antigeni epiteliali.

E-caderina è una proteina presente sulla superficie cellulare nelle giunzioni di aderenza cellula-cellula. La perdita dell'espressione di E-caderina è considerato un evento fondamentale nell'EMT. Questa proteina può essere repressa a livello

trascrizionale e post-trascrizionale. Tra i fattori di trascrizione che reprimono l'attività del promotore di E-caderina c'è SNAIL (Thiery et al., 2009). Oltre alla sua funzione inibitoria su E-caderina, SNAIL è considerato un induttore dell'EMT, infatti elevati livelli di SNAIL sono stati associati a una forma aggressiva di cancro alla mammella (Evdokinova et al., 2009). Nelle cellule TSC2<sup>-/-</sup>, isolate da ratti Eker, la localizzazione di E-caderina nella membrana è controllata dalla via Akt/TORC1, sensibile alla rapamicina (Barnes et al., 2010). Inoltre, la perdita di tuberina causa una riduzione significativa dell'espressione di E-caderina nella membrana plasmatica e una ridotta adesione cellulare.

### ***Le metalloproteasi (MMPs)***

Studi recenti hanno dimostrato che le MMPs sono promotori e mediatori dello sviluppo e dei processi patogenici dell' EMT in diversi tipi di tumore (Orlichenko et al., 2009).

Le famiglia delle metalloproteasi consiste in un gruppo di almeno 23 endopeptidasi zinco-dipendenti classificate in base alla natura dei più importanti gruppi funzionali nel loro sito attivo. Le MMPs sono un gruppo di enzimi proteolitici, il cui meccanismo catalitico comporta la presenza di un metallo in grado di degradare componenti della matrice extracellulare (ECM) (Orlichenko et al., 2009).

La disgregazione della matrice extracellulare è un passaggio fondamentale nel processo dell'invasione e della metastatizzazione. Le MMPs sono implicate nella maggior parte della malattie croniche polmonari come nella crescita tumorale e metastatica (Chakrabarti et al., 2005; Folgueras et al., 2004).

La MMP di tipo II (MMP-2), che ha peso molecolare 72 KDa, nota anche con il nome di gelatinasi A, riveste un ruolo importante nell'invasione tumorale facilitando la degradazione della matrice, incrementando la bio-disponibilità dei fattori di crescita matrice associati. Elevati livelli di MMP-2 sono stati riportati in molti tumori come il tumore al colon e allo stomaco e i livelli dell'enzima sono strettamente correlati al processo di angiogenesi, infatti sono considerati potenziali *target* nelle terapie anti-tumorali (Wojtowicz-Praga et al., 1997). Il controllo della sintesi e dell'attività della MMP-2 avviene a diversi livelli, che includono l'attivazione trascrizionale, il processo post-trascrizionale e la

regolazione dell'attività proteolitica da parte delle metalloproteasi di membrana (MT-MMPs) e degli inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMPs) (Wojtowicz-Praga et al., 1997). La MMP-2 è secreta come forma inattiva ed è attivata a livello extracellulare mediante un taglio proteolitico. Questo processo coinvolge le metalloproteasi di membrana di tipo I che si legano alla MMP-2 sulla membrane cellulare in un complesso multimerico con i TIMP-2 (Wojtowicz-Praga et al., 1997). Hayashi et al. hanno dimostrato mediante immunostochimica l'espressione della MMP-1, MMP-2 e MMP-9 nelle cellule LAM (Hayashi et al., 1997). La distruzione cistica del parenchima polmonare nella LAM può essere attribuita ad uno sbilanciamento dei livelli di MMPs e TIMPs (Hayashi et al., 1997). Un'ulteriore conferma del ruolo della MMP-2 nella LAM è stato fornito dal gruppo di Lee et al. che ha evidenziato un'elevata secrezione di MMP-2 da un angiomiolipoma di una paziente affetta da LAM (Lee et al., 2010).

Inoltre, l'espressione delle metalloproteasi, in particolar modo della MMP-2, è aumentata nei noduli di pazienti affette da LAM e i livelli della MMP-2 sono stati identificati cruciali per il processo di angiogenesi e usati come target per le terapie anti-tumorali (Wojtowicz-Praga et al., 1997).

La Matrilisina (MMP-7), è frequentemente espressa nei tessuti tumorali e risulta essere importante per la crescita invasiva delle cellule tumorali (Stetler-Stevenson et al., 1993).

Questa piccola metalloproteasi ha solo due domini strutturali, il dominio N-terminale e il dominio catalico, mentre non presenta il dominio C terminale a differenza di tutte le altre MMPs (Quantin et al., 1989).

La  $\beta$ -catenina regola l'espressione della MMP-7. Nelle cellule LAM tuberina deficienti la  $\beta$ -catenina induce l'espressione della MMP-7 che conferisce a queste cellule un fenotipo invasivo (Barnes et al., 2009).

Diversi studi hanno dimostrato che l'Rna messaggero della MMP-7 è espresso in diversi tipi di tumori come il tumore del colon e dello stomaco. L'aumento dei livelli di espressione della MMP-7 è stato osservato nelle fasi iniziali della carcinogenesi del colon-retto; inoltre il diametro dell'intestino è notevolmente ridotto in topi MMP-7 deficienti suggerendo che la MMP-7 contribuisce alla crescita tumorale e al processo di metastatizzazione e può essere utilizzata come un target di chemoprevenzione (Kawabata et al., 2006).

## ***Citochine ed interleuchine***

Le cellule metastatiche migrano verso specifici siti distanti dal tumore primario attratte da fattori solubili prodotti dal tessuto target specifico che si legano alla superficie delle cellule circolanti. Il reclutamento al sito metastatico dipende anche dal fenotipo cellulare, che comprende il distacco dalla cellula adiacente e dalla matrice, l'entrata e la sopravvivenza all'interno del sistema sanguigno o linfatico e la replicazione nel sito di metastasi. Tra i fattori regolati dalla metastasi dei tumori ci sono le citochine ed i loro recettori.

L'acquisizione delle caratteristiche mesenchimali per le cellule tumorali è un evento transiente che può essere considerato molto importante per la migrazione e l'invasività tissutale (O' Hayre et al., 2008). Il rilascio di citochine pro infiammatorie è solitamente coinvolto in questi meccanismi (Rolling et al., 1997).

## ***Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)***

MCP-1 appartiene alla famiglia delle chemochine ed è noto per la sua capacità di indurre la migrazione direzionale dei macrofagi, delle cellule T e delle cellule NK. L' mRNA messaggero di MCP-1 è espresso solitamente durante i primi stadi del melanoma e nelle lesioni metastatiche e la concentrazione di MCP-1 nelle urine è stata vista correlare con lo stato di malignità tumorale (Valkovic et al., 1998). MCP-1 e il suo recettore CCR2 sono espressi in molte cellule compresi i fibroblasti della pelle e sono up-regolate in molti processi patologici (Yamamoto et al., 2003). MCP-1 può stimolare l'angiogenesi direttamente e indirettamente attraverso il reclutamento di monociti (Yoshida et al., 2003).

Similmente, l'overespressione di MCP-1 nei tumori della pelle TSC, può stimolare l'angiogenesi e la fibrosi. L'assenza di tuberina, come per le cellule LAM, porta alla produzione di MCP-1 che agisce a livello della motilità cellulare incrementandola (Pacheco-Rodriguez et al., 2010).

## ***Interleuchine***

La produzione di interleuchina-6 (IL-6) e interleuchina-8 (IL-8) è regolata dalla *pathway* della PI3K e delle MAPK, vie di trasduzione del segnale coinvolte in cascate regolatrici della funzionalità nelle cellule LAM/TSC.

L' IL-6 è una citochina coinvolta oltre che nella risposta infiammatoria, nella regolazione dei processi metabolici, rigenerativi e neuronali.

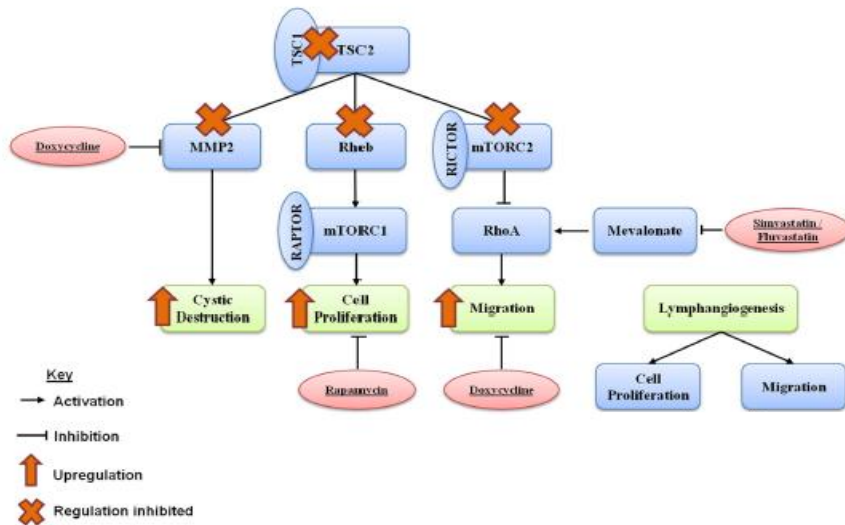
L' IL-6 stimola i target cellulari attraverso un legame oltre che con il suo recettore che si associa al recettore della proteina gp130. Gp130 dimerizza portando all'attivazione delle chinasi Janus e alla conseguente fosforilazione dei residui tirosinici all'interno della porzione citoplasmatica della gp130, attivando conseguentemente la *pathway* delle MAPK chinasi (Taga and Kishimoto.,1997)

L' IL-8 gioca un ruolo essenziale nella crescita tumorale, nell'angiogenesi e nella metastasi ed è responsabile del reclutamento delle cellule del sistema immunitario al sito di infiammazione o infezione. L'IL-8 promuove l'attivazione di PI3K promuovendo l'attivazione di Akt, PKC e la cascata delle MAPK che controlla l'attività di un largo numero di fattori trascrizionali.

L'aumentata espressione dell' IL-8 o dei suoi recettori è stata osservata nelle cellule tumorali, nelle cellule endoteliali, nei neutrofili e nei macrofagi tumore-associati suggerendo che l' IL-8 può agire come fattore di regolazione nello sviluppo tumorale (Bendre et al.,2005).



## APPROCCI TERAPEUTICI PER LA LAM E LA TSC



Black JL, Yin Ng H, Moir LM. Therapeutic strategies in lymphangioleiomyomatosis (LAM). *Respir Investig.* 2014 Jan;52(1):3-4. doi: 10.1016/j.resinv.2013.11.002. Epub 2013 Dec 9.

Fig. 1. Pathway degli effetti della LAM e dei siti potenziali di intervento terapeutico.

### **La rapamicina (Sirolimus)**

La rapamicina è un farmaco immunosoppressore che controlla la proliferazione e la crescita cellulare (Fig. 1). La rapamicina e il suo derivato l'everolimus, esplicano la loro azione inibendo l'attività di mTOR. Mimando l'azione del complesso amartina-tuberina, la rapamicina (sirolimus) e i suoi derivati sono stati considerati i farmaci di elezione per patologie nelle quali le mutazioni dei geni *TSC1* e *TSC2* conducono ad un'iperattivazione di mTOR. I trials clinici che si sono ad oggi conclusi e che sono in atto, indicano che il trattamento con il sirolimus è in grado di stabilizzare le funzioni polmonari e ridurre le dimensioni degli angiomiolipomi nelle pazienti LAM e TSC (Bissler et al., 2008; McCormack et al., 2011). In trials di fase 1 e 2 con sirolimus, in pazienti affetti da TSC e LAM sporadica, i volumi degli angiomiolipomi diminuivano di circa il 50% dopo 12 mesi di trattamento. Tuttavia, le dimensioni dei tumori aumentavano non appena il trattamento con il sirolimus veniva interrotto (Bissler et al., 2008).

Recentemente la FDA (Food and Drug Administration) ha approvato Everolimus, inibitore di mTOR, come farmaco per la cura della TSC.

Studi effettuati nel nostro laboratorio in cellule TSC2<sup>-/-</sup> e TSC2<sup>-/meth</sup> isolate da pazienti affetti da TSC mostrano che la proliferazione viene controllata e ridotta dalla rapamicina, ma senza arrivare ad una completa morte cellulare (Lesma et al., 2005, 2009). I nostri risultati indicano, quindi, un effetto citostatico della rapamicina che sembra essere in accordo con quanto osservato nei pazienti in seguito alla sospensione del farmaco.

### ***L'anti-EGFR Ab (Cetuximab)***

Lo studio di nuove terapie per i tumori ha, negli ultimi anni, indicato il recettore per l'EGF come potenziale target farmacologico (Rocha-Lima et al., 2007). Infatti, l'attivazione di questo recettore promuove la crescita e la proliferazione cellulare, l'angiogenesi, l'invasività e la capacità di metastatizzare delle cellule tumorali (Rocha-Lima et al., 2007). Sono state proposte diverse strategie per l'impiego di anticorpi anti-EGFR e tra queste anche l'utilizzo di anticorpi che inibendo l'attività tirosin-chinasica intrinseca del recettore bloccano la trasduzione del segnale (Baselga et al., 2001). Gli inibitori tirosin chinasici del recettore dell'EGF, come ad esempio il Gefitinib, sono utilizzati nel trattamento del tumore del tumore al polmone (Gemmil et al., 2005).

IL Cetuximab è un anticorpo monoclonale in grado di legare con alta affinità il recettore dell'EGF e di inibire l'attivazione del recettore da parte dell'EGF (Rocha-Lima et al., 2007). Il legame porta all'internalizzazione del recettore e alla sua degradazione. Il cetuximab al momento è utilizzato in associazione ad altri farmaci antitumorali nelle terapie dei tumori testa-collo e nei tumori del colon-retto (Luedke et al., 2012). Il cetuximab è, inoltre, in fase sperimentale anche il altri tipi di tumore come il tumore polmonare a piccole cellule e il tumore della mammella (Ray et al., 2009; Carey et al., 2012).

Le cellule LAM/TSC, come le cellule TSC2<sup>-/-</sup> e TSC2<sup>-/meth</sup>, pur essendo cellule muscolari lisce, necessitano dell'EGF per proliferare in coltura (Lesma et al., 2008; Lesma et al., in press). Tale fattore di crescita non è sostituibile con altri fattori, quali l'*insulin growth factor* (IGF) e l'impiego di anticorpi contro questo recettore portano a morte cellulare in circa 12 giorni (Lesma et al., 2005, 2009).

## **La doxiciclina**

La distruzione del parenchima polmonare è stata attribuita ad un ambiente che viene a crearsi anche a seguito dell'aumento dell'espressione delle MMPs. La MMP-2, in particolar modo è upregolata nei tessuti polmonari di pazienti affette da LAM (Matsui et al., 2000).

La doxiciclina, così come altre tetracicline, è dotata di attività prevalentemente batteriostatica. Il farmaco esercita il suo effetto antimicrobico tramite inibizione della sintesi proteica. La molecola inibisce il trasporto degli aminoacidi dall'aminoacil-t-RNA ai ribosomi impedendo il legame con la subunità 30S. Viene così impedita la formazione della catena peptidica e, pertanto, la sintesi delle proteine. Le MMPs sono elevate nelle urine e nei noduli polmonari di pazienti affette da LAM e proprio per questo la doxiciclina, agente antiangiogenico e inibitore delle MMPs, attualmente è oggetto di studio nella LAM (Glasgow et al., 2010). La doxiciclina inibisce la sintesi e l'attività delle MMPs ed è, al momento attuale, l'unico inibitore di MMPs utilizzato in clinica. Trials clinici hanno dimostrato che il trattamento farmacologico con la doxiciclina in pazienti affette da LAM determina una riduzione dei livelli di MMP-2 e MMP-9 nelle urine, un miglioramento dei sintomi della LAM (aumentata capacità polmonare) ed un miglioramento della qualità di vita delle pazienti (Pimenta et al., 2013). *In vitro*, la doxiciclina non è risultata utile nel ridurre i livelli delle MMPs in cellule ELT3<sup>-/-</sup> derivate da un modello animale di LAM (Chang et al., 2010).

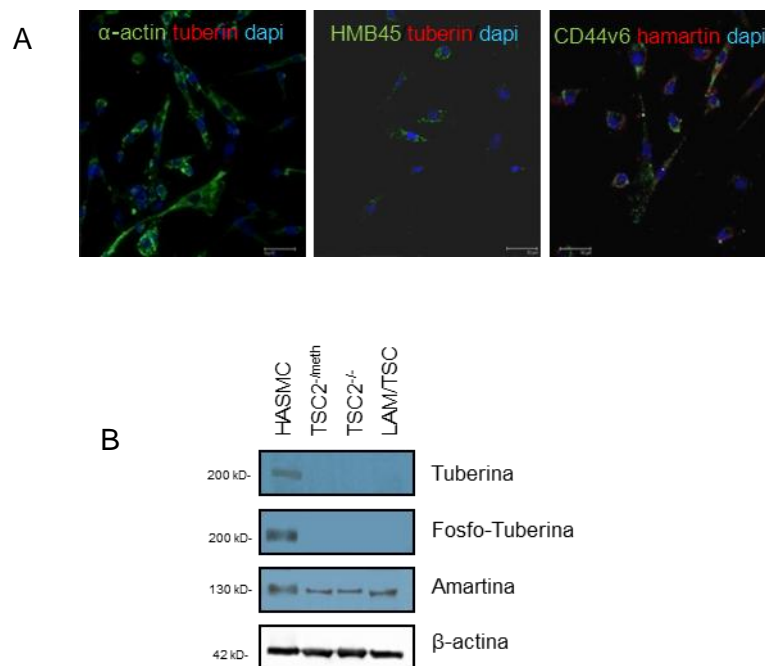
## **Le statine**

Le statine sono farmaci che inibiscono la sintesi del colesterolo endogeno agendo sull'enzima idrossimetilglutaril-CoA reduttasi, che converte la molecola del 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA in acido mevalonico, un precursore del colesterolo. Gli effetti delle statine sono mediati dal blocco del mevalonato che porta alla riduzione della sintesi del colesterolo (Bulhal et al., 2007). Le statine hanno anche attività antinfiammatoria e antineoplastica, molto probabilmente perché agiscono sulla *pathway* del mevalonato controllandone la produzione (Chan et al., 2003). L'aggiunta dell'atorvastatina al terreno di coltura di cellule tuberina-deficienti diminuisce i livelli di RhoA attivata, blocca la isoprenilazione

di Rheb e la fosforilazione di mTOR-S6K-S6 agendo sulla crescita di queste cellule (Finlay et al., 2007). È stato inoltre riportato che statine, come la simvastatina da sola o in combinazione con la rapamicina inibiscono la proliferazione delle cellule tuberina-deficienti e la crescita tumorale (Goncharowa et al., 2011). Tuttavia, il trattamento con l'atorvastatina, non risulta efficace nel ridurre la dimensione dei tumori, il numero di emangiomi del fegato e il numero dei tumori sottocutanei in topi TSC sia se utilizzata da sola che in associazione alla rapamicina (Finlay et al., 2009). Studi recenti hanno dimostrato che la rosuvastatina può agire come agente rimodellante della cromatina, inducendo l'espressione della tuberina nelle cellule TSC2<sup>-meth</sup> ASM. Questo effetto sarebbe alla base della capacità della rosuvastatina di inibire la proliferazione delle cellule TSC2<sup>-meth</sup> e verrebbe potenziato dalla contemporanea incubazione con rapamicina (Lesma et al., 2013). Queste evidenze suggeriscono un meccanismo specifico e nuovo delle statine nella LAM e nella TSC.

# BACKGROUND

Nel nostro laboratorio sono state isolate cellule dal versamento chiloso (o chilo torace) di una paziente affetta da LAM/TSC. Il chilo torace è una complicanza frequente nella LAM ed è dovuto ad un versamento linfatico nella cavità pleurica. Dal chilo torace è stata ottenuta una popolazione cellulare omogenea. Queste cellule sono muscolari lisce, infatti, esprimono la proteina  $\alpha$ -actina (Fig. 1A). Le cellule isolate dal chilo torace sono positive ai marcatori specifici per le cellule LAM e TSC, CD44v6 (Pacheco-Rodriguez et al., 2007) e HMB45 (El-Hashimete et al., 2005) rispettivamente (Fig. 1A). In questa popolazione cellulare l'assenza di immunoreattività per cheratina 8/18 e S100 ha permesso di escludere la presenza di cellule di tipo epiteliale e adipociti. Le cellule isolate dal chilo torace, come le cellule  $TSC2^{-/-}$  e  $TSC2^{-/meth}$  isolate precedentemente in laboratorio (Lesma et al., 2005, 2009), esprimono amartina, ma non tuberina (Fig. 1A e B) (Lesma et al., in press).



**Fig 1. (A) Caratterizzazione tramite immunofluorescenza delle cellule LAM/TSC (B) valutazione dell'espressione di amartina, tuberina e della sua forma fosforilata nelle cellule LAM/TSC, nelle cellule  $TSC2^{-/-}$  e  $TSC2^{-/meth}$  tramite western blotting.**

Come le cellule  $TSC2^{-/-}$  e  $TSC2^{-/meth}$ , anche le cellule isolate dal chilotorace dipendono dall'EGF per crescere. L'anticorpo anti-EGFR inibisce la proliferazione fino a causarne la morte cellulare (Fig. 2A). La rapamicina ha solo effetto citostatico sia quando è aggiunta al terreno al momento del piastramento con le cellule in fase di sospensione, sia tre ore dopo il piastramento quando le cellule sono adese alla petri (Fig. 2B).

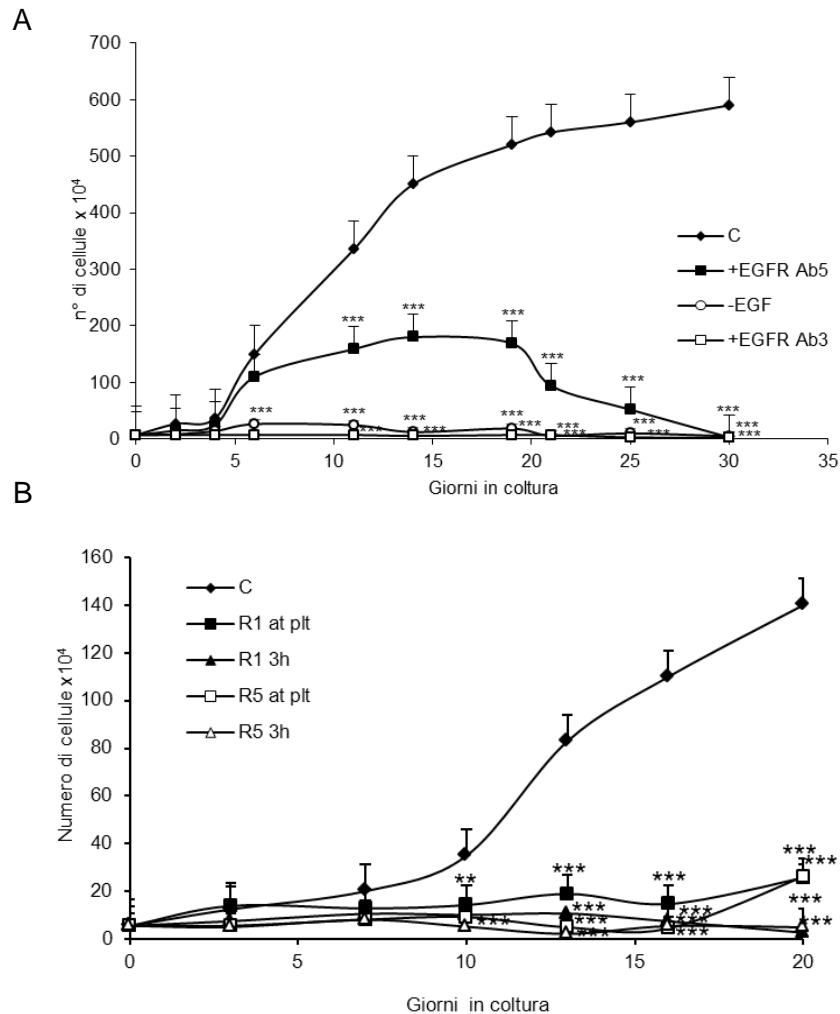


Fig 2. Valutazione della proliferazione delle cellule LAM/TSC. (A) Le cellule sono state incubate con anti-EGFR 5 (EGFR Ab5, 5 $\mu$ g/ml), anti-EGFR 3 (EGFR Ab3, 5 $\mu$ g/ml). La proliferazione, è stata valutata in assenza di EGF (10ng/ml) (B). Le cellule sono state incubate con rapamicina (R1, 1ng/ml e R5, 5 ng/ml) al piastramento (at plt) o 3 ore dopo il piastramento.

Le cellule LAM/TSC passano da uno stato di adesione ad uno stato di sospensione ciclicamente (Fig. 3A) diversamente dalle cellule  $TSC2^{-/-}$  e  $TSC2^{-/meth}$  che crescono solamente adese alla petri.

Circa l'80% delle cellule LAM/TSC in fase di sospensione è vitale (Fig. 3B). In seguito all'incubazione con la 5-azacitidina e la conseguente espressione di tuberina la percentuale delle cellule che si stacca dalla petri aumenta (17% verso 10% delle cellule controllo) (Fig. 3C).

Le cellule LAM/TSC, inoltre, formano colonie quando messe in coltura in soft agar, a differenza delle cellule HASMCs, indicando che sono in grado di sopravvivere e crescere in fase di sospensione (Fig. 4). Questi dati suggeriscono che le cellule LAM/TSC perdono l'inibizione da contatto e acquistano la capacità di sopravvivere in maniera indipendente dall'ancoraggio.

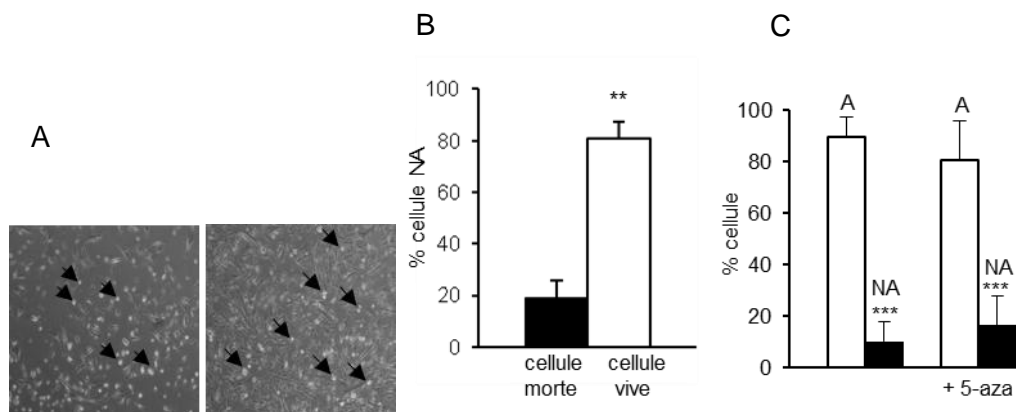
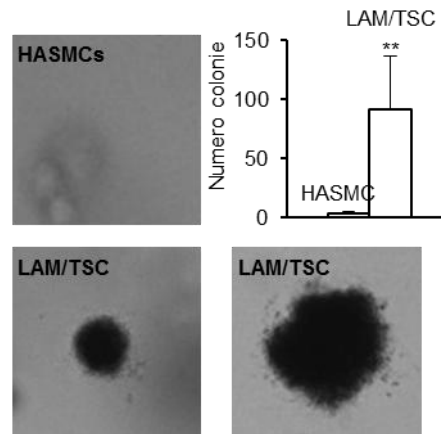


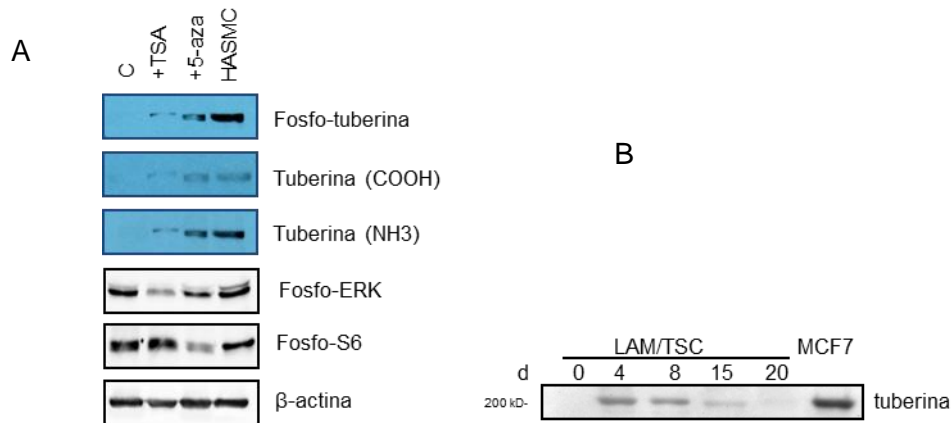
Fig 3. (A) le cellule LAM/TSC si staccano dalla petri (frecce) in condizioni di subconfluenza e confluenza (rispettivamente immagine di sinistra e di destra). (B) E' stata valutata la vitalità delle cellule LAM/TSC nello stato di sospensione (NA) e di adesione (A) con Trypan blue. Test t-Student  $**p < 0,01$  vs cellule LAM/TSC morte (C) L'espressione di tuberina influenza solo in parte la capacità delle cellule LAM/TSC di vivere in fase di sospensione. Test t-Student  $***p < 0,001$  vs cellule LAM/TSC in fase di adesione.





*Fig 4. Formazione di colonie di cellule LAM/TSC e HASMCs in soft agar (test di sopravvivenza in assenza di ancoraggio). Il grafico indica il numero delle colonie delle cellule LAM/TSC e delle cellule HASMCs. Test t-Student \*\* $p < 0,01$  vs HASMCs*

Le cellule LAM/TSC presentano una mutazione sull'esone 21 del gene *TSC2* (R750X- 2251) con sostituzione C>T che codifica per un codone di "stop" (Lesma et al., in press). Questa popolazione cellulare non esprime tuberina per la presenza di un secondo "hit" causato da un evento epigenetico come avviene nelle cellule *TSC2*<sup>-/meth</sup>. Infatti, l'incubazione con i rimodellanti della cromatina, tricostatina, inibitore delle deacetilasi, e 5-azacitidina, inibitore della DNA metiltransferasi, attiva la trascrizione genica e la conseguente espressione di tuberina. L'espressione di tuberina, in seguito al trattamento con i rimodellanti della cromatina è correlata ad una diminuzione della fosforilazione di S6 e di ERK che si mantiene fino a circa 15 giorni in seguito alla sospensione del trattamento (Fig 5).



*Fig 5. (A) valutazione dell'espressione di tuberina nelle cellule LAM/TSC a seguito del trattamento con la tricostatina (3,3  $\mu$ M per 72h) e con la 5-azacitidina (1 $\mu$ M per 96h). (B) Valutazione della durata dell'effetto della 5-azacitidina nell'espressione di tuberina.*

Le cellule LAM/TSC hanno uno stesso pattern di metilazione delle isole CpG all'interno del promotore del gene *TSC2* (studiato tramite pyrosequencing) che non giustifica la mancata espressione di tuberina a differenza di quanto osservato nelle cellule *TSC2*<sup>-meth</sup> (Fig. 6A) (Lesma et al., 2009). La componente di eterocromatina (H3TrimK9) è elevata nelle cellule LAM/TSC e diminuisce in seguito al trattamento con la 5-azacitidina. Al contrario della eucromatina (H3TrimK4 e H3Ac) che è diminuita nelle cellule LAM/TSC e aumentata in seguito al trattamento con la 5-azacitidina (Fig. 6B).

Questi dati confermano che l'espressione di tuberina correla con lo stato di eterocromatina, questo implica la presenza di un evento epigenetico nella regolazione del gene *TSC2*.

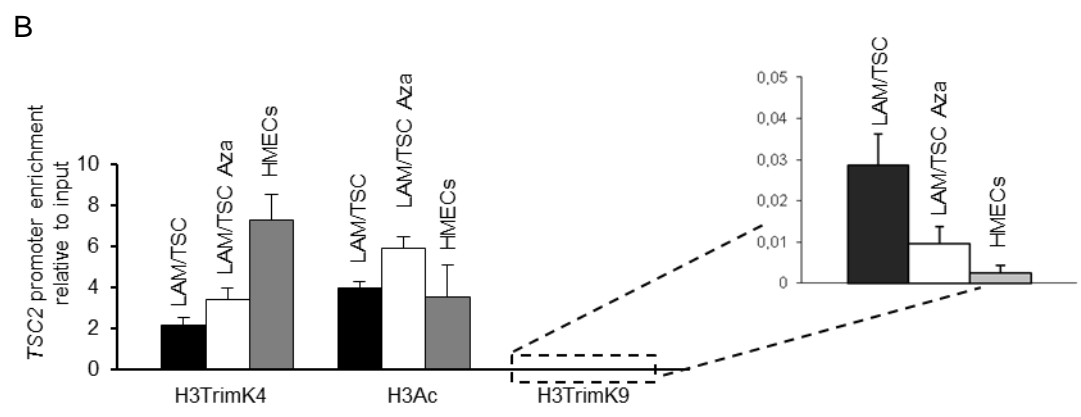
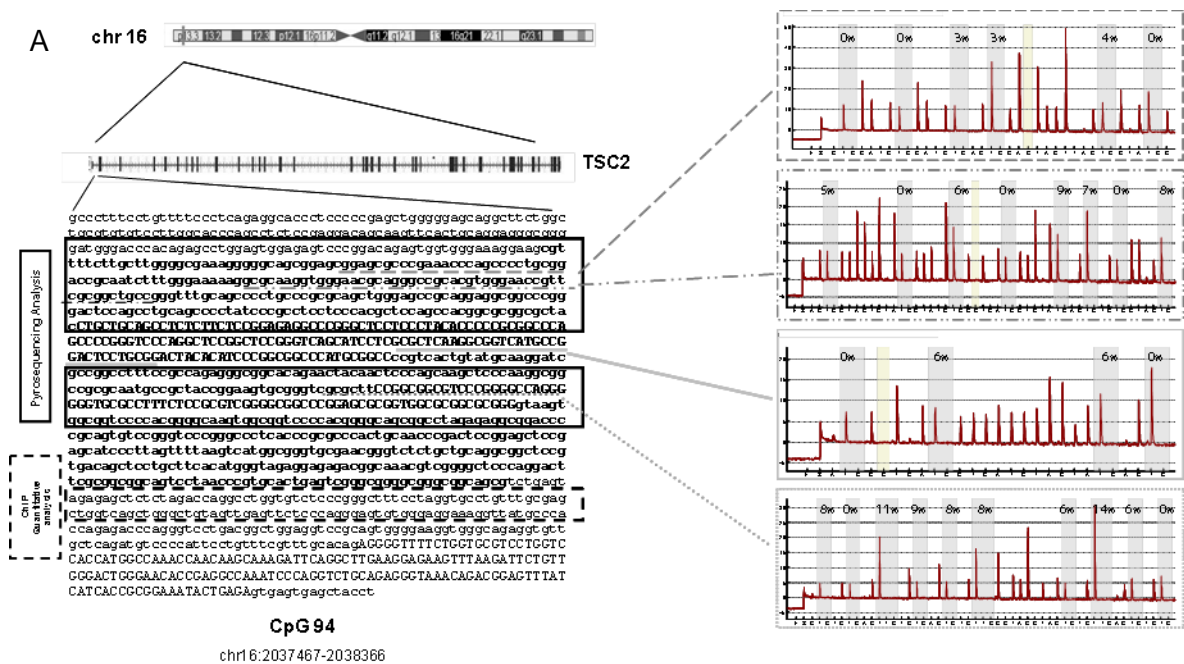


Fig 6. (A) Metilazione delle isole CpG del promotore di TSC2 con la tecnica del pyrosequencing. (B) Stato della cromatina del promotore del gene TSC2 (mediante saggi di Chip) per valutare la cromatina chiusa (H3TrimK9) e aperta (H3TrimK4 e H3Ac) in seguito all'incubazione con la 5-azacitidina.

# MATERIALI E METODI

## **MANTENIMENTO DELLE CELLULE**

Le cellule LAM/TSC crescono adese alle petri. Il terreno, *Type II complete medium*, è stato cambiato ogni due o tre giorni. Il terreno utilizzato per le cellule muscolari lisce HSMC (*Human Smooth Muscle Cells*), per le MCF7 (*Michigan Cancer Foundation – 7*) e per le COS7, (*African Green Monkey SV40-transf'd kidney fibroblast cell line*), è il Dulbecco's Modified Eagle Medium. Quando è stata raggiunta la confluenza le cellule sono state lavate in PBS 1X, incubate con tripsina-EDTA 0,05% (Sigma) e staccate manualmente dalla petri spipettandole più volte nel terreno di coltura. Le cellule sono state piastrate ottenendo generalmente due nuove petri a confluenza. Il giorno seguente al passaggio di tripsinizzazione il terreno è stato aspirato e cambiato.

### **Soluzioni:**

#### **Type II complete medium:**

- DMEM (Euroclone)/Ham F-12 (Euroclone)
- $2 \times 10^{-7}$  M idrocortisone (Sigma)
- $1,6 \times 10^{-6}$  M  $\text{FeSO}_4$  (Sigma)
- 10  $\mu\text{M}$  EGF (Sigma)
- 15% FBS (Euroclone)
- 1% streptomina/penicillina (Euroclone)
- 0,5% glutammina 200mM (Euroclone)

#### **DMEM:**

- 10% FBS (Euroclone)
- 2% streptomina/penicillina (Euroclone)
- 1% glutammina 200mM (Euroclone)

#### **PBS 1X:**

- 137 mM NaCl (Sigma)
- 2,7 mM KCl (Sigma)
- 1,47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma)
- 8,1 mM  $\text{NaHPO}_4$  (Sigma)

## **CONSERVAZIONE DELLE CELLULE**

Le cellule, una volta staccate meccanicamente dalla piastra, sono state raccolte in una nuova provetta sterile e centrifugate a 4°C a 1200 rpm per 5'. Il surnatante è stato eliminato e il pellet risospeso in 1 ml di terreno di congelamento. Le cellule sono state congelate a -80°C e successivamente trasferite in azoto liquido e nella fase di scongelamento, le cellule sono state scongelate velocemente a 37°C, risospese, centrifugate e piastrate in Type II complete medium. Il congelamento-scongelamento ha permesso di effettuare esperimenti comparabili in tempi successivi.

### **Soluzioni:**

Terreno di congelamento:

- Type II complete medium
- 20% FBS
- 10% DMSO (Sigma)

## **CONTA DELLE CELLULE MEDIANTE CAMERA DI NEUBAUER**

Le cellule LAM/TSC sono state coltivate per 48 ore in presenza dell'anticorpo diretto contro il recettore dell'EGF (5 µg/ml, clone 225; Calbiochem, Darmstadt, Germany) o in presenza di rapamicina (5ng/ml).

La 5-Azacidina è stata incubata 96 ore alla concentrazione di 1 µM.

Dopo aver staccato le cellule dalla petri, una piccola aliquota della sospensione cellulare (10µl) è stata caricata nella camera di Neubauer. La conta è stata eseguita sulla media ottenuta dal conteggio relativo ai quattro campi che compongono la camera stessa.

## **TRATTAMENTO DELLE CELLULE**

Come indicato in ciascun esperimento le cellule LAM/TSC sono state incubate con 5-azacidina (Sigma-Aldrich) per 96 ore alle concentrazioni di 1 µM, con rapamicina (Wyeth) per 24 o 48 ore alle concentrazioni di 1 e 5 ng/ml, con anticorpo anti- EGFR (Calbiochem) per 24 o 48 ore alle concentrazioni di 1 e 5 µg/ml, con metilprednisolone (Sigma-Aldrich) e repertaxin (Sigma-Aldrich) overnight, rispettivamente alle concentrazioni di 10nM e 1nM e con PF-537228(PF228) (Sigma-Aldrich) per 8 ore alle concentrazioni di 1 µM e 10 µM.

## **RACCOLTA DELLE CELLULE**

Le cellule sono state lavate in PBS 1X e staccate meccanicamente con l'aggiunta di lysis buffer per permettere la lisi delle membrane plasmatiche. I campioni sono stati sottoposti a 3 cicli di congelamento e scongelamento rapido in azoto liquido o ghiaccio secco e bolliti per 10' a 100°C.

### **Soluzioni:**

Lysis buffer:

- 5 mM EDTA (Sigma)
- 3% SDS (Sigma)
- 0,1 M CH<sub>3</sub>COONa (Sigma)
- 0,4mM PMSF (Sigma)
- 1mM Sodio azide (NaN<sub>3</sub>) (BDH)
- 1mM Benzamidina (Sigma)
- 10µg/ml Aprotinina (Sigma)
- 5µg/ml Leupeptina (Sigma)

## **ELETTROFORESI SU GEL DI SDS PAGE**

Ogni campione è stato incubato con acido tricloroacetico (TCA) (Sigma) al 20%, per facilitare la precipitazione delle proteine, e centrifugato a 14000 rpm per 20'. Sono stati caricati 15 µg di campione in ogni pozzetto. Il pellet, costituito dalle proteine totali di ogni gruppo sperimentale, è stato risospeso in Laemmli Sample Buffer e trattato con TRIS-HCl per tamponare il pH acido dovuto al trattamento con TCA. I campioni sono stati processati elettroforeticamente tramite SDS-PAGE. È stata utilizzata come standard una miscela di proteine con un peso molecolare compreso fra 10 KD e 250 KDa (BioRad).

## **WESTERN BLOTTING**

Dopo essere state separate tramite elettroforesi, le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (Amersham). Prima del trasferimento, il gel e la membrana sono stati equilibrati in transfer buffer. Il trasferimento è

avvenuto per 2 ore e 30 minuti a 30V. Per verificare l'avvenuto trasferimento la membrana di nitrocellulosa è stata colorata con Ponceau's (1%) ed il gel è stato colorato con la *staining solution* e decolorato con la *destaining solution* in costante agitazione. La membrana è stata incubata per 2-3 ore con latte in polvere (Merck) al 5% in T-TBS 1X. In seguito a due lavaggi da 10' ciascuno in T-TBS la membrana è stata messa incubata con l'anticorpo primario specifico per le proteine d'interesse *overnight*.

Gli anticorpi utilizzati sono:

- anticorpo policlonale di topo IgG per fosfo-S6 (titolo 1:1000) che riconosce la forma fosforilata di S6 a livello della Ser235/236 (Cell Signaling)
- anticorpo policlonale di coniglio IgG per S6 (titolo 1:1000) che riconosce la proteina ribosomiale S6 (Cell Signaling)
- anticorpo policlonale di coniglio IgG per fosfo-tuberina (titolo 1:1000) che riconosce la forma fosforilata della tuberina umana a livello della Thr1462 (Santa Cruz)
- anticorpo policlonale di coniglio IgG per tuberina (titolo 1:1000) che riconosce la sequenza N-terminale (N-19) della tuberina umana (Cell Signaling)
- anticorpo policlonale di coniglio IgG per tuberina (titolo 1:500) che riconosce la sequenza carbossi-terminale della tuberina umana a livello degli amminoacidi 1535-1784 (Santa Cruz)
- anticorpo monoclonale IgG di coniglio per fosfo-Erk (titolo 1:1000) che riconosce la forma fosforilata di Erk a livello della Thr202 e della Tyr204 (Cell Signaling)
- anticorpo monoclonale di coniglio IgG per Erk (titolo 1:1000) che riconosce la MAP chinasi p42/44 Erk (Cell Signaling)
- anticorpo monoclonale di topo IgG per  $\beta$ -actina (titolo 1:1000) che riconosce un epitopo localizzato nella sequenza ammino-terminale della  $\beta$ -actina (Sigma)
- anticorpo monoclonale di coniglio IgG per fosfo-Akt (titolo 1:1000) che riconosce la forma fosforilata di Akt a livello della Ser473 (Cell Signaling)
- anticorpo monoclonale IgG per Akt (titolo 1:1000) di coniglio che



riconosce la chinasi Akt (Cell Signaling)

- anticorpo monoclonale di coniglio IgG per E-caderina (titolo 1:1000) che riconosce la glicoproteina E-caderina (Cell Signaling)
- anticorpo monoclonale di coniglio IgG per SNAIL (titolo 1:1000) che riconosce il fattore di trascrizione SNAIL (Cell Signaling)
- anticorpo policlonale di coniglio IgG per ciclina D1 (titolo 1:100) che riconosce un peptide nella regione carbossi-terminale della proteina (Santa Cruz)
- anticorpo policlonale di capra IgG per vimentina (titolo 1:1000) che riconosce un peptide nella regione carbossi-terminale della proteina (Santa Cruz)
- anticorpo policlonale di coniglio IgG CdK4 (titolo 1:100) che riconosce un peptide nella regione carbossi-terminale della proteina (Santa Cruz)
- anticorpo monoclonale di topo per PCNA (titolo 1:1000) che riconosce l'antigene nucleare di proliferazione cellulare (Dako Cytomation)
- anticorpo monoclonale di coniglio per fosfo-mTOR (titolo 1:1000) che riconosce la forma fosforilata di mTOR a livello della Ser 2448 (Cell Signaling)
- anticorpo monoclonale di coniglio per fosfo-mTOR (titolo 1:1000) che riconosce la forma fosforilata di mTOR a livello della Ser 2481 (Cell Signaling)
- anticorpo monoclonale di coniglio per fosfo-FAK (titolo 1:100) che riconosce la forma fosforilata della proteina (Santa Cruz)

La membrana è stata lavata due volte per 10' ciascuno in T- TBS e incubata con l'anticorpo secondario IgG anti-coniglio-HRP (Pierce) o anti-topo (Pierce) (titolo 1:5000 e 1:10000 rispettivamente) per 1h a temperatura ambiente. Sono stati effettuati tre lavaggi in T-TBS e uno in TBS della durata di 10' ciascuno.

Per il riconoscimento del complesso antigene-anticorpo è stato utilizzato il kit Super Signaling Chemiluminescent Substrate (Pierce), che contiene luminolo e soluzione stabile di perossido d'idrogeno: la fluorescenza emessa dal luminolo attivato in corrispondenza delle proteine d'interesse (emissione

luminosa della lunghezza d'onda di 425 nm) viene visualizzata utilizzando il Gel logic 1500 (Kodak).

Ogni membrana è stata riutilizzata più volte dopo essere stata incubata nella soluzione di *Restore* (Pierce) per 7' a temperatura ambiente per eliminare il legame con gli anticorpi in precedenza utilizzati.

### **Soluzioni:**

#### **Running gel 10X:**

- 0,375 M Tris
- 13% acrilamide (Biorad)
- 0,34% bisacrilamide (Biorad)
- 0,1% SDS
- Temed (1:2000) (Biorad)
- 1% ammonio persolfato (AP) (Biorad)

#### **Stacking gel:**

- 0,125M Tris
- 3% acrylamide
- 0,008% bisacrilamide
- 0,1% SDS
- Temed (1:1000)
- 1% AP

#### **Electrode buffer 1X:**

- 1,29 mM glicina (BDH)
- 1% SDS
- 250 mM TRIS

#### **T-TBS:**

- 20mM TRIS base
- 500 mM NaCl
- Tween 20 (0.05%)

#### **Staining Solution**

- Alcool isopropilico (25%)
- Acido acetico (10%)
- Comassie Blue (0.025%)

## **IMMUNOFLUORESCENZA**

Le cellule sono state piastrate su vetrini e dopo qualche giorno dal piastramento il terreno viene aspirato e le cellule lavate con PBS 0,01M e lasciate asciugare a temperatura ambiente. In seguito le cellule sono state permeabilizzate con Cytoskelfix (Cytoskeleton). I vetrini sono stati incubati per 1 ora e 45 minuti a temperatura ambiente con tampone di blocco dei siti aspecifici; sottoposti a tre lavaggi di 5 minuti in PBS 0,01M e quindi incubati per una notte a 4°C in una camera umida con gli anticorpi primari specifici ad una diluizione 1:100 in PBS 0,01M, 1,5% di BSA e Triton 0,1%.

Gli anticorpi utilizzati sono:

- $\alpha$ -actina per le cellule muscolari (Sigma)
- HMB-45 marcatore di cellule TSC2 (Dako)
- Tuberina (C-20) (Santa Cruz)
- Vimentina (Santa Cruz)
- CD44v6 marcatore di cellule LAM (Invitrogen)
- E-caderina (Cell Signaling)

## **ESTRAZIONE RNA**

L'estrazione dell'RNA è stata fatta mediante TRIzol (Invitrogen), una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato in grado di inibire irreversibilmente le ribonucleasi e di lisare le cellule. Le cellule sono state raccolte, pellettate ed è stato aggiunto 1ml di TRIzol per 10 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati messi in ghiaccio e sono stati aggiunti 0,2ml di cloroformio per ogni ml di TRIzol, lasciato a temperatura ambiente per 10 minuti dopo agitazione. Dopo centrifugazione a 12000g per 15 minuti a 4°C, la fase acquosa contenente l'RNA, è stata trasferita in provette da 1,5 ml e sono stati aggiunti 0,5ml di isopropanolo per ogni ml di TRIzol per far precipitare l'RNA.

Dopo 10 minuti i campioni sono stati centrifugati a 12000g per 10 minuti a 4°C.

Il surnatante è stato rimosso e il pellet lavato con 1 ml di etanolo al 75%

Il pellet è stato risospeso e centrifugato a 7500g per 5 minuti a 4°C per rimuovere ogni residuo di etanolo.

Il surnatante è stato rimosso e risospeso in 30 $\mu$ l di acqua RNase free

## **ANALISI QUALITATIVA DELL'RNA TOTALE ESTRATTO**

Per conoscere la concentrazione dell'RNA estratto e verificare l'assenza di contaminanti quali proteine, polisaccaridi o fenolo (introdotto con la purificazione), l'Rna è stato analizzato mediante il *NanoDrop® ND-1000* (Celbio).

Lo strumento permette di misurare l'assorbanza (A) a 260 nm, lunghezza d'onda di assorbimento caratteristica degli anelli eterociclici aromatici degli acidi nucleici. Inoltre l'assorbanza viene misurata anche alle seguenti lunghezze d'onda:

$\lambda = 230$  nm: lunghezza d'onda di assorbimento di carboidrati complessi e fenoli;

$\lambda = 280$  nm: lunghezza d'onda di assorbimento di proteine;

$\lambda = 320$  nm: rumore di fondo dovuto ad un assorbimento aspecifico.

Noti questi valori è possibile stimare il grado di purezza dell'RNA (o DNA) in funzione di contaminazioni da carboidrati complessi e da proteine; buone preparazioni di RNA devono avere i seguenti rapporti

1)  $A_{260}/A_{280} = 1,8-2$

2)  $A_{260}/A_{230} = 1,8-2,2$

## **RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA**

L'RNA totale è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando il kit iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Biorad).

Nella fase di retrotrascrizione la trascrittasi inversa sintetizza una molecola di DNA a singolo filamento (cDNA) complementare all'RNA template. Nel primo ciclo della reazione di PCR, la Taq polimerasi sintetizza una molecola di DNA complementare al cDNA generando così un DNA a doppio filamento.

Nei cicli successivi della PCR la Taq polimerasi amplifica in modo esponenziale il DNA template a doppio filamento.

## **ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA**

Il cDNA così ottenuto è stato amplificato mediante Real-time PCR TaqMan utilizzando primers specifici con la tecnica della Real Time PCR. La sonda di tipo TaqMan è un oligonucleotide che, come i primers della PCR, viene disegnato per essere complementare alla sequenza bersaglio del transgene da

amplificare. Presenta all'estremità 5' un fluoroforo "Reporter" ed all'estremità 3' una molecola "Quencher". In una configurazione di questo tipo la molecola "Quencher" impedisce l'emissione di fluorescenza da parte del "Reporter". Nel corso di ogni ciclo di PCR, nella fase di estensione del filamento di DNA complementare alla sequenza bersaglio, quando l'enzima Taq Polimerasi incontra l'estremità 5' della sonda effettua il distacco del "Reporter". In questo modo il fluoroforo va in soluzione, non subisce più l'inibizione del "Quencher" ed emette fluorescenza. In base a questo meccanismo l'intensità della fluorescenza aumenta in funzione della concentrazione dell'amplificato specifico della reazione.

Tutti i reagenti e i primers sono stati ottenuti dall'Applied Biosystems; la composizione della MIX di reazione è costituita da 15 µl di Fast Universal PCR Master Mix 2x (No AmpErase, UNG), da 4 µl di cDNA (prodotto dalla retro trascrizione dell'RNA) e da 1 µl di primers specifici TaqMan. I campioni vengono caricati su una piastra multiwell da 96 pozzetti (MicroAmp, Applied Biosystems) e incubati a 95°C per 10 minuti, seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 secondi e poi a 60° per 1 minuto; la quantità relativa (RQ) viene calcolata utilizzando il metodo comparativo del Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

Il metodo comparativo delta Ct usa una formula aritmetica per calcolare le relative quantità dell'espressione genica del target individuato. La quantità del gene target espresso è normalizzato contro un riferimento endogeno ed un calibratore. Il riferimento endogeno (controllo interno) usato in tutti gli esperimenti è il 18S mentre il calibratore è rappresentato dal cDNA dei controlli. Il valore Ct del target e del controllo endogeno vengono calcolati per ogni campione. Il valore Ct del controllo endogeno è sottratto al valore Ct del gene target. Questo valore è conosciuto come delta Ct. Il delta Ct è quindi sottratto al delta Ct del calibratore e quest'ultimo valore è denominato delta-delta Ct. La quantità del gene target espresso normalizzato al controllo endogeno (18S) ed al relativo calibratore (come indicato in ogni singolo esperimento) è calcolata usando la formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### Gene Housekeeping:

Eukariotic 18s rRNA endogenous Control

Geni target:

MCP-1 Hs00234140\_m1

PCNA Hs00696862\_m1

MMP2 Hs00234422\_m1

MMP7 Hs01042795\_m1

## **ANALISI CITOFUORIMETRICA**

Le cellule LAM/TSC isolate dal chilo ( $1 \times 10^6$ ), sia sospese che adese alla petri, sono state lavate due volte con PBS1X e centrifugate a 1200rpm per 10 minuti e, quindi, fissate con *fixation buffer* (BD) per 30 minuti a 4°C. I campioni sono stati permeabilizzati con Perm/Wash buffer (BD) per 30 minuti a. le cellule sono state incubate per un'ora a 4°C con l'anticorpo monoclonale di topo per fosfo-S6 (titolo 1:100), che riconosce la fosforilazione della Ser235/236 ed è marcato con Alexa fluor 647 (BD) e con l'anticorpo anti-human CD147 (titolo 1:100), che riconosce un epitopo nel dominio Ig N-terminale, marcato con PE (Immunotools). Al termine dell'incubazione sono stati compiuti due lavaggi di 10' ciascuno in PBS1X. I campioni incubati con CD147 sono stati incubati con l'anticorpo secondario anti-mouse IgG1 (titolo 1:200, Immunotools) per 1 ora a 4°C. I campioni sono stati analizzati con BD FACS Canto II (BD) utilizzando il software FACS Diva version 6.1.3.

Analisi del ciclo cellulare: le cellule HASMCs, le cellule LAM/TSC in sospensione e adese isolate dal chilo sono stati fissate con etanolo freddo (70%) e marcate con ioduro di propidio (10µg/ml) ed RNAsi (1mg/ml) overnight a 4°C. I campioni sono stati centrifugati a 1200rpm e risospesi in PBS1X e, quindi, analizzati con FACS Cytomics FC500 (Beckman Coulter) utilizzando il software CXP software.

## **ELISA**

L'analisi della MMP-2 e MMP-7 delle cellule nei terreni di cultura alle condizioni indicate in ciascun esperimento è stata effettuata tramite test ELISA utilizzando dei kit specifici per le varianti umane (R&D).

## **WOUND HEALING**

Per la determinazione della motilità cellulare, le cellule LAM/TSC e le cellule MCF7 sono state piastrate in petri e una volta raggiunto l'80/90% di confluenza è stata effettuata la ferita. Dopo aver aspirato il terreno di cultura è stato effettuato un taglio netto all'interno del *monolayer* cellulare mediante una punta sterile da 200 $\mu$ l. Successivamente le cellule sono state lavate con PBS sterile e incubate con 5-azacitidina per 96 ore alle concentrazioni di 1  $\mu$ M, con rapamicina per 48 ore alla concentrazione di 1 e 5 ng/ml, con anticorpo anti-EGFR per 48 ore alla concentrazione di 5  $\mu$ g/ml. La chiusura del taglio è stata monitorata ogni 2 ore. La migrazione nei differenti gruppi sperimentali è stata determinata usando il programma ImageJ ricavando la media dell'area della chiusura della ferita rispetto all'area totale iniziale (tempo 0). La migrazione delle cellule LAM/TSC è stata calcolata al 50% e al 100% della chiusura della ferita.

## **ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI**

I dati sperimentali ottenuti dai diversi tipi di analisi statistiche effettuate sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard. Per il confronto tra tre o più campioni è stato utilizzato il Test di t-Student o l'Anova seguita dal test di Bonferroni. Sono state considerate significative le differenze per le quali il valore P è inferiore a 0,05.

# SCOPO DELLA RICERCA



La linfangioleiomiomatosi (LAM) è una malattia rara e progressiva che colpisce quasi esclusivamente le donne in età fertile (Taveira-daSilva et al., 2006). La LAM è caratterizzata dall'iperproliferazione di cellule muscolari lisce anomale, che prendono il nome di "cellule LAM" che causano la formazione di cisti polmonari, tumori addominali e l'infiltrazione del sistema linfatico assiale nel torace e nell'addome inclusi i linfonodi e il dotto toracico (Taveira-DaSilva et al., 2006). Sebbene le cellule LAM siano istologicamente benigne, è stato proposto un modello metastatico per spiegare alcune manifestazioni della LAM come l'infiltrazione assiale e la presenza delle cellule LAM in vari organi (Henske, 2003). Inoltre in pazienti affetti da LAM sporadica è stata riscontrata la presenza della stessa mutazione in TSC2 e la perdita di eterozigotà in cellule di noduli polmonari, degli AMLs e di linfonodi (Sato et al., 2002). Il potenziale metastatico delle cellule LAM è stato anche confermato durante il follow-up di pazienti con LAM sporadica sottoposte a trapianto polmonare, nei cui polmoni trapiantati sono state individuate cellule LAM (Karbowiczek et al., 2003). Inoltre, la diffusione delle cellule LAM nei fluidi corporei, come sangue, urine e versamento chiloso, dimostra la loro capacità migratoria (Karbowiczek et al., 2003). I meccanismi molecolari alla base delle capacità metastatiche delle cellule LAM non sono stati ancora completamente compresi, tuttavia, l'individuazione di molecole di adesione (CD44v6), metalloproteasi (MMP-2 e MMP-9, MMP-1) e chemochine (CCL2, CXCL1, CXCL5) nelle cellule, nei tessuti e nei fluidi di lavaggio bronco-alveolare delle pazienti LAM suggeriscono che potrebbe esserci il reclutamento di cellule patologiche nel polmone (Matsui et al., 2000; Pacheco-Rodriguez et al., 2007; Pacheco-Rodriguez et al., 2008).

La metastasi delle cellule verso gli organi specifici può dipendere da citochine e dall'interazione tra fattori solubili prodotti dal microambiente con i recettori delle cellule metastatiche che controllano la migrazione verso specifici siti distanti dal tumore primario attratte da questi fattori.

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di studiare alcuni meccanismi implicati nella migrazione e motilità delle cellule LAM e TSC, utilizzando le cellule LAM/TSC, presenti in laboratorio e isolate dal chilotorace di una paziente affetta da LAM associata a TSC. Queste cellule sono uno strumento ideale per le loro caratteristiche intrinseche come la capacità di vivere in uno stato di adesione e sospensione, la mancanza di tuberina, la cui espressione può

essere indotta con agenti rimodellanti della cromatina, e la sensibilità all'anticorpo anti-EGFR e, in parte, alla rapamicina (Lesma et al., in press).

Le metalloproteasi sono un gruppo di enzimi capaci di degradare componenti della matrice extracellulare (ECM). La disgregazione della matrice extracellulare è un passaggio fondamentale nel processo dell'invasione e metastatizzazione. Le MMPs sono implicate nella maggior parte delle malattie croniche polmonari come nella crescita tumorale e metastatica (Chakrabarti et al., 2005; Folgueras et al., 2004). Studi recenti hanno dimostrato che l'invasività, la distruzione del parenchima polmonare e la formazione di cisti polmonari nella LAM sono probabilmente mediati dalle MMPs che hanno come bersaglio principale l'elastina (Goncharova et al., 2012). La MMP-2 e MMP-9 sono presenti a livelli elevati nei noduli polmonari e nelle urine delle pazienti affette da LAM (Lee et al., 2010; Glasgow et al., 2010).

Studi recenti mostrano una connessione tra le MMP-2, l'aneurisma aortico addominale e la formazione di vasi, indicando che le MMP-2 sono importanti nella migrazione cellulare e nell'angiogenesi (Lee et al., 2013). MT1-MMP regola l'invasione tumorale, la migrazione cellulare e l'angiogenesi attraverso l'attivazione della MMP-2 (Seiki et al., 2002). Il silenziamento della MMP-2 determina una ridotta invasività cellulare e l'angiogenesi indotta dal tumore, in vitro, inoltre, induce l'apoptosi e l'inibizione della crescita tumorale nel glioblastoma (Kargiotis et al., 2008).

Il meccanismo attraverso il quale la perdita di tuberina promuove lo sviluppo della LAM è ancora in fase di studio, tuttavia si pensa possa essere dovuto alla metastasi delle cellule tuberina-deficienti (Barnes et al., 2009).

Barnes et al., hanno dimostrato che le cellule tuberina-deficienti acquisiscono la capacità di vivere in una fase di sospensione e caratteristiche invasive. I prodotti della  $\beta$ -catenina sono trascrizionalmente attivi e promuovono l'attivazione della MMP-7, responsabile dell'acquisizione delle capacità invasive nelle cellule tuberina-deficienti (Barnes et al., 2009).

La MMP-7, è frequentemente espressa nei tessuti tumorali e risulta essere importante per la crescita invasiva delle cellule tumorali (Sier et al., 2008). È stato inoltre dimostrato che l'RNA messaggero della MMP-7 è espresso in molti tumori tra cui il tumore del colon e dello stomaco, e contribuisce alla crescita tumorale e al processo di metastatizzazione (Rivat et al., 2003).

In questo studio sono stati valutati i livelli di espressione della MMP-2 e della MMP-7 allo scopo di studiare un loro possibile ruolo nella capacità migratoria delle cellule LAM/TSC per poter riuscire ad individuare un nuovo bersaglio per impedire alle cellule di migrare ed invadere i polmoni.

L'epithelial to mesenchymal transition (EMT) è un processo importante durante l'embriogenesi, e negli ultimi anni, è stato dimostrato un suo ruolo nella progressione del cancro. Nelle cellule tumorali l'acquisizione di caratteristiche mesenchimali sembra essere un evento transiente e cruciale per le capacità migratoria e invasiva. Lo stato mesenchimale è, infatti, associato alla capacità delle cellule di migrare negli organi e di mantenere le caratteristiche di "steminalità", permettendo solo successivamente una differenziazione nel sito bersaglio con l'inizio delle metastasi. Inoltre, è stata dimostrata la presenza di cellule mesenchimali nei tumori renali di pazienti affetti da TSC (Kato et al., 2009). E' stato dimostrato che durante l'EMT l'attività delle giunzioni di aderenza è profondamente modificata attraverso l'inibizione dell'E-caderina. La perdita di questa proteina, inoltre, promuove la metastasi inducendo, in parte, la resistenza all'*anoikis* (Onder et al., 2008).

Per la loro origine e le loro caratteristiche intrinseche è di notevole importanza studiare nelle cellule LAM/TSC l'eventuale espressione di EMT tramite marcatori specifici quali l' E-caderina, vimentina e il fattore di trascrizione SNAIL sia nello stato di sospensione che in quello di adesione alla petri.

L'alterata progressione della fase G1/S è una caratteristica generale delle cellule che vanno incontro al processo di EMT indotto dai fattori di trascrizione della famiglia di SNAIL (Mejlvang et al., 2007). Per questo motivo in questa tesi è stato studiato il ciclo cellulare delle cellule LAM/TSC nelle fasi di sospensione e di adesione alla petri, con la tecnica della citofluorimetria per valutare le capacità proliferative nelle due fasi e l'espressione delle proteine che regolano il ciclo cellulare come la ciclina D1 e la chinasi ciclina dipendente 4 (CDK4) tramite western blotting. La fosforilazione di S6, marcatore biochimico delle cellule TSC (Goncharova et al., 2002), è stata studiata in relazione al ciclo cellulare nelle cellule LAM/TSC sia nello stato di sospensione che di adesione alla petri.

Il processo di EMT ha un ruolo critico nella progressione delle cellule tumorali, infatti, controlla l'acquisizione delle capacità delle cellule tumorali di invadere e metastatizzare. Per l'origine delle cellule LAM/TSC e per la loro capacità di

sopravvivere in fase di sospensione, che indica un fenotipo metastatico come proposto dalla teoria metastatica benigna, è stata valutata la motilità delle cellule LAM/TSC con il saggio di *wound healing* che permette di misurare la capacità delle cellule di migrare in una ferita prodotta strisciando (*scratch*) un puntale in una piastra a confluenza. Al fine di studiare alcuni mediatori della motilità delle cellule LAM/TSC in seguito a saggio di *wound healing* sono stati analizzati i livelli di espressione e di secrezione delle citochine infiammatorie e delle MMP-2 e 7.

Al momento attuale sono stati proposti alcuni approcci farmacologici per la cura della LAM e della TSC tra cui il controllo di mTOR tramite la rapamicina e i suoi derivati. La rapamicina, un farmaco immunosoppressore che controlla la proliferazione e la crescita cellulare, esplica la sua azione nell'inibire l'attività di mTOR. Mimando l'azione del complesso amartina-tuberina, la rapamicina è il farmaco d'elezione per le cellule con mutazioni nei geni *TSC1* e *TSC2*, quindi, è stata utilizzata nei recenti trials clinici per controllare l'iperproliferazione delle cellule LAM e TSC. Nonostante la rapamicina sia in grado di stabilizzare le funzioni polmonari nei pazienti LAM, l'efficacia clinica del trattamento non è permanente. Infatti la sua interruzione porta alla ricomparsa della maggior parte dei sintomi associati alla LAM (Gu et al., 2013).

La via di Raf/MEK/Erk è coinvolta nei meccanismi alla base della LAM e della TSC (Yu et., 2009; Gu et al., 2013). L'EGF (*Epidermal Growth Factor*) e il suo recettore, EGFR, normalmente attivano questa via e promuovono processi responsabili della crescita e della progressione tumorale tra cui la proliferazione, l'angiogenesi, l'invasione, la metastasi e l'inibizione dell'apoptosi (Rocha-Lima et al., 2007). Per questi motivi negli ultimi anni, l'EGFR è diventato un' importante bersaglio terapeutico contro diversi tipi di tumore.

Studi recenti, condotti nel nostro laboratorio, hanno dimostrato che cellule isolate dall'AML renale di pazienti affetti da TSC e le cellule LAM/TSC sono dipendenti dall'EGF per proliferare e il trattamento farmacologico con l'anticorpo anti-EGFR è in grado di causare progressiva morte delle cellule tuberina deficienti (Lesma et al., 2005; Lesma et al., 2009). Queste colture cellulari hanno una diversa sensibilità alla rapamicina che non conduce però mai alla completa morte cellulare.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto farmacologico dell'anticorpo anti-EGFR e della rapamicina sulle capacità migratorie delle cellule LAM/TSC che non erano ancora stati valutati.

Lo studio dei processi che regolano la migrazione nelle cellule LAM/TSC potrà essere utile nella valutazione di nuovi approcci farmacologici mirati ad inibire la capacità invasiva di queste cellule utilizzando, ad esempio, inibitori delle MMPs.

# RISULTATI

## **CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA DELLE CELLULE LAM/TSC IN FASE DI ADESIONE E SOSPENSIONE**

S6 controlla la trascrizione proteica insieme alle *binding protein*, come le 4EBP1 e i fattori di elongazione, ed è iperattivata durante la fase di replicazione.

Nelle cellule tuberina-deficienti p70S6K e S6 sono maggiormente fosforilate a causa della mancata regolazione di mTOR da parte del complesso amartina e tuberina (Goncharova et al., 2002). Le cellule LAM/TSC passano in maniera ciclica da uno stato di adesione ad uno di sospensione, rimanendo vitali. In entrambi gli stati, le cellule LAM/TSC, non esprimono tuberina (Lesma et al., in press).

Tuttavia nella fase di sospensione la fosforilazione di S6 è ridotta in maniera significativa solo in una piccola percentuale (13,5%) delle cellule LAM/TSC rispetto alle cellule LAM/TSC adese (82,3%) (Fig. 1).

La percentuale delle cellule LAM/TSC che esprimono la forma fosforilata di S6 è significativamente più elevata nella condizione di adesione rispetto alle cellule HASMC utilizzate come controllo (69%) (Fig. 1).

Dato il diverso grado di fosforilazione di S6 delle cellule LAM/TSC nello stato di adesione e sospensione, è stato studiato il ciclo cellulare di queste cellule.

Gli eventi molecolari che controllano il ciclo cellulare sono ordinati e direzionali: ogni processo è la diretta conseguenza dell'evento precedente ed è la causa di quello successivo. Il ciclo cellulare è caratterizzato da cinque fasi: la fase G1 , che comprende la sintesi di mRNA e proteine responsabili della crescita cellulare che in parte sono necessarie nelle fasi successive; la fase S, durante la quale avviene la replicazione del DNA; la fase G2 , che separa la fase S dalla successiva; la fase M, durante la quale i cromosomi segregano e il citoplasma si divide per dare origine a due cellule figlie.

Tramite analisi di citofluorimetria, utilizzando ioduro di propidio, è stato possibile studiare il ciclo cellulare delle cellule LAM/TSC sia nello stato di adesione che nello stato di sospensione. Nello stato di adesione le cellule LAM/TSC in replicazione sono in percentuale elevata rispetto alle cellule HASMCs, utilizzate come controllo, e alle cellule LAM/TSC non adese, infatti la percentuale di cellule in fase S è elevata (Fig. 2).

La percentuale di cellule in fase G0-G1, è più alta nelle cellule in fase di

adesione rispetto alle cellule nello stato di sospensione, la cui percentuale è simile a quelle delle HASMCs. Tuttavia tale differenza non è significativa (Fig. 2). Nella fase G2-M, la percentuale di cellule LAM/TSC adese è significativamente ridotta rispetto alle HASMCs, mentre nelle cellule in sospensione, pur essendo ridotta, non è statisticamente significativa. In tutti i gruppi la percentuale di cellule in apoptosi non è significativa.

Le cellule LAM/TSC sono quindi prevalentemente in fase proliferativa nello stato di adesione e in una fase più quiescente nello stato di sospensione. Per caratterizzare meglio il ciclo cellulare delle cellule LAM/TSC nelle diverse condizioni di adesione sono state studiate alcune proteine coinvolte nella trascrizione, come le cicline e le Cdk. Le Cdk sono proteine chinasi caratterizzate dal legame con una specifica ciclina che attiva le Cdk stesse (Kato et al., 1994). Le Cdk oltre che nella regolazione della trascrizione, sono coinvolte nel processamento dell' mRNA e nel differenziamento cellulare. Le cicline, le principali proteine regolatrici delle Cdk, vengono espresse in maniera variabile a seconda delle fasi del ciclo cellulare e questa funzione dà loro il nome. Solitamente l'espressione della ciclina D1 oscilla moderatamente durante il ciclo cellulare con picchi nella fase G1, mentre PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) viene espresso solo nelle fasi G1 tardiva e S del ciclo cellulare. PCNA è espresso nei nuclei delle cellule durante la fase di sintesi del Dna del ciclo cellulare.

Nelle cellule LAM/TSC i livelli di ciclina D1 e Cdk4 sono significativamente diminuiti nelle cellule in sospensione rispetto a quelle adese e alle cellule HASMCs, indicando una ridotta presenza di cellule in fase G1 e confermando i dati ottenuti tramite le analisi di citofluorimetria (Fig. 3A). Anche i livelli dell' RNA messaggero di PCNA e della proteina sono significativamente ridotti nelle cellule LAM/TSC in sospensione rispetto alle cellule LAM/TSC adese e alle HASMCs, confermando un'elevata proliferazione nelle cellule LAM/TSC durante la fase di adesione (Fig. 3A e 3B).



## **EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION (EMT) NELLE CELLULE LAM/TSC**

L'*epithelial to mesenchymal transition* (EMT) è un processo con un ruolo importante nella progressione delle cellule tumorali. Durante il processo di EMT le caratteristiche cellulari vengono profondamente modificate. In particolare, l'acquisizione della capacità migratoria è dovuta all'alterata interazione tra cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare. La crescita e la sospensione della maggior parte delle cellule dipende dall'ancoraggio alla matrice cellulare, caratteristiche che vengono modificate nelle cellule cancerose (Hugo et al., 2007). L'acquisizione delle caratteristiche mesenchimali per le cellule tumorali è un evento transiente che può essere considerato molto importante per la migrazione e l'invasività tissutale (O' Hayre et al., 2008). Le cellule LAM/TSC passano da uno stato in cui sono adese alla piastra di coltura ad uno in cui si trovano sospese dimostrando una forte similarità con le cellule tumorali metastatiche e sono vitali in entrambi gli stati.

La perdita dell'espressione di E-caderina è considerato un evento fondamentale nell'EMT. L'E-caderina è una glicoproteina integrale di membrana che media l'adesione cellulare ed è inattivata nei tumori (Hajra et al., 2002); inoltre la perdita di questa proteina promuove la metastasi. E-caderina non è presente nelle cellule LAM/TSC né in adesione né in sospensione, mentre è presente nelle cellule epiteliali MCF7, cellule tumorali isolate da un tumore al seno, utilizzate come controllo (Fig. 4A). Le cellule LAM/TSC sia nello stato di adesione che nello stato di sospensione, a differenza delle cellule MCF7, esprimono vimentina, *marker* dell'EMT.

SNAIL, fattore di trascrizione che regola l'espressione di E-caderina e *marker* dell'EMT, è espresso nelle cellule LAM/TSC e nelle cellule COS7, utilizzate come controllo (Fig. 4B). Le cellule LAM/TSC non esprimono tuberina sia nella fase di adesione che in quella di sospensione, quindi, l'EMT, potrebbe essere correlata alla mancata espressione di tuberina (Fig. 4C). Le cellule LAM/TSC, che non esprimono tuberina per un evento epigenetico, sono state incubate, quindi, con 5-azacitidina ed è stata valutata l'espressione di E-caderina. La 5-azacitidina è un rimodellante della cromatina che è in grado di attivare la trascrizione del gene *TSC2*.

La presenza di tuberina induce l'espressione di E-caderina nelle cellule LAM/TSC (Fig. 5).

## **RUOLO DI FAK (*FOCAL ADHESION KINASE*) NELLE CELLULE LAM/TSC NELLO STATO DI ADESIONE E SOSPENSIONE**

FAK è una tirosin chinasi non recettoriale coinvolta nella regolazione della migrazione e della sopravvivenza. FAK promuove sia l'invasività che la motilità cellulare, attraverso l'attivazione di diverse vie di trasduzione del segnale. Una volta attivata FAK si autofosforila e lega la chinasi Src che a sua volta fosforila altri siti di FAK e le proteine leganti FAK, attivando così la *pathway* di PI3K/AKT con la progressione del ciclo cellulare (Papusheva et al., 2009; Thamilselvan et al., 2007).

La fosforilazione di FAK è ridotta nelle cellule LAM/TSC in fase di sospensione rispetto alle cellule in fase di adesione (Fig. 6). La ridotta attivazione causa una diminuzione della fosforilazione di Akt e, di conseguenza, di mTOR e S6. Per valutare se la diminuita fosforilazione di FAK potesse essere alla base della perdita di contatto e della sospensione delle cellule LAM/TSC, le cellule sono state incubate con PF228, un inibitore di FAK. La fosforilazione di FAK è ridotta da PF228 alla concentrazione di 10  $\mu$ M e solo debolmente dalla concentrazione di 1  $\mu$ M (Fig. 6). Nelle cellule LAM/TSC l'inibizione di Fak causa la riduzione della fosforilazione di Akt, seguita dall'inibizione della fosforilazione e dell'autofosforilazione di mTOR e da una marcata riduzione della fosforilazione di S6, come avviene nelle cellule LAM/TSC in fase di sospensione (Fig. 6). I livelli proteici sono stati quantificati ed espressi come densità ottica (O.D) (Fig. 6B).

Questi dati suggeriscono che il distacco delle cellule LAM/TSC possa essere sotto il controllo della *pathway* della FAK/ PI3K/ mTOR e che FAK sia coinvolta nella capacità di sospensione delle cellule LAM/TSC.

## **AZIONE DELL' ANTICORPO ANTI-EGFR E DELLA RAPAMICINA SULLO STATO DI ADESIONE E SOSPENSIONE NELLE CELLULE LAM/TSC**

Abbiamo precedentemente dimostrato che le cellule LAM/TSC necessitano dell'EGF per proliferare e questa dipendenza è dovuta alla mancanza di tuberina; inoltre, l'anticorpo anti-EGFR causa l'arresto della proliferazione già dopo 24 ore e la morte cellulare in circa 20 giorni (Lesma et al., in press).

La rapamicina, inibendo mTOR, mima l'azione del complesso tuberina/amartina. Nelle cellule LAM/TSC, la rapamicina è in grado di inibire significativamente la crescita e la proliferazione dimostrando una certa sensibilità di queste cellule all'azione del farmaco. L'esposizione per 24 ore alla rapamicina (1 o 5 ng/ml) o all'anticorpo anti-EGFR (5µg/ml) Ab3 (che si lega ad un sito del recettore dell'EGF vicino al sito di legame con il ligando) e Ab5 (che riconosce il sito del recettore che si lega al ligando) riduce in maniera statisticamente significativa la percentuale e la vitalità delle cellule in sospensione in quanto la percentuale di cellule sospese vitali dall'80% presente nel gruppo controllo diminuisce rispettivamente al 20% e al 30% (Fig. 7A).

L'anticorpo anti-EGFR e la rapamicina dopo 24 ore di incubazione non hanno nessun effetto sulla vitalità delle cellule in fase di adesione (Fig. 7B).

## **LIVELLI DI ESPRESSIONE E SECREZIONE DELLE CITOCHINE INFIAMMATORIE NELLE CELLULE LAM/TSC**

MCP-1 è in grado di controllare la migrazione direzionale dei macrofagi, delle cellule T e delle cellule NK ed è un importante modulatore dell'infiltrazione cellulare (Hoffmann et al., 2009). Al fine di studiare i fattori responsabili della motilità cellulare nelle cellule LAM/TSC sono stati analizzati i livelli di mRNA di MCP-1 tramite *real-time* PCR. Le cellule LAM/TSC esprimono elevati livelli dell'RNA messaggero di MCP-1 che vengono ridotti significativamente dall'incubazione con la 5-azacitidina indicando che l'espressione di tuberina è in grado di controllare i livelli dell'mRNA di MCP-1 (Fig. 8A). Anche in seguito del trattamento con l'anticorpo anti-EGFR e della rapamicina l'espressione dell'mRNA di MCP-1 si riduce in maniera statisticamente significativa (Fig. 8B).

Il rilascio di citochine proinfiammatorie è solitamente coinvolto nei meccanismi di

acquisizione di caratteristiche mesenchimali (Rolling et al.,1997) e per questo motivo è stata valutata la secrezione delle interleuchine (IL) nelle cellule LAM/TSC. È noto che la produzione di IL-6 e IL-8 è regolata dalla *pathway* della PI3K e delle MAPK, cascate di eventi che, da dati ottenuti precedentemente nel nostro laboratorio, sono da considerarsi molto importanti nelle cellule tuberina-deficienti per il loro coinvolgimento nel controllo di mTOR e il ruolo del recettore dell'EGF nella proliferazione e nella sopravvivenza delle cellule LAM/TSC (Lesma et al., in press).

Le cellule LAM/TSC producono circa 1600 pg/ml di IL-8, circa 2800 pg/ml di IL-6 e 40 pg/ml di IL-1 $\alpha$  in 48 ore, come dimostrato dalla totale assenza di secrezione di queste interleuchine in presenza di cicloesimide (Fig. 10A, 10B e 10C). l'IL-1 $\beta$  e il TNF- $\alpha$  non sono misurabili. L'espressione di tuberina indotta dal trattamento con la 5-azacitidina, inibisce la secrezione della IL-6, della IL-8 e della IL-1 $\alpha$  (Fig. 9A, 9B e 9C). L'incubazione per 48 ore con l'anticorpo anti-EGFR e con la rapamicina non diminuisce in maniera statisticamente significativa i livelli di secrezione della IL-6, della IL-8 e della IL-1 $\alpha$ , mentre il metilprednisolone (10nM) e il repertaxin (1nM), antagonista del recettore dell'IL-8, hanno ridotto significativamente i livelli di IL-6, della IL-8 e dell' IL-1 $\alpha$  (Fig. 10A, 10B e 10C).

## **ESPRESSIONE DELLA MMP-2, MMP-7 E LIVELLI DI EMMPRIN NELLE CELLULE LAM/TSC**

Le MMPs sono una famiglia di enzimi coinvolti in molti processi tra i quali il rimodellamento della matrice extracellulare, l'angiogenesi, la migrazione e la trasduzione del segnale. Le MMPs sono implicate in una varietà di disordini polmonari tra cui la LAM (Glasgow et al., 2010).

È stato, inoltre, dimostrato che i livelli di MMPs sono correlati all'aggressività tumorale sia *in vivo* che *in vitro* (Curran et al., 1999).

La MMP-2, chiamata anche gelatinasi A, è espressa nelle cellule mesenchimali, nelle cellule muscolari lisce e nei fibroblasti e ad alti livelli nei polmoni di pazienti affetti da LAM (Lee et al., 2009).

Le cellule LAM/TSC esprimono livelli di mRNA di MMP-2 statisticamente più elevati di quelli espressi dalle cellule MCF7, utilizzate come cellule controllo

essendo cellule tumorali provenienti da carcinoma della mammella (Fig. 11A). L'induzione dell'espressione di tuberina, in seguito al trattamento con la 5-azacitidina, causa una significativa riduzione dell'espressione della MMP-2 anche se i livelli rimangono significativamente più elevati rispetto a quelli delle cellule MCF7 (Fig. 11A). L'espressione di tuberina sembra, quindi, in grado di regolare l'espressione della MMP-2.

L'espressione della MMP-2 è sensibile allo stato di sospensione ed adesione delle cellule LAM/TSC, infatti nello stato di adesione i livelli di mRNA della MMP-2 sono tre volte maggiori rispetto all'espressione della MMP-2 delle cellule nello stato di sospensione (Fig. 11B).

La matrilisina, MMP-7, gioca un ruolo molto importante nell'invasione e nella metastasi tumorale e per questo motivo è stata studiata nelle cellule LAM/TSC che presentano caratteristiche metastatiche.

L'espressione della MMP-7 nelle cellule LAM/TSC è significativamente più elevata rispetto a quella delle cellule MCF7 (Fig. 12A).

L'espressione di tuberina, in seguito all'incubazione con la 5-azacitidina, riduce in maniera significativa l'espressione della MMP-7 nelle cellule LAM/TSC (Fig. 12A e B). Nello stato di sospensione le cellule LAM/TSC esprimono livelli di MMP-7 significativamente più elevati rispetto alla fase di adesione, a differenza dei risultati ottenuti dall'analisi dell'espressione della MMP-2 (Fig. 12B).

Molti studi sui fattori che inducono le metalloproteasi nelle cellule tumorali hanno portato all'identificazione di proteine transmembrana altamente glicosilate che inducono la sintesi delle metalloproteasi di matrice (*Extracellular matrix metalloproteinase inducer*: EMMPRIN/ CD147/ basigina) (Odajima et al., 2010). Le EMMPRIN sembrano avere un ruolo nello sviluppo, nel differenziamento e nel rimodellamento di alcuni tessuti, ma sicuramente rivestono notevole importanza nello sviluppo dei tumori in quanto sono significativamente espresse sulla superficie delle cellule tumorali e correlano con una cattiva prognosi (Odajima et al., 2010).

EMMPRIN è implicato nella progressione del tumore per la capacità di stimolare la produzione delle metalloproteasi.

L'espressione delle EMMPRIN nelle cellule LAM/TSC, valutata mediante citofluorimetria, è significativamente più elevata rispetto alle cellule MCF7 (Fig.

13A). A seguito del trattamento con la 5-azacitidina, nelle cellule LAM/TSC, i livelli di espressione delle EMMPRIN sono ridotti significativamente, ma rimangono comunque più elevati se paragonati a quelli delle cellule MCF7 (Fig. 13A).

Il trattamento con la 5-azacitidina non causa nessuna alterazione dei livelli di EMMPRIN nelle cellule MCF7 (Fig. 13A).

## **AZIONE DELL'ANTICORPO ANTI-EGFR E DELLA RAPAMICINA SUI LIVELLI DI MMP-2, DI MMP-7 E DI EMMPRIN**

Il trattamento con l'anti-EGFR (anti-EGFR Ab, 5µg/ml per 48h) e la rapamicina (Rapa, 5ng/ml per 48h) riduce in maniera statisticamente significativa l'espressione dell' mRNA della MMP-2 nelle cellule LAM/TSC (Fig. 14). In seguito ai trattamenti i livelli di mRNA della MMP-2 restano comunque significativamente più alti rispetto a quelli delle cellule LAM/TSC a seguito del trattamento con 5-azacitidina indicando che il controllo della *pathway* delle MAPK e della PI3K normalizzano solo in parte la disregolazione causata dall'assenza di tuberina (Fig. 14).

L'espressione della MMP-7 è, al contrario, significativamente aumentata in seguito all'incubazione con la rapamicina e, in maniera ancora maggiore, con l'anticorpo anti-EGFR (Fig. 15).

Nelle cellule LAM/TSC, l'incubazione con l'anticorpo anti-EGFR non diminuisce in maniera statisticamente significativa i livelli di EMMPRIN a differenza della rapamicina che causa un aumento non significativo (Fig. 13B).

In accordo con i dati ottenuti nell'espressione nell'mRNA, le cellule LAM/TSC secernono elevati livelli di MMP-2 (circa 12 ng/ml) rispetto alle cellule tumorali MCF7 (circa 0,3 ng/ml, Fig. 16A). Il trattamento con la 5-azacitidina sia nelle cellule LAM/TSC, che nelle cellule MCF7 non modifica i rispettivi livelli di produzione di MMP-2 (Fig. 16A). La capacità secretoria delle cellule LAM/TSC è, quindi, molto elevata rispetto a cellule tumorali maligne e non sembra essere regolata dall'espressione di tuberina (Fig. 16A).

I livelli di secrezione di MMP-7 non sono misurabili in nessun gruppo sperimentale.

La rapamicina causa un aumento non statisticamente significativo della secrezione di MMP-2 rispetto alle cellule controllo (Fig. 16B). Il blocco del recettore dell'EGF con l'anticorpo specifico, probabilmente inibendo la via di trasduzione del segnale attivata dall'EGF causa un significativo aumento di MMP-2 (circa 26 ng/ml) (Fig. 16B). In maniera simile, è riportato in letteratura che in cellule epiteliali l'inibizione della via di trasduzione del segnale dell'EGF, con l'anticorpo specifico, induce un aumento della secrezione di MMP-2 (Häärrä et al., 2009). Al fine di verificare la durata d'azione dell'effetto dell'anticorpo anti-EGFR e della rapamicina, i livelli di MMP-2 e MMP-7 sono stati valutati 30h dopo la sospensione dei trattamenti.

L'espressione di mRNA della MMP-2 nelle cellule LAM/TSC è significativamente aumentata 30h dopo la sospensione dei trattamenti con l'anticorpo anti-EGFR e con la rapamicina (per 48h) (Fig. 17). L'effetto dei trattamenti farmacologici perdura anche in seguito alla sospensione poiché i livelli di mRNA della MMP-2 sono ridotti in maniera statisticamente significativa rispetto ai livelli nelle cellule LAM/TSC controllo dopo 30h (Fig. 17). Questa riduzione è osservata anche durante i trattamenti farmacologici come mostrato in Fig. 14. La differenza dei livelli di mRNA delle MMP-2 nelle cellule LAM/TSC controllo in 30h e 48h potrebbe essere dovuto ad un'inibizione dell'espressione tempo-dipendente. L'espressione di mRNA della MMP-7, viceversa, diminuisce in maniera statisticamente significativa in seguito alla sospensione dei trattamenti sia nelle cellule LAM/TSC controllo che nelle cellule trattate (Fig. 18). L'espressione dell'mRNA della MMP-7 nelle cellule LAM/TSC sembra essere tempo dipendente con un aumento tra le 30 e le 48h (Fig. 18).

Per valutare la durata d'azione dei trattamenti sulla secrezione, il rilascio di MMP-2 è stato misurato 11 e 30 ore dopo la sospensione dei trattamenti farmacologici. Nelle cellule LAM/TSC la secrezione delle MMP-2 è aumentata in maniera tempo-dipendente, mentre l'aumentato rilascio dovuto ai trattamenti farmacologici è revertito in maniera tempo-dipendente fino a livelli statisticamente più bassi rispetto a quelli delle cellule controllo in 30h (Fig. 19).

La sospensione del trattamento con la 5-azacitidina non modifica la secrezione di MMP-2 probabilmente perché l'effetto della 5-azacitidina è realmente causato dall'espressione di tuberina che resta stabile fino a 15 giorni dalla sospensione del trattamento (Fig. 19).

## VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ MIGRATORIA E INVASIVA DELLE CELLULE LAM/TSC

Il processo di EMT ha un ruolo critico nella progressione del tumore, infatti controlla l'acquisizione delle capacità di invadere e metastatizzare delle cellule tumorali. Poiché le cellule LAM/TSC hanno caratteristiche di EMT e vivono sia in adesione che in sospensione abbiamo studiato la loro motilità con il saggio di *wound healing* che permette di misurare la capacità delle cellule di migrare in una ferita prodotta strisciando (*scratch*) un puntale in una piastra a confluenza.

Le cellule LAM/TSC hanno elevata motilità rispetto alle cellule tumorali MCF7 utilizzate come controllo. Le cellule LAM/TSC impiegano circa 11 ore a rimarginare la ferita mentre le cellule MCF7 dopo 40 ore non sono in grado di rimarginare completamente la ferita (Fig. 20A e 20B).

La diffusione metastatica coinvolge due distinti processi: l'aumentata proliferazione cellulare e la migrazione delle cellule. Come precedentemente dimostrato, la rapamicina e l'anticorpo anti-EGFR sono efficaci nel controllare la proliferazione delle cellule LAM/TSC, ma non ci sono dati a riguardo della loro azione sulla migrazione. È stata, quindi, valutata la capacità migratoria delle cellule LAM/TSC in seguito al trattamento con la rapamicina (1 e 5ng/ml per 48 ore) e con l'anticorpo anti-EGFR (5µg/ml per 48 ore). E' stato dimostrato che mTOR è un regolatore dell'EMT e la sua inibizione con la rapamicina determina la diminuzione della capacità migratoria e invasiva delle cellule di tumore al colon, e che il *knock down* di mTOR 1 e mTOR 2 induce l'EMT (Gulhati et al., 2011). Nelle cellule LAM/TSC la rapamicina alla concentrazione di 5ng/ml diminuisce la capacità migratoria determinando un aumento del tempo di chiusura della ferita (25 ore) (Fig. 20A e 20B). Alla concentrazione di 1ng/ml, che è in grado di controllare la proliferazione delle cellule LAM/TSC, la rapamicina non ha effetto sulla capacità di rimarginare la ferita (dati non mostrati).

Le vie di trasduzione del segnale regolate dal recettore dell'EGF sono coinvolte nei processi tumorigenici, così come nell'aumento del potenziale migratorio e invasivo delle cellule durante l'EMT (de Souza et al., 2013). In tempi analoghi a quelli della rapamicina (25 ore), anche l'anticorpo anti-EGFR è efficace nel ridurre la motilità delle cellule LAM/TSC (Fig. 20A e 20B).



La mancanza di tuberina promuove la motilità e la tumorigenesi. Come abbiamo dimostrato precedentemente in un modello murino, le cellule TSC2<sup>-/-</sup> ASM possono migrare e invadere i linfonodi e i polmoni (Lesma et al., 2012). L'effetto della 5-azacitidina sull'espressione della tuberina può essere osservato per almeno due settimane a seguito dell'incubazione con il farmaco. La 5-azacitidina, inducendo l'espressione di tuberina, determina una riduzione della velocità di migrazione delle cellule LAM/TSC che nel saggio di *wound healing* necessitano circa 19 ore per chiudere la ferita (Fig. 20A e 20B).

La capacità dell'anticorpo anti-EGFR, della rapamicina e della 5-azacitidina di inibire la motilità è stata quantificata in base al tempo nel quale si chiude la ferita (Fig. 20B) e come percentuale di area ancora aperta dopo 11 ore, che è il tempo nel quale le cellule controllo LAM/TSC migrano a coprire completamente la ferita (Fig. 20C).

## **ANALISI DELL' ESPRESSIONE E DELLA SECREZIONE DELLE MMP-2 E MMP-7 NELLE CELLULE LAM/TSC DURANTE LA MIGRAZIONE CELLULARE ED AZIONE DELL'ANTICORPO ANTI-EGFR E DELLA RAPAMICINA**

Le cellule LAM/TSC come già dimostrato (Fig. 11 e 12) esprimono elevati livelli di MMP-2 e MMP-7. Al fine di studiare il ruolo delle MMPs nelle cellule LAM/TSC durante il processo migratorio, sono stati valutati i livelli di mRNA della MMP-2 e MMP-7 durante la chiusura della ferita nel saggio di *wound healing*, al 50% e alla completa chiusura della ferita (100%). Le cellule LAM/TSC sono in grado di migrare chiudendo il 50% e il 100% della ferita rispettivamente in 8 e 11h, mentre l'incubazione con l'anticorpo anti-EGFR, la rapamicina e la 5-azacitidina causa un rallentamento della motilità che permette una chiusura del 50% e del 100% della ferita rispettivamente dopo circa 11 e 30 ore dalla ferita (Fig. 20). Le cellule LAM/TSC controllo esprimono livelli di mRNA di MMP-2 significativamente più elevati alla completa chiusura rispetto al 50% della chiusura della ferita (Fig. 21), mentre non si osservano alterazioni dell'espressione di mRNA della MMP-7 durante la chiusura e a completa chiusura della ferita (Fig. 22). Durante il processo di chiusura della ferita, i trattamenti con l'anticorpo anti-EGFR e la rapamicina causano un aumento

statisticamente significativo dei livelli di MMP-2 e MMP-7 indicando che la produzione delle MMPs viene indotta dai trattamenti farmacologici durante la motilità (Fig. 21 e 22). Il calibratore per ciascun gruppo è il rispettivo controllo non sottoposto a migrazione (senza ferita).

L'espressione di tuberina, indotta dalla 5-azacitidina, può essere osservata per almeno due settimane in seguito alla sospensione del farmaco. I livelli di mRNA delle MMP-2 e MMP-7 sono incrementati in maniera non significativa dalla 5-azacitidina durante la chiusura e a completa chiusura della ferita suggerendo che questo aumento è dovuto all'espressione di tuberina (Fig. 21 e 22).

Per meglio valutare il ruolo delle MMPs nella motilità delle cellule LAM/TSC sono stati misurati i livelli di secrezione durante il *wound healing* al 50% e al 100% della chiusura della ferita e in seguito al trattamento con la rapamicina e con l'anticorpo anti-EGFR. La MMP-7 non è misurabile in nessun gruppo sperimentale. Al 50% della chiusura della ferita (8h nelle cellule LAM/TSC controllo) la secrezione di MMP-2 è simile a quella delle cellule LAM/TSC in condizioni normali (senza *wound*), mentre è significativamente aumentata a completa chiusura della ferita (11h nelle cellule LAM/TSC controllo) (Fig. 23A e 23B).

In seguito al trattamento con l'anticorpo anti-EGFR e la rapamicina la produzione delle MMP-2 è ridotta in maniera statisticamente significativa durante la riparazione della ferita (50% della chiusura =11h) rispetto alla secrezione della MMP-2 delle cellule LAM/TSC non sottoposte a *wound healing* (Fig. 23A), mentre a completa chiusura della ferita (30h) raggiunge livelli simili a quelli delle cellule non sottoposte a *wound healing* (Fig. 23B). I livelli di MMP-2 sono aumentati a completa chiusura rispetto al 50% della chiusura della ferita in seguito ai trattamenti suggerendo che la secrezione di MMP-2 negli stadi iniziali di motilità venga inibita dai farmaci in maniera simile a quanto avviene all'espressione di mRNA (Fig. 21 e 23). La secrezione di MMP-2 non in fase di migrazione (senza *wound healing*) diminuisce in maniera tempo-dipendente in presenza dei trattamenti farmacologici forse per una degradazione della MMP-2, che però non si osserva nelle cellule LAM/TSC controllo (Fig 23).

L'incubazione con 5-azacitidina, che induce l'espressione di tuberina rallenta il rilascio di MMP-2 durante la fase iniziale di motilità delle cellule LAM/TSC (50% chiusura della ferita=11h) rispetto alle cellule LAM/TSC trattate con la 5-

azacitidina, ma non sottoposte a *wound healing* (Fig. 23A). Nelle cellule LAM/TSC che esprimono tuberina a completa chiusura della ferita (30h) la secrezione di MMP-2 è simile alla secrezione delle cellule non sottoposte a *wound healing* (Fig. 23B).

# DISCUSSIONE

La TSC è una patologia multisistemica caratterizzata dalla formazione di amartomi in diversi organi come il cervello, il polmone, la pelle, il cuore e i reni ed è causata da mutazioni nei geni *TSC1* e *TSC2*. La LAM può essere sporadica o associata alla TSC ed è caratterizzata dall'iperproliferazione di cellule muscolari lisce-simili (ASM). L'alterazione della struttura polmonare è la causa dei sintomi della LAM (come dispnea e pneumotorace) che portano ad insufficienza respiratoria e, infine, a morte con un'evoluzione estremamente variabile. Le cellule utilizzate in questo studio sono state isolate dal chilotorace di una paziente affetta da LAM e TSC presentano una mutazione germinale sul gene *TSC2* e un evento epigenetico che causa l'assenza di tuberina. La proliferazione delle cellule LAM/TSC dipende dall'EGF e il blocco del recettore dell'EGF causa la morte cellulare come già dimostrato nelle cellule *TSC2<sup>-/-</sup>* e *TSC2<sup>-/-meth</sup>* precedentemente isolate nel nostro laboratorio (Lesma et al., 2005, 2009, in press). Le cellule LAM/TSC, a differenza delle cellule *TSC2<sup>-/-</sup>* e *TSC2<sup>-/-meth</sup>* che crescono aderendo alla piastra di coltura, si staccano in maniera spontanea da uno stato di subconfluenza per poi aderire nuovamente alla petri di coltura mostrando la capacità di sopravvivere in maniera indipendente dallo stato di adesione. La capacità di crescere in fase di sospensione è una caratteristica delle cellule tumorali correlata al processo metastatico, durante il quale le cellule si staccano dal sito primario e migrano utilizzando il sistema circolatorio e/o linfatico (Papusheva et al., 2009). Le cellule LAM/TSC in fase di sospensione hanno un tasso di proliferazione basso così come spesso avviene nelle cellule tumorali. Infatti, mentre un incremento del tasso proliferativo è importante per l'inizio del tumore primario, l'inibizione della crescita può essere cruciale per la sopravvivenza delle cellule tumorali in fase di metastasi che può portare allo sviluppo di un fenotipo maligno (Evdokimova et al., 2009).

L'anticorpo anti-EGFR è un anticorpo monoclonale in grado di bloccare il recettore dell'EGF e, quindi, tutta la cascata dipendente dal fattore di crescita. La sua efficacia è stata dimostrata nel trattamento di diverse neoplasie tra cui il cancro colon-rettale, il tumore al polmone non a piccole cellule (NSLC) e il carcinoma a cellule squamose della testa e del collo. La rapamicina è un antibiotico macrolide antifungino primariamente conosciuto per le sue proprietà immunosoppressive, induce l'apoptosi delle cellule dendritiche e inibisce l'attivazione e la proliferazione delle cellule B e T e proprio per questo è

utilizzato nei trapianti renali (Kenerson et al., 2005; Law et al., 2005). La rapamicina è un inibitore specifico dell'attività di mTOR, in particolare ha un'alta affinità per il complesso mTOR/raptor. La sua azione si esplica quando lega l'immunofillina FKBP12 con la quale forma un complesso inibitorio che, a sua volta, lega e inibisce in maniera specifica l'attività di mTOR, non permettendo la fosforilazione di S6K e 4E-BP1 (Franz et al., 2006). Sia l'anticorpo anti-EGFR che la rapamicina sono efficaci nel controllare la proliferazione delle cellule LAM/TSC, con l'anticorpo anti-EGFR che causa morte cellulare più efficacemente della rapamicina (Lesma et al., in press). L'anticorpo anti-EGFR e la rapamicina sono in grado di ridurre in 24 ore la sopravvivenza delle cellule LAM/TSC in fase di sospensione ma non delle cellule adese suggerendo un'efficacia maggiore per le cellule presenti nei fluidi, cioè cellule che *in vivo* si trovano nel torrente circolatorio o nel circolo linfatico.

Nelle cellule LAM e di AML in pazienti LAM sporadiche sono state riscontrate le stesse mutazioni *TSC2* suggerendo una comune origine genetica e, quindi, è stato ipotizzato che queste cellule possano generarsi da un progenitore comune (Karbowniczek et al., 2003).

L'EMT è un importante evento che conferisce alle cellule proprietà migratorie e invasive, e può rappresentare il meccanismo attraverso il quale le cellule *TSC2* sono in grado di migrare, come proposto per la LAM dalla teoria metastatica benigna (Henske, 2003). Nel modello animale da noi creato, le cellule *TSC2*<sup>-/-</sup> invadono i linfonodi e le pareti alveolari polmonari, causando distruzione cistica del parenchima, dimostrando, quindi, la loro capacità metastatica (Lesma et al., 2012). La presenza di tumori mesenchimali nei reni dei pazienti affetti da TSC suggerisce che amartina e tuberina possono regolare il differenziamento dei precursori cellulari renali coinvolti nella patogenesi degli AMLs nella TSC (Karbowniczek et al., 2003). Uno dei passaggi cruciali dell'EMT è la perdita di E-caderina che causa la perdita dell'interazione tra cellule. È stato recentemente dimostrato che la mancanza di E-caderina nelle cellule *TSC2*-deficienti può essere correlata alla ridotta capacità di adesione conducendo al distacco dalla petri e alla crescita in stato di sospensione (Barnes et al., 2010). Le cellule LAM/TSC presentano caratteristiche di EMT che sono dipendenti dall'espressione di tuberina come dimostrato dalla reversione dell'espressione di proteine marker (E-caderina) in seguito al trattamento con la 5-azacitidina

(Lesma et al., in press). Recenti studi hanno dimostrato che le modificazioni epigenetiche sono associate allo sviluppo e alla progressione del tumore. Le cellule LAM/TSC hanno un *pattern* di metilazione delle isole CpG all'interno del promotore del gene *TSC2* che non giustifica la mancata espressione di tuberina a differenza di quanto osservato nelle cellule *TSC2*<sup>-meth</sup> (Lesma et al., in press). Tuttavia, la componente di eterocromatina è elevata nelle cellule LAM/TSC e diminuisce in seguito al trattamento con la 5-azacitidina, al contrario della eucromatina che è aumentata in seguito al trattamento con la 5-azacitidina. Questi dati indicano che nelle cellule LAM/TSC differenti alterazioni epigenetiche, correlate alla conformazione chiusa della cromatina, possono influenzare *TSC2* e possono risultare cruciali nello sviluppo delle lesioni TSC, come succede nei tumori (Esteller, 2008). Inoltre, abbiamo recentemente dimostrato che la rosuvastatina, un inibitore della sintesi del colesterolo, agendo come rimodellante della cromatina, può essere utile in co-trattamento con gli inibitori di mTOR nella TSC quando l'alterazione genetica è riconducibile a un evento epigenetico come nel caso della metilazione del promotore del gene *TSC2* (Lesma et al., 2013).

La capacità delle cellule LAM/TSC di staccarsi dalla petri per sopravvivere sembra essere controllata dall'attività della *focal adhesion kinase* (FAK) che è fosforilata a livelli più alti nelle cellule in fase di adesione rispetto a quelle in fase di sospensione. La riduzione dell'attività di FAK nelle cellule in fase di sospensione è correlata ad una riduzione dei livelli di fosforilazione di AKT, mTOR e S6. L'inibizione di FAK con un inibitore specifico, riproduce la riduzione dell'attività della cascata di AKT/mTOR indicando un coinvolgimento della chinasi FAK nel processo di sospensione delle cellule LAM/TSC.

La ridotta fosforilazione di S6 nelle cellule LAM/TSC in fase di sospensione rispetto alle cellule in fase di adesione dimostra l'inizio di uno stato di quiescenza che probabilmente è attivato anche dalla riduzione della fosforilazione di Fak. Lo stato di rallentata attività nella fase di sospensione è confermato dall'evidenza che nelle cellule LAM/TSC vitali ma sospese, la fase G1/S è ridotta come accade anche per l'espressione dei *marker* di proliferazione, suggerendo che una ridotta proliferazione può favorire la motilità cellulare in queste condizioni. La mancata progressione nella fase G1/S è una caratteristica delle cellule che sono sottoposte ad EMT (Mejlvang et al., 2007).

Anche il microambiente infiammatorio può rappresentare un importante fattore nella regolazione della migrazione cellulare dal tumore primario attraverso un processo di EMT. L'IL-6 promuove l'EMT nelle cellule di tumore al seno. Le cellule LAM/TSC secernono, probabilmente in maniera tuberina dipendente, elevati livelli di IL-6, di IL-8 e di IL-1 $\alpha$  che non sembrano essere significativamente influenzati dal trattamento con la rapamicina e con l'anticorpo anti-EGFR. Questi dati suggeriscono che il meccanismo di regolazione della produzione di interleuchine nelle cellule LAM/TSC è dipendente dall'attività della *pathway* controllata da tuberina e dal complesso tuberina-amartina.

La diffusione metastatica coinvolge due distinti processi: l'aumentata proliferazione cellulare e la migrazione delle cellule. La rapamicina e l'anticorpo anti-EGFR, sono efficaci nel controllare la proliferazione delle cellule LAM/TSC, ma non ci sono dati a riguardo della loro azione sulla migrazione. E' stato dimostrato che mTOR è un regolatore dell'EMT e la sua inibizione con la rapamicina determina la diminuzione della capacità migratoria e invasiva delle cellule di tumore al colon, e che il *knockdown* di mTOR 1 e mTOR 2 induce l'EMT (Gulhati et al., 2011). Le vie di trasduzione del segnale regolate dal recettore dell'EGF sono coinvolte nei processi tumorigenici, così come nell'aumento del potenziale migratorio e invasivo delle cellule durante l'EMT (de Souza et al., 2013).

MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) e il suo recettore CCR2 sono espressi in molti tipi cellulari come i fibroblasti della pelle e sono *overespressi* in molti processi patologici (Yamamoto, 2003). MCP-1 può stimolare direttamente e indirettamente l'angiogenesi attraverso il reclutamento dei monociti, inoltre è *overespresso* nei processi fibrotici (Wada. et al., 2004). In maniera simile, l'*overespressione* di MCP-1 nei tumori TSC potrebbe stimolare l'angiogenesi e la fibrosi (Li et al., 2005). Le cellule LAM/TSC esprimono elevati livelli di MCP-1 che vengono modulati dall'anticorpo anti-EGFR e con la rapamicina dimostrando l'efficacia dei trattamenti farmacologici nel ridurre l'espressione dell' mRNA di MCP-1.

Studi recenti hanno dimostrato che l'invasività, la distruzione del parenchima polmonare e la formazione di cisti polmonari nella LAM sono modulati dalle MMPs che hanno come bersaglio principale l'elastina (Goncharova et al., 2012). La capacità di metastasi delle cellule LAM è correlata anche alla produzione di



enzimi proteolitici, come ad esempio le MMPs. La crescita metastatica coinvolge molecole di adesione ed enzimi proteolitici come la MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 e MMP-9 (Pacheco-Rodriguez et al., 2010). I noduli LAM esprimono la MMP-2, MMP-9, MMP-1, gli attivatori (MT-MMP) e anche gli inibitori delle MMPs (TIMP) (Pacheco-Rodriguez et al., 2010). Nelle cellule LAM/TSC l'espressione di CD44v6 e delle MMPs può essere di supporto per spiegare gli aspetti molecolari della metastasi della LAM (Pacheco-Rodriguez et al., 2010).

La proteolisi delle componenti della matrice extracellulare è regolata dall'attività delle MMPs e dei loro inibitori tissutali (TIMPs). È stato dimostrato che le MMP-1, MMP-2 e MMP-9 sono espresse nelle cellule LAM e che la distruzione cistica del parenchima polmonare nella LAM può essere attribuita ad uno sbilanciamento dei livelli di MMPs e TIMPs (Hayashi et al., 1997). Le MMPs sono secrete come forma inattiva (pro-MMPs) e vengono attivate mediante un taglio proteolitico (forma attiva). La MMP-2 è espressa nelle cellule muscolari lisce, nei fibroblasti e risulta essere *up-regolata* nei polmoni di pazienti affetti da LAM (Hayashi et al., 1997). Un'ulteriore conferma del ruolo della MMP-2 nella LAM è stato fornito dal gruppo di Lee et al. che ha evidenziato un'elevata secrezione di MMP-2 da un angiomiolipoma di una paziente affetta da LAM (Lee et al., 2010). Inoltre, l'espressione delle metalloproteasi, in particolar modo della MMP-2, è aumentata nei noduli di pazienti affette da LAM e i livelli della MMP-2 sono stati identificati come cruciali per il processo di angiogenesi e usati come target per le terapie anti-tumorali (Wojtowicz-Praga et al., 1997).

La MMP-7, è frequentemente espressa nei tessuti tumorali ed è importante per la crescita invasiva delle cellule tumorali (Sier et al., 2008). L'Rna messaggero della MMP-7 è espresso nei tumori quali il tumore del colon e dello stomaco e contribuisce alla crescita tumorale e al processo di metastatizzazione (Rivat et al., 2003). Proprio per queste caratteristiche può essere utilizzata come un target di chemoprevenzione (Kawabata et al., 2006). Nelle cellule LAM tuberina deficienti la  $\beta$ -catenina stimola l'espressione della MMP-7 che conferisce a queste cellule un fenotipo invasivo (Barnes et al., 2009).

Le cellule LAM/TSC esprimono elevati livelli di MMP-2 e MMP-7, che sembrano dipendenti dall'espressione di tuberina e sono modificati dallo stato di adesione o sospensione in cui si trova la cellula. L'espressione della MMP-7 è più elevata nelle cellule LAM/TSC in fase di sospensione suggerendo l'acquisizione di

caratteristiche di invasività in questa fase, mentre la MMP-2 è più elevata nella fase di adesione probabilmente per la sua capacità di indurre la degradazione della matrice extracellulare. L'espressione della MMP-2 è dipendente dall'attivazione delle vie di trasduzione del segnale, come la via della MAP chinasi, che coinvolgono il complesso THC ed mTOR, infatti l'anticorpo anti-EGFR e la rapamicina sono efficaci nel ridurre l'espressione della MMP-2 con effetto che prosegue anche dopo la sospensione del trattamento.

Al contrario, l'anticorpo anti-EGFR aumenta la secrezione della MMP-2, ma la sospensione del trattamento riporta la secrezione delle MMP-2 a valori simili al controllo e, a tempi più lunghi, addirittura inferiori. La rapamicina non altera la secrezione delle MMP-2, mentre in seguito alla sua sospensione si verifica un aumento dei livelli in tempi brevi e una riduzione successiva, simile a quella causata dall'anticorpo anti-EGFR. Questi dati dimostrano l'importanza della MMP-2 nella patogenesi della LAM. L'anticorpo anti-EGFR, in maniera maggiore, e la rapamicina aumentano l'espressione della MMP-7. I livelli elevati di MMP-2 e MMP-7 nelle cellule LAM/TSC sono correlati all'espressione di tuberina dal momento che l'incubazione con la 5-azacitidina causa una riduzione significativa dei livelli di MMP-2 e MMP-7, tuttavia la secrezione della MMP-2 non sembra essere regolata dall'espressione di tuberina.

Molti studi sui fattori che inducono la sintesi delle metalloproteasi nelle cellule tumorali hanno portato all'identificazione di proteine transmembrana altamente glicosilate (EMMPRIN) che inducono la sintesi delle metalloproteasi di matrice (Odajima et al., 2010). Le cellule LAM producono EMMPRIN che stimola la produzione di metalloproteasi (Odajima et al., 2010). Le cellule LAM/TSC producono EMMPRIN in maniera significativamente maggiore rispetto alle cellule tumorali MCF7; i trattamenti farmacologici con l'anticorpo anti-EGFR e con la rapamicina non hanno effetti significativi sulla produzione di EMMPRIN indicando che probabilmente non è tramite mTOR che viene regolata la sintesi delle MMP-2 e MMP-7. Recentemente è stato dimostrato che EMMPRIN e le MMPs sono coinvolti nell'organogenesi e nella tumorigenesi del polmone (Odajima et al., 2010). La presenza di EMMPRIN e, di conseguenza delle MMPs nelle cellule LAM/TSC, suggerisce una disregolazione alla base di alcuni meccanismi cellulari e molecolari la cui ricerca può portare ad una migliore comprensione della patologia LAM.

I meccanismi molecolari alla base delle capacità metastatiche delle cellule LAM non sono stati ancora chiariti, tuttavia, l'individuazione di molecole di adesione (CD44v6), metalloproteasi (MMP-2 e MMP-9, MMP-1) e chemochine (CCL2, CXCL1, CXCL5) nelle cellule, nei tessuti e nei fluidi di lavaggio bronco-alveolare delle pazienti LAM suggeriscono che potrebbe esserci il reclutamento di cellule patologiche nel polmone (Matsui et al., 2000; Pacheco- Rodriguez et al., 2007; Pacheco- Rodriguez et al., 2008). Le cellule LAM/TSC presentano elevate capacità migratorie e i trattamenti farmacologici con l'anticorpo anti-EGFR e la rapamicina sono utili nel ridurre la motilità delle cellule LAM/TSC. La mancanza di tuberina promuove la motilità e la tumorigenesi, infatti, la 5-azacitidina, inducendo l'espressione di tuberina, determina una riduzione della velocità di migrazione delle cellule LAM/TSC.

I trattamenti con l'anticorpo anti-EGFR o la rapamicina causano un aumento dell'espressione della MMP-2 e della MMP-7 in maniera tempo-dipendente durante la migrazione. Al contrario, la secrezione della MMP-2 è ridotta nelle prime fasi del processo migratorio delle cellule LAM/TSC mentre raggiunge livelli simili a quelli delle cellule non in fase di motilità a tempi più lunghi quando le cellule non sono più in condizioni di migrare. Questo è in accordo con quanto riportato in cellule di adenocarcinoma staminali nelle quali l'espressione di MMP-2 è aumentata durante l'invasione, la migrazione e la tumorigenesi (Xin et al., 2013). La discrepanza tra l'espressione e la secrezione della MMP-2 richiede sicuramente un ulteriore e più accurato approfondimento.

L'espressione di tuberina, in seguito all'incubazione con la 5-azacitidina, durante la migrazione, causa un aumento dell'espressione e della secrezione della MMP-2 e dell'espressione della MMP-7 che rimane costante probabilmente per il perdurare dell'espressione di tuberina indotta dal rimodellante della cromatina per almeno 15 giorni. I livelli di MMP-2 nelle cellule LAM/TSC che esprimono tuberina, in fase migratoria sono simili a quelli delle cellule nello stato stazionario, di non migrazione, indicando che l'espressione delle MMP-2 e MMP-7 in presenza di tuberina non è influenzata dalla motilità.

Questi dati evidenziano che gli agenti rimodellanti della cromatina, inducendo la trascrizione della tuberina, possono revertire le caratteristiche mesenchimali delle cellule LAM/TSC. Le cellule LAM/TSC mostrano elevata motilità e una significativa differenza dei livelli di espressione delle MMPs tra lo stato di

adesione e lo stato di sospensione. Durante il processo migratorio le cellule LAM/TSC sottoposte a trattamento farmacologico mostrano un rallentamento della motilità e un aumento della secrezione della MMP-2 che nel tempo raggiunge livelli simili alle cellule LAM/TSC non sottoposte a migrazione. Il rallentamento della migrazione delle cellule LAM/TSC è da attribuire ai trattamenti farmacologici che esplicano la loro azione e stimolano la produzione di MMPs fino al completamento della chiusura della ferita per poi diminuire la produzione come evidenziato nelle cellule LAM/TSC in fase di non migrazione. In conclusione questi dati dimostrano la specificità dell'espressione di MMP-2 e MMP-7 nelle cellule LAM/TSC a seconda dello stato di adesione o di sospensione. L'attivazione delle MMPs è spesso osservata in varie metastasi di tumore e spesso correlata ad una prognosi infausta. Le MMPs sono prevalentemente correlate allo stato di attivazione della FAK; questa chinasi, oltre ad indurre l'espressione genica delle MMPs, è coinvolta nel rilascio della MMP-2 e nell'attivazione della via di trasduzione del segnale delle MAP chinasi (Segarra et al., 2005). Le cellule LAM/TSC in fase di adesione esprimono livelli di MMP-2 significativamente maggiori rispetto alle cellule tumorali e la FAK fosforilata, a differenza delle cellule LAM/TSC in fase di sospensione in cui i livelli di MMP-2 diminuiscono così come la fosforilazione di FAK. Le cellule in fase di sospensione, invece, mostrano un'elevata espressione della MMP-7, importante per la crescita e invasione tumorale. I livelli di espressione, in questo caso, sono significativamente più elevati nelle cellule LAM/TSC in fase di sospensione rispetto alle cellule tumorali MCF7 indicando l'acquisizione di un fenotipo invasivo.

La 5-azacitidina, causando l'espressione di tuberina, l'anticorpo anti-EGFR e la rapamicina riducono la capacità migratoria delle cellule LAM/TSC.

Capire i meccanismi alla base delle caratteristiche delle cellule LAM/TSC può risultare di estrema importanza per la valutazione dell'invasività delle cellule nella LAM e nella TSC e le nostre cellule LAM/TSC, possono essere considerate un buon modello per testare nuovi approcci terapeutici mirati a controllare la loro capacità migratoria. Inoltre, lo studio degli eventi epigenetici, che possono essere correlati alla LAM e alla TSC, potrebbe essere utile per lo sviluppo di una terapia efficace basata sull'utilizzo degli agenti rimodellanti della cromatina.

# BIBLIOGRAFIA

Balkwill F, Charles KA and Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer cells*, 2005. 7: 211-217.

Bai X, Ma D, Liu A, Shen X, Wang QJ, Liu Y, Jiang Y. Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science* 2007;318:977–980.

Barnes EA, Kenerson HL, Mak BC, Yeung RS. The loss of tuberin promotes cell invasion through the  $\beta$ -catenin pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Nov;43(5):617-27. doi: 10.1165/rcmb.2008-0335OC. Epub 2009 Dec 30.

Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer*. 2001 Sep;37 Suppl 4:S16-22.

Bendre MS, Margulies AG, Walser B, Akel NS, Bhattacharya S, Skinner RA, Swain F, Ramani V, Mohammad KS, Wessner LL, Martinez A, Guise TA, Chirgwin JM, Gaddy D, Suva LJ. Tumor-derived interleukin-8 stimulates osteolysis independent of the receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand pathway. *Cancer Res* , 2005. 65:11001–11009

Benvenuto G, Li S, Brown SJ, Braverman R, Vass WC, Cheadle JP, Halley DJ, Sampson JR, Wienecke R, DeClue JE: The tuberous sclerosis-1 (TSC1) gene product hamartin suppress cell growth and augments the expression of the TSC2 product tuberin by inhibiting its ubiquitination. *Oncogene* 2000, 19: 6306-16.

Bittmann I, Rolf B, Amann G, Lohrs U. Recurrence of lymphangiomyomatosis after single lung transplantation: new insights into pathogenesis. *Hum Pathol* 2003, 34:95–98

Black JL, Yin Ng H, Moir LM. Therapeutic strategies in lymphangiomyomatosis (LAM). *Respir Investig*. 2014 Jan;52(1):3-4. doi: 10.1016/j.resinv.2013.11.002. Epub 2013 Dec 9.

Bonetti F, Chiodera PL, Pea M, Martignoni G, Bosi F, Zamboni G, Mariuzzi GM. Transbronchial biopsy in lymphangioleiomyomatosis of the lung. HMB45 for diagnosis. *American Journal of Pathology* 1993, 17 (11); 1092-102.

Bulhak A, Roy J, Hedin U, Sjöquist PO, and Pernow J (2007) Cardioprotective effect of rosuvastatin in vivo is dependent on inhibition of geranylgeranyl pyrophosphate and altered RhoA membrane translocation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H3158–H3163.

Carsillo T, Astrinidis A, Henske EP: Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000, 97:6085-6090.

Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res*. 2005, (6):599-621.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2: 563-572

Chan KK, Oza AM, and Siu LL (2003) The statins as anticancer agents. *Clin Cancer Res* 9:10–19

Chang WY, Clements D, Johnson SR. Effect of doxycycline on proliferation, MMP production, and adhesion in LAM-related cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;299: 393–400.

Copp, J. Manning G, Hunter T. TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer Res*. 2009 69, 1821–1827

Costello LC, Hartman TE, Ryu JH. High frequency of pulmonary lymphangioleiomyomatosis in woman with tuberous sclerosis complex. *Mayo Clin Proc* 2000, 75:591-594.

Dada, S. Demartines N, Dormond O. mTORC2 regulates PGE2-mediated endothelial cell survival and migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008 372, 875–879

Dufner A, Thomas G. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res* 1999;253:100–109.

Eble JN. Angiomyolipoma of kidney. *Semin Diagn Pathol.* 1998 Feb; 15(1):21-40  
El-Hashemite N, Walker V, Kwiatkowski DJ: Estrogen enhances whereas tamoxifen retards development of Tsc mouse liver hemangioma: a tumor related to renal angiomyolipoma and pulmonary lymphangiomyomatosis. *Cancer Res* 2005, 65:2474–2481

Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008; 358: 1148-59.

Evdokimova V, Tognon C, Ng T, Ruzanov P, Melnyk N, Fink D, Sorokin A, Ovchinnikov LP, Davicioni E, Triche TJ, Sorensen PH. Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial mesenchymal transition. *Cancer Cell.* 2009 May 5;15(5):402-15.

Finlay GA, Malhowski AJ, Liu Y, Fanburg BL, Kwiatkowski DJ, Toksoz D. Selective inhibition of growth of tuberous sclerosis complex 2-null cells by atorvastatin is associated with impaired Rheb and Rho GTPase function and reduced mTOR/S6 kinase activity. *Cancer Res* 2007,62: 9878-9886.

Finlay GA, Malhowski AJ, Polizzi K, Malinowska-Kolodziej I, and Kwiatkowski DJ. Renal and liver tumors in Tsc2(1/-) mice, a model of tuberous sclerosis complex, do not respond to treatment with atorvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Mol Cancer Ther* (2009) 8:1799–1807.



Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol.* 2004;48(5-6):411-24.

Folpe AL: Neoplasms with perivascular epitheloid cell differentiation (PEComas). *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology & Genetics: Tumors of Soft Tissue and Bone.* Edited by CDM Fletcher, KK Unni, F Mertens. Lyon, France, IARC Press, 2002, pp.221–222

Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, Sabatini DM. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol.* 2006;16(18):1865-70.

Garami A, Zwartkuis FJ, Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Stocker H, Kozma SC, Hafen E, Bos JL, Thomas G. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell* 2003;11:1457–1466.

Gemmill R M, Zhou M, Costa L, Korch C, Bukowski R M, and Drabkin H A. Synergistic growth inhibition by Iressa and Rapamycin is modulated by VHL mutations in renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2005 June 20; 92(12): 2266–2277.

Gingras AC, Kennedy SG, O'Leary MA, Sonenberg N, Hay N. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev.* 1998 Feb 15;12(4):502-13.

Glasgow CG, Steagall WK, Taveira-Dasilva A, Pacheco-Rodriguez G, Cai X, El-Chemaly S, Moses M, Darling T, Moss J. Lymphangiomyomatosis (LAM): molecular insights lead to targeted therapies. *Respir Med.* 2010; 104 Suppl 1:S45-58.

Golstein JL, Brown MS. Regulation of the menalonnate pathway. *Nature* 1990, 343:425-30.

Goncharova EA, Goncharov DA, Eszterhas A, Hunter DS, Glassberg MK, Yeung RS, Walker CL, Noonan D, Kwiatkowski DJ, Chou MM, Panettieri RA, Krymskaya VP. Tuberin regulates p70 S6 kinase activation and ribosomal protein S6 phosphorylation. A role for the TSC2 tumor suppressor gene in pulmonary lymphangioleiomyomatosis (LAM). *J Biol Chem* 2002, 277:30958-30967.

Goncharova EA, Goncharov DA, Li H, Pimtong W, Lu S, Khavin I, and Krymskaya VP (2011) mTORC2 is required for proliferation and survival of TSC2-null cells. *Mol Cell Biol* 31:2484–2498.

Gu X, Yu JJ, Ilter D, Blenis N, Henske EP, Blenis J. Integration of mTOR and estrogen-ERK2 signaling in lymphangioleiomyomatosis pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Sep 10;110(37):14960-5. doi: 10.1073/pnas.1309110110. Epub 2013 Aug 27.

Häärä O, Koivisto T, Miettinen PJ. EGF-receptor regulates salivary gland branching morphogenesis by supporting proliferation and maturation of epithelial cells and survival of mesenchymal cells. *Differentiation*. 2009 Mar;77(3):298-306. Epub 2008 Nov 22.

Haddad LA, Smith N, Bowser M, Niida Y, Murthy V, Gonzalez-Agosti C, Ramesh V. The TSC1 tumor suppressor hamartin interacts with neurofilament-L and possibly function as a novel integrator of the neuronal cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2002 Nov 15, 277(46):44180-6.

Hay N and Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Dev*. 2004, 18:1926-1945.

Hayashi T, Fleming MV, Stetler-Stevenson WG et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in pulmonary lymphangioleiomyomatosis(LAM). *Hum Pathol*. 1997;28:1071–1078.

Han S, Santos TM, Puga A, Roy J, Thiele EA, McCollin M, Stemmer-Rachamimov A, Ramesh V. Phosphorylation of tuberin as a novel mechanism

for somatic inactivation of the tuberous sclerosis complex proteins in brain lesions. *Cancer Res* 2004;64:812–816.

Henske EP, Tuberous sclerosis and the kidney: from mesenchyme to epithelium, and beyond, *Pediatr Nephrol*; 20(7):854-7, 2005.

Henske EP, Wessner LL, Golden J, Scheithauer BW, Vortmeyer AO, Zhuang Z, Klein\_Szanto AJ, Kwiatkowski DJ, Yeung RS: Loss of tuberin in both subependymal giant cell astrocytomas and angiomyolipomas supports a two-hit model for the pathogenesis of the tuberous sclerosis tumors. *Am J Pathol* 1997, 151:1639–1647

Henske EP. Metastasis of benign tumor cells in tuberous sclerosis complex. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 Dec;38(4):376-81.

Hujanen E.S and Terranova V.P. Migration of tumor cells to organ-derived chemoattractants. *Cancer Res* 1985, 45:3517-3521.

Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003;115:577–590.

Jacinto, E. Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* 2004 6, 1122–1128

Karbowniczek M, Yu J, Henske EP. Renal angiomyolipomas from patients with sporadic lymphangiomyomatosis contain both neoplastic and non-neoplastic vascular structures. *Am J Pathol.* 2003 Feb;162(2):491-500

Karbowniczek M, Henske EP. The role of tuberin in cellular differentiation: are BRAf and MAPK involved? *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Nov;1059:168-73.

Kawabata K, Murakami A, Ohigashi H. Citrus auraptene targets translation of MMP-7 (matrilysin) via ERK1/2-dependent and mTOR-independent mechanism. *FEBS Lett.* 2006;580(22):5288-94.

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(4):820-3.

Krymskaya VP. Tumor suppressor hamartin and tuberlin: intracellular signaling. *Cell Signal* 2003, 15(8): 729-39.

Krymskaya VP. Smooth muscle-like cells in pulmonary lymphangiomyomatosis. *Proc Am Thorac Soc.* 2008 Jan 1;5(1):119-26.

Lamb RF, Roy C, Diefenbach TJ, Vinters HV, Johnson MV, Jay DG, Hall A. The TSC1 tumor suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho. *Nat Cell Bio* 1 2000, 2(5): 281-7.

Lee PS, Tsang SW, Moses MA, Trayer-Gibson Z, Hsiao LL, Jensen R, Squillace R, Kwiatkowski DJ. Rapamycin-insensitive up-regulation of MMP2 and other genes in tuberous sclerosis complex 2-deficient lymphangiomyomatosis-like cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010; 42(2):227-34.

Lesma E, Grande V, Carelli S, Brancaccio D, Canevini M. P, Alfano R. M, Coggi G, Di Giulio A. M, Gorio A. Isolation and Growth of Smooth Muscle-Like Cells Derived from Tuberous Sclerosis Complex-2 Human Renal Angiomyolipoma. Epidermal Growth Factor Is the Required Growth Factor, *Am J Pathol*; 167:1093–1103, 2005.

Lesma E, Grande V, Ancona S, Carelli S, Di Giulio AM, Gorio A. Anti-EGFR antibody efficiently and specifically inhibits human TSC2<sup>-/-</sup> smooth muscle cell proliferation. Possible treatment options for TSC and LAM. *PLoS One.* 2008;3(10):e3558.

Lesma E, Sirchia SM, Ancona S, Carelli S, Bosari S, Ghelma F, Montanari E, Di Giulio AM, Gorio A. The methylation of the TSC2 promoter underlies the abnormal growth of TSC2 angiomyolipoma-derived smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 2009;174(6):2150-9.

Lesma E, Eloisa C, Isaia E, Grande V, Ancona S, Orpianesi E, Di Giulio AM, Gorio A. Development of a lymphangioliomyomatosis model by endonasal administration of human TSC2-/- smooth muscle cells in mice. *Am J Pathol.* 2012 Sep;181(3):947-60. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.05.017.

Lesma E, Ancona S, Orpianesi E, Grande V, Di Giulio AM, Gorio A. Chromatin remodeling by rosuvastatin normalizes TSC2-/meth cell phenotype through the expression of tuberin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013 May;345(2):180-8. doi: 10.1124/jpet.113.203141.

Lesma E, Ancona S, Sirchia SM, Orpianesi E, Grande V, Colapietro P, Chiaramonte E, Di Giulio AM, Gorio A. TSC2 epigenetic defect in primary LAM cells. Evidence of an anchorage-independent survival. *J. Cell. Mol. Med.* In press.

Liao JK, Laufs U. Pleiotropics effect of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:89-118.

Logginidou H, Ao X, Russo I, Henske EP. Frequent estrogen and progesterone receptor immunoreactivity in renal angiomyolipomas from women with pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Chest.* 2000 Jan;117(1):25-30.

Maheshwar MM, Cheadle JP, Jones AC, Myring J, Fryer AE, Harris PC, Sampson JR. The GAP-related domain of tuberin, the product of the TSC2 gene, is a target for missense mutations in tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet* 1997, 6:1991-6.

Matsui K, Takeda K, Yu Z-X, Travis WD, Moss J, Ferrans VJ. Role for activation of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of pulmonary

lymphangioliomyomatosis. Arch Pathol Lab Med 2000;124:267-75.

Matsumoto Y, Horiba K, Usuki J, et al. Markers of cell proliferation and expression of melanosomal antigen in lymphangioliomyomatosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 1999, 21:327-336.

McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, Barker AF, Chapman JT, Brantly ML, Stocks JM, Brown KK, Lynch JP 3rd, Goldberg HJ, Young LR, Kinder BW, Downey GP, Sullivan EJ, Colby TV, McKay RT, Cohen MM, Korbee L, Taveira-DaSilva AM, Lee HS, Krischer JP, Trapnell BC. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangioliomyomatosis. N Engl J Med. 2011 Apr 28;364(17):1595-606. doi: 10.1056/NEJMoa1100391. Epub 2011 Mar 16.

Mejlvang J, Kriajevska M, Vandewalle C, Chernova T, Sayan AE, Berx G, Mellon JK, Tulchinsky E. Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition. Mol Biol Cell. 2007 Nov;18(11):4615-24. Epub 2007 Sep 12.

Moore M.A, The role of chemoattraction in cancer metastases. Bioessays 2001, 23: 674-676.

Moss J, Avila NA, Barnes PM, Litzenger RA, Bechtel J, Brooks PG, Hedin CJ, Hunsberger S, Kristof AS. Prevalence and clinical characteristics of lymphangioliomyomatosis (LAM) in patients with tuberous sclerosis complex. Am J Respir Crit Care Med. 2001;164(4):669-71.

Nellist M, Van Slegtenhorst MA, Goedbloed M, van den Ouweland AMW, Halley DJJ, van der Sluijs P: Characterizations of the cytosolic tuberin-hamartin complex. Tuberin is a cytosolic chaperone for hamartin. J Biol Chem 1999, 274:35647-52.

Newell KJ, Witty JP, Rodgers WH et al. Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. Mol Carcinog 1994; 10: 199–206..

Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of Ecadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 2008 May 15;68(10):3645-54.

Orlichenko LS, Radisky DC. Matrix metalloproteinases stimulate epithelial-mesenchymal transition during tumor development. *Clin Exp Metastasis.* 2008;25(6):593-600. doi: 10.1007/s10585-008-9143-9. Epub 2008 Feb 20.

Orlova KA, Crino PB. The tuberous sclerosis complex. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Jan;1184:87-105.

Oshiro N, Takahashi R, Yoshino K, Tanimura K, Nakashima A, Eguchi S, Miyamoto T, Hara K, Takehana K, Avruch J, Kikkawa U, Yonezawa K. The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J Biol Chem.* 2007; 282(28):20329-39.

Pacheco-Rodriguez G, Steagall WK, Crooks DM, Stevens LA, Hashimoto H, Li S, Wang JA, Darling TN, Moss J. TSC2 loss in lymphangiomyomatosis cells correlated with expression of CD44v6, a molecular determinant of metastasis. *Cancer Res.* 2007 Nov 1;67(21):10573-81.

Pacheco-Rodriguez G, Kumaki F, Steagall WK, Zhang Y, Ikeda Y, Lin JP, Billings EM, Moss J. Chemokine-enhanced chemotaxis of lymphangiomyomatosis cells with mutations in the tumor suppressor TSC2 gene. *J Immunol.* 2009 Feb 1;182(3):1270-7.

Pacheco-Rodriguez G, Moss J. The role of chemokines in migration of metastatic-like lymphangiomyomatosis cells. *Crit Rev Immunol.* 2010;30:387-394.

Papusheva E, Mello de Queiroz F, Dalous J, et al. Dynamic conformational changes in the FERM domain of FAK are involved in focal-adhesion behavior

during cell spreading and motility. *J Cell Sci.* 2009; 122: 656-666.

Pimenta SP, Baldi BG, Kairalla RA, Carvalho CR. Doxycycline use in patients with lymphangiomyomatosis: biomarkers and pulmonary function response. *J Bras Pneumol.* 2013 Jan-Feb;39(1):5-15.

Plank TL, Yeung RS, Henske EP. Hamartin, the product of the tuberous sclerosis complex 1 (TSC1) gene, interacts with tuberin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles. *Cancer Res* 1998, 58:4766-4770.

Prather P., de Vries PJ. Behavioral and cognitive aspects of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol*

Proud CG. Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem J* 2007;403:217–234.

Quantin B, Murphy G and Breathnach R. Pump-1 cDNA codes for a protein with characteristics similar to those of classical collagenase family members. *Biochemistry*, 1989, 28, 5327–34

Rivat, C., Le Floch, N., Sabbah, M., Teyrol, I., Redeuilh, G., Bruyneel, E., Mareel, M., Matrisian, L.M., Crawford, H.C., Gespach, C. and Attoub, S. Synergistic cooperation between the AP-1 and LEF-1 transcription factors in activation of the matrilysin promoter by the src oncogene: implications in cellular invasion. *FASEB J.* 2003. 17, 1721–1723.

Roach ES, Sparagana SP. Diagnosis of tuberous sclerosis complex. *Journal of child neurology* 2004, 19:643-649.

Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R. EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control.* 2007 Jul;14(3):295-304.

Ryu JH, Sykes AM, Lee AS, Burger CD. Cystic lung disease is not uncommon in men with tuberous sclerosis complex. *Respir Med.* 2012 Nov;106(11):1586-90.



Epub 2012 Aug 4.

Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *CurrBiol.* 2004;14(14):1296-302.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005; 307(5712):1098-101.

Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell.* 2006; 22(2):159-68.

Sato T, Seyama K, Fujii H, Maruyama H, Setoguchi Y, Iwakami S, Fukuchi Y, Hino O: Mutation analysis of the TSC1 and TSC2 genes in Japanese patients with pulmonary lymphangiomyomatosis. *J Hum Genet* 2002, 47:20-28.

Schalm SS, Blenis J. Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr Biol.* 2002 Apr 16;12(8):632-9.

Seiki M. The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration, *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (2002) 624–632.

Singer CA, Salinthon S, Backer KJ and Gerthoffer WT. Synthesis of immune modulators by smooth muscle. *Bioessays*, 2004. 26: 646-655.

Smalley SL. Autism and tuberous sclerosis. *J Autism Dev Disord* 1998;28:407-414

Smolarek TA, Wessner LL, McCormack FX, Mylet JC, Menon AG, Henske EP. Evidence that Lymphangiomyomatosis is caused by TSC2 mutations: chromosome 16p13 loss of heterozygosity in angiomyolipomas and lymph

nodes from women with lymphangiomyomatosis. *Am J Hum Genet* 1998, 62:810-815.

Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol.* 1993; 9:541-73.

Sugiura Y, Shimada H, Seeger RC et al. Matrix metalloproteinases-2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: Contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis. *Cancer Res* 1998; 58: 2209–1.

Taga T., Kishimoto T. gp130 and the interleukin-6 family of cytokines, *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997) 797–819

Taveira- DaSilva AM, Steagall WK, Moss J: Lymphangiomyomatosis. *Cancer Control* 2006, 13: 276-85.

Thamilselvan V, Craing DH, Basson MD. FAK association with multiple signal proteins mediates pressure-induced colon cancer cell adhesion via a Src-dependent PI3K/Akt pathway. *FASEB J.* 2007; 21: 1730-1741.

Thiele EA. Managing epilepsy in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 2004; 19:680-686.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in cancer onset and progression. *Bull Acad Natl Med.* 2009 Dec;193(9):1969-78; discussion 1978-9.

Valkovic T, Lucin K, Krstulja M, Dobi-Babic R, Jonjic N. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human invasive ductal breast cancer. *Pathol Res Pract.* 1998;194:335-340

Wada, T., K. Furuichi, N. Sakai, Y. Iwata, K. Kitagawa, Y. Ishida, T.Kondo, H. Hashimoto, Y. Ishiwata, N. Mukaida, et al. 2004. Gene therapy via blockade of monocyte chemoattractant protein-1 for renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.*

15:940–948.

Wojtowicz-Praga, S. M., Dickson, R. B., and Hawkins, M. J. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Investig. New Drugs* 1997.15, 61–75

Woo SY, Kim DH, Jun CB, Kim YM, Haar EV, Lee SI, Hegg JW, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *J Biol Chem.* 2007 ;282(35):25604-12.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006;124:471–484.

Xin YH, Bian BS, Yang XJ, Cui W, Cui HJ, Cui YH, Zhang X, Xu C, Bian XW. POU5F1 Enhances the Invasiveness of Cancer Stem-Like Cells in Lung Adenocarcinoma by Upregulation of MMP-2 Expression. *PLoS One.* 2013 Dec 30;8(12):e83373. doi: 10.1371/journal.pone.0083373.PMID:24386189

Yamamoto, T. 2003. Potential roles of CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 in the pathogenesis of cutaneous sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 21:369–375

Yoshida, S., A. Yoshida, H. Matsui, Y. Takada, and T. Ishibashi. 2003. Involvement of macrophage chemotactic protein-1 and interleukin-1beta during inflammatory but not basic fibroblast growth factor-dependent neovascularization in the mouse cornea. *Lab. Invest.* 83:927–938.

Yu J, Astrinidis A, Henske EP. Chromosome 16 loss of heterozygosity in tuberous sclerosis and sporadic lymphangioleiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164:1537-1540.

Yu J, Robb VA, Morrison TA, Ariazi EA, Karbowniczek M, Astrinidis A, Wang C, Hernandez-Cuebas L, Seeholzer LF, Nicolas E, Hensley H, Jordan VC, Walker CL, Henske EP. Estrogen promotes the survival and pulmonary metastasis of tuberin-null cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106(8):2635-40

# FIGURE

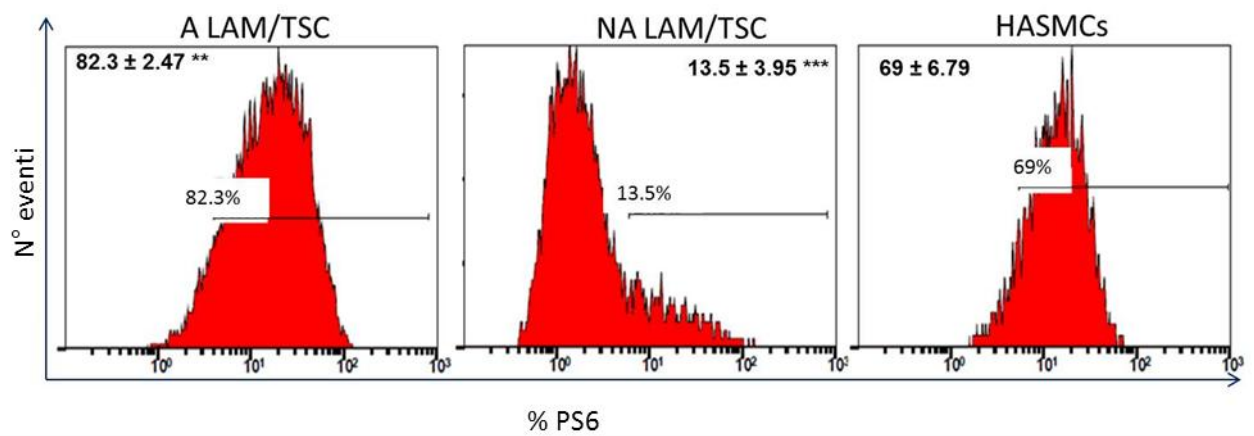


Fig 1. Analisi citofluorimetrica della percentuale di cellule LAM/TSC positive alla PS6. (A: cellule LAM/TSC adese, NA: cellule LAM/TSC non adese).

Test t-Student \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs HASMCs

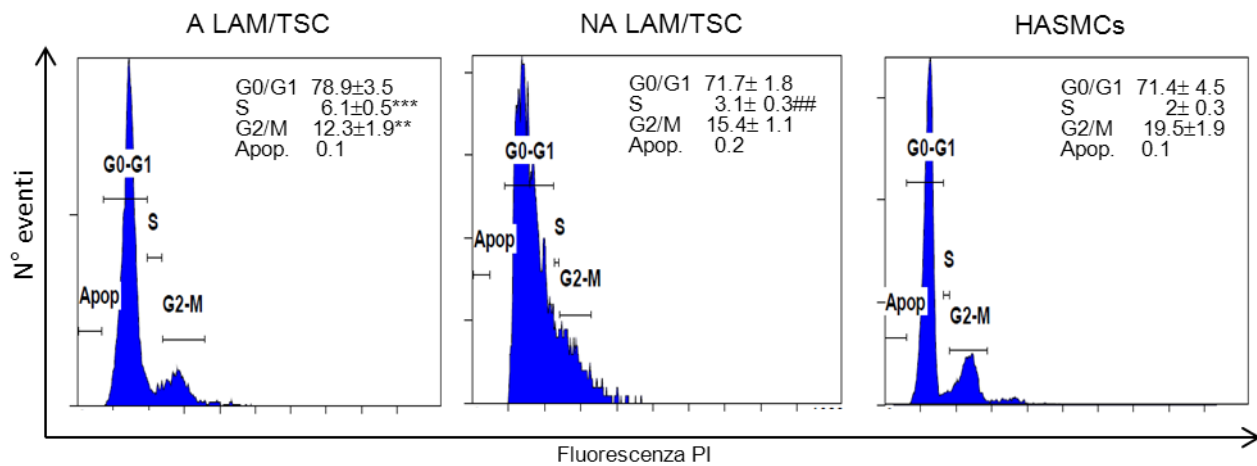


Fig 2. Valutazione del ciclo cellulare e percentuale di distribuzione mediante analisi di citofluorimetria nelle cellule LAM/TSC nello stato di adesione (A) e sospensione (NA) e nelle cellule HASMCs.

Test t-Student \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs HASMCs; ### $p < 0,01$ , vs cellule LAM/TSC adese

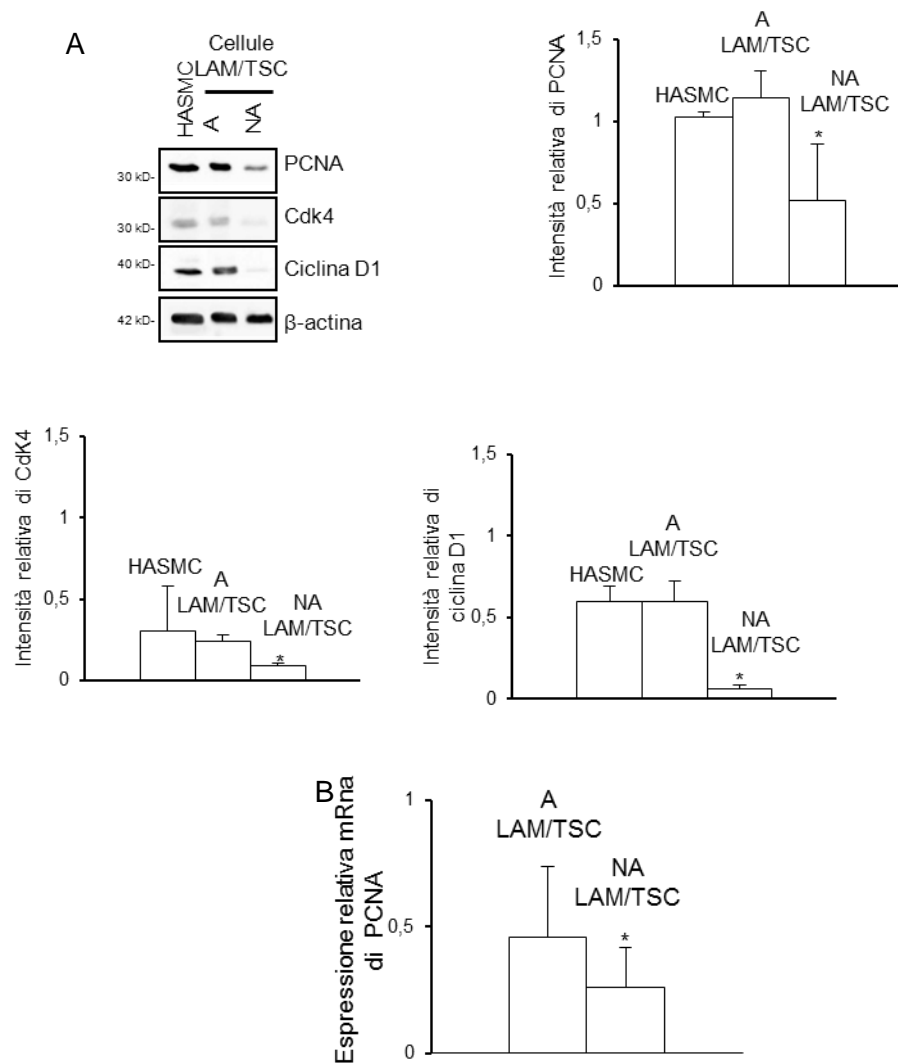
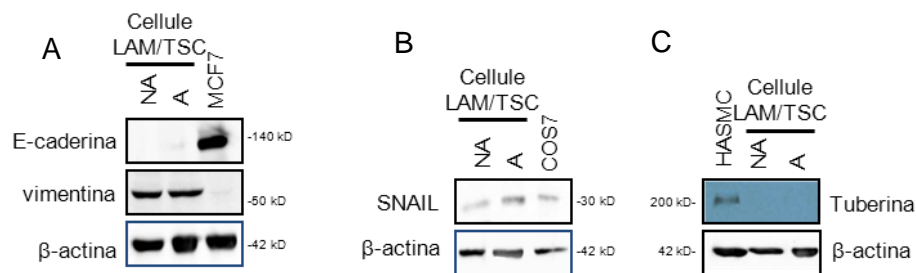


Fig 3. A) Valutazione della ciclina D1, della Cdk4 e di PCNA nelle cellule LAM/TSC adese, sospese e delle HASMCs mediante western blotting e relativa analisi quantitativa (optical density: OD).

Anova test  $p$  value:  $*p < 0,05$  vs C di ciascun gruppo

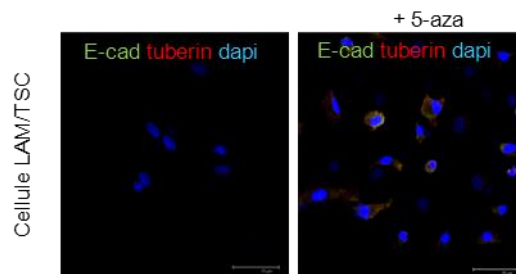
B) Valutazione dell'espressione dell'mRna di PCNA nelle cellule LAM/TSC adese e sospese. Come calibratore è stata valutata l'espressione di mRna di PCNA nelle cellule HASMCs.

Test  $t$ -Student  $*p < 0,05$  vs cellule LAM/TSC adese

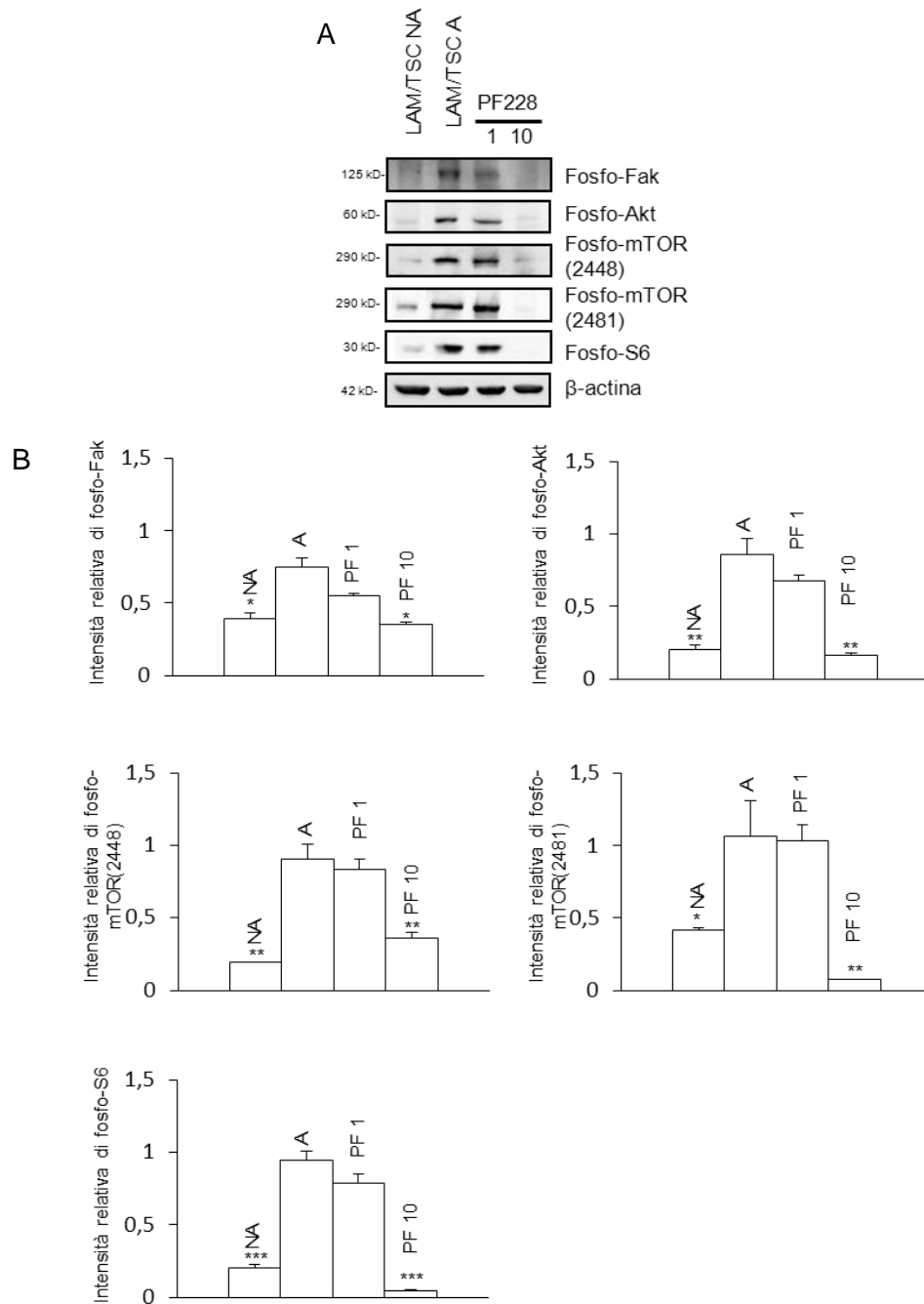


*Fig 4. Le cellule LAM/TSC esprimono marcatori di EMT. (A) Le cellule LAM/TSC sia in fase di adesione che in fase di sospensione non esprimono E-caderina che è presente nelle cellule MCF-7 utilizzate come controllo. Vimentina è espressa in entrambi gli stati ma non è presente nelle cellule MCF-7.  $\beta$ -actina è stata usata come controllo del caricamento dei campioni. (B) SNAIL è presente sia nelle cellule in fase di adesione che in quelle in fase di sospensione così come nelle cellule COS7 utilizzate come controllo.  $\beta$ -actina è stata valutata come controllo del caricamento dei campioni. (C) Tubarina non è espressa nelle cellule LAM/TSC in fase di adesione e di sospensione, ma solo nelle cellule HAM5C utilizzate come controllo. I livelli di  $\beta$ -actina sono utilizzati come controllo del caricamento dei campioni.*





*Fig 5. Immagine rappresentativa delle cellule LAM/TSC marcate con E-caderina (verde), tuberina (rosso), tramite immunofluorescenza, prima e dopo il trattamento con la 5-azacitidina (AZA, 1 $\mu$ M per 96h) che induce l'espressione di tuberina. I nuclei delle cellule sono stati marcati con dapi (blu).*



**Fig 6. (A) Valutazione tramite western blotting dell'espressione di FAK e della cascata correlata, la fosforilazione di Akt, mTOR e S6, nelle cellule LAM/TSC in fase di adesione e in fase di sospensione e in seguito all'incubazione con l'inibitore di FAK, PF228 (1 e 10  $\mu$ M). La  $\beta$ -actina è stata usata come controllo del caricamento dei campioni.**

**(B) Analisi quantitativa (optical density: OD) dei livelli di fosforilazione di FAK, Akt, mTOR e S6 nelle cellule LAM/TSC sospese e adese in seguito ad incubazione con PF228.**

**Anova test p value: \*  $p < 0,05$  , \*\*  $p < 0,01$  , \*\*\*  $p < 0,001$  vs livelli proteici delle cellule LAM/TSC di ciascun gruppo.**

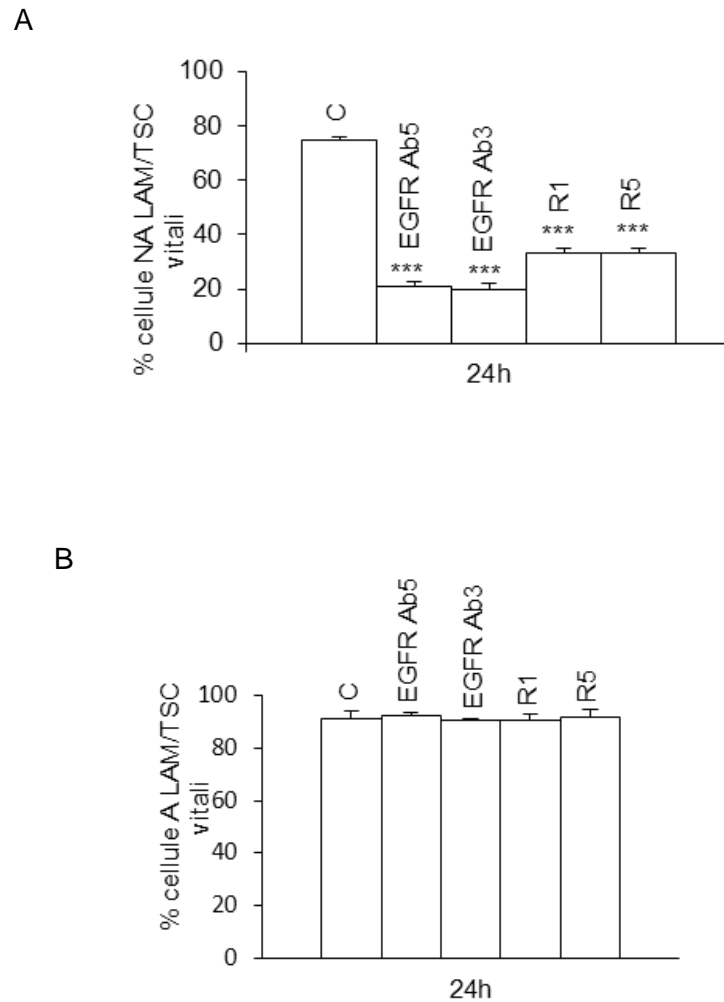
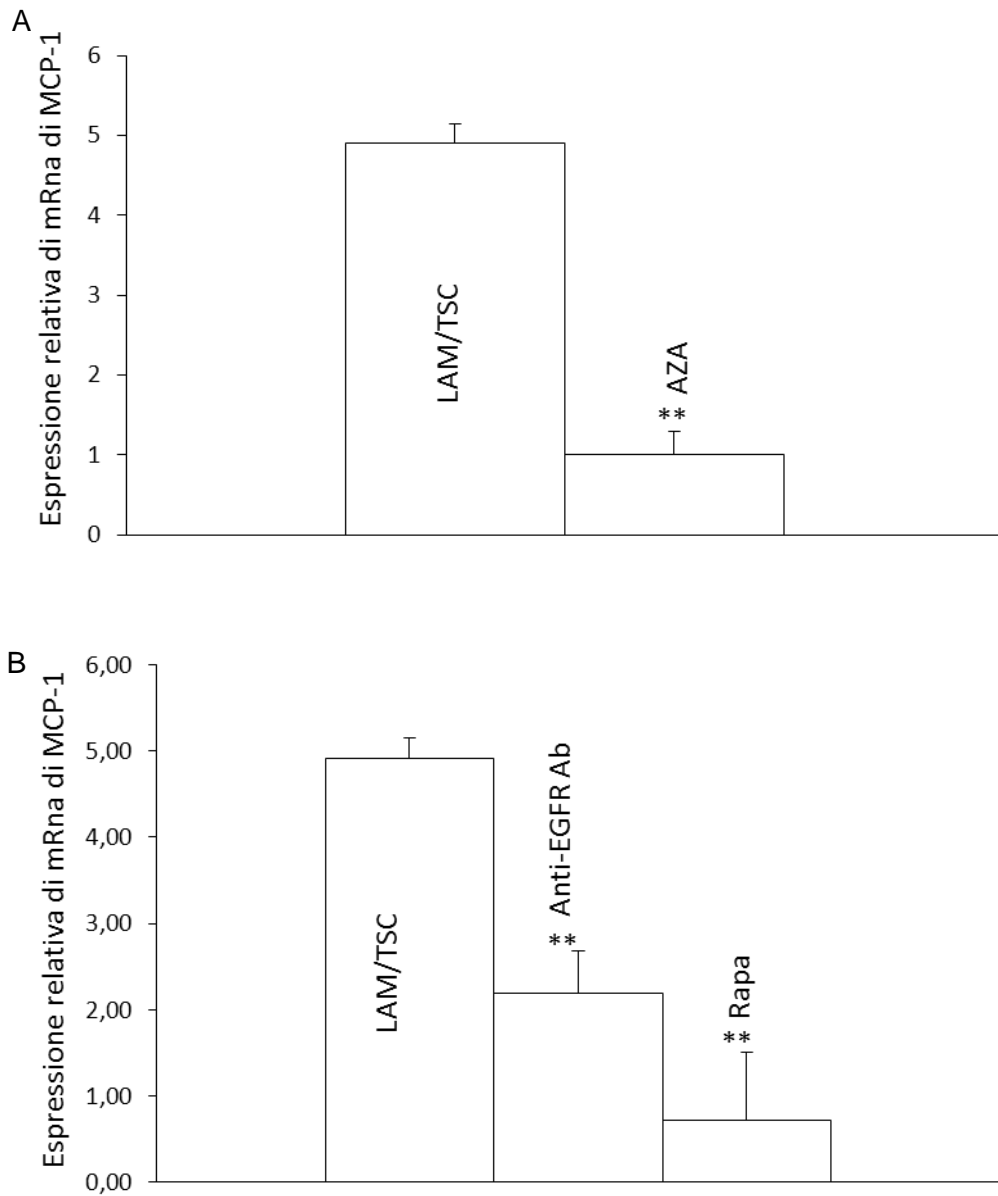


Fig 7. (A) Percentuale delle cellule LAM/TSC vitali in fase di sospensione e (B) di adesione mediante il saggio con Trypan blu, e dopo il trattamento con la rapamicina alle concentrazioni di 1 (1) o 5 (5) ng/ml e con l'anticorpo anti-EGFR ( EGFR Ab3 e EGFR Ab5, 5  $\mu$ g/ml).

ANOVA test p-value: \*\*\* $p < 0,001$  vs cellule LAM/TSC control



*Fig 8. Valutazione dell' RNA messaggero di MCP-1 (A) nelle cellule LAM/TSC mediante real-time PCR in seguito al trattamento con la 5-azacitidina (AZA, 1 $\mu$ M per 96h) e (B) in seguito all'incubazione con anticorpo anti-EGFR (Anti-EGFR, 5 $\mu$ g/ml per 48h) e rapamicina (Rapa, 5ng/ml per 48h). Come calibratore interno è stata considerata l'espressione dell' mRNA delle cellule LAM/TSC che esprimono tuberina a seguito del trattamento con la 5-azacitidina.*

*Test t-Student \*\*p<0,01 vs cellule LAM/TSC*

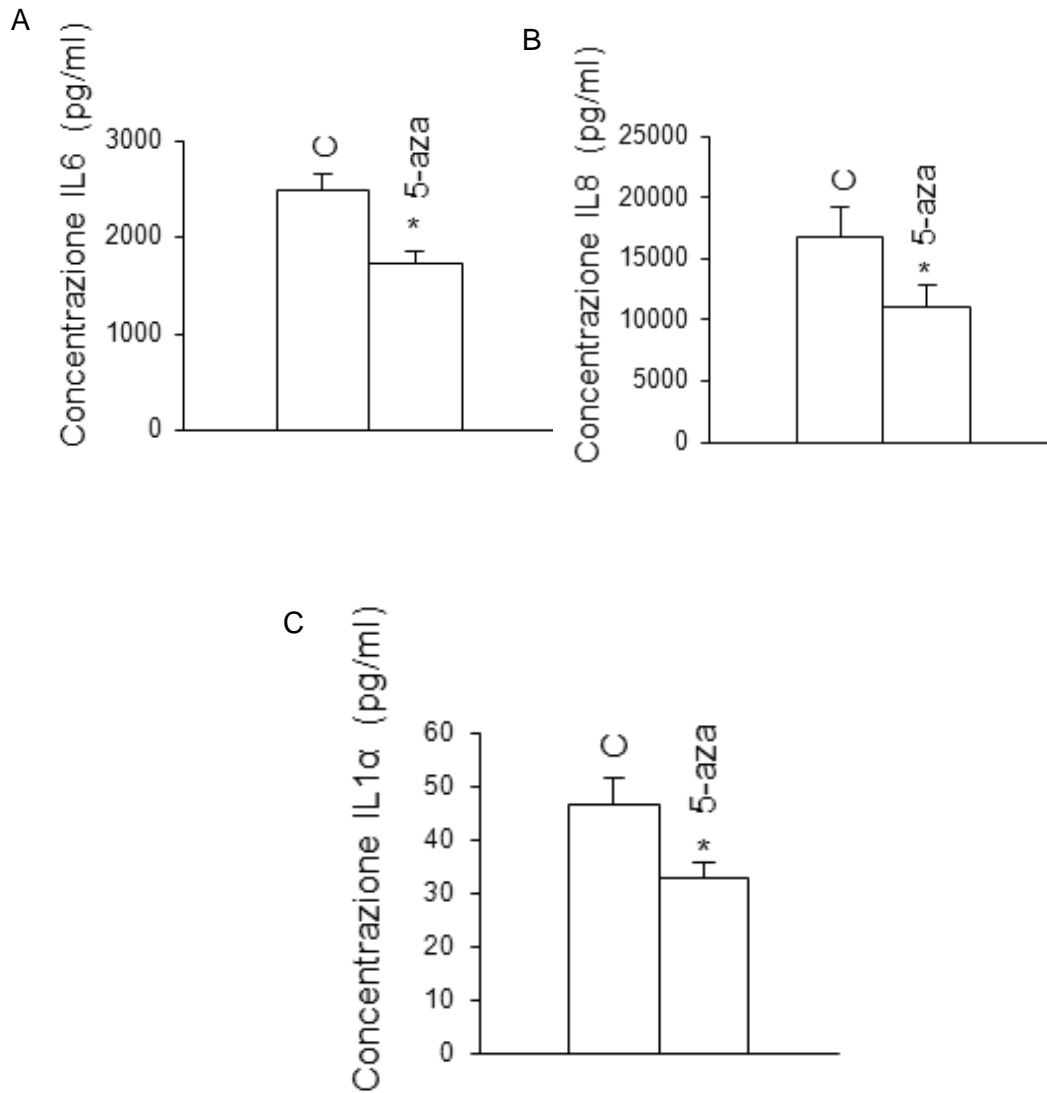


Fig 9. Valutazione della secrezione di IL-6 (A), IL-8 (B) e IL-1 $\alpha$  (C) mediante test immunoenzimatico nelle cellule LAM/TSC e nelle cellule LAM/TSC che esprimono tuberina a seguito del trattamento con la 5-azacitidina (5-Aza, 1 $\mu$ M per 96h).

Test t-Student \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs cellule LAM/TSC.

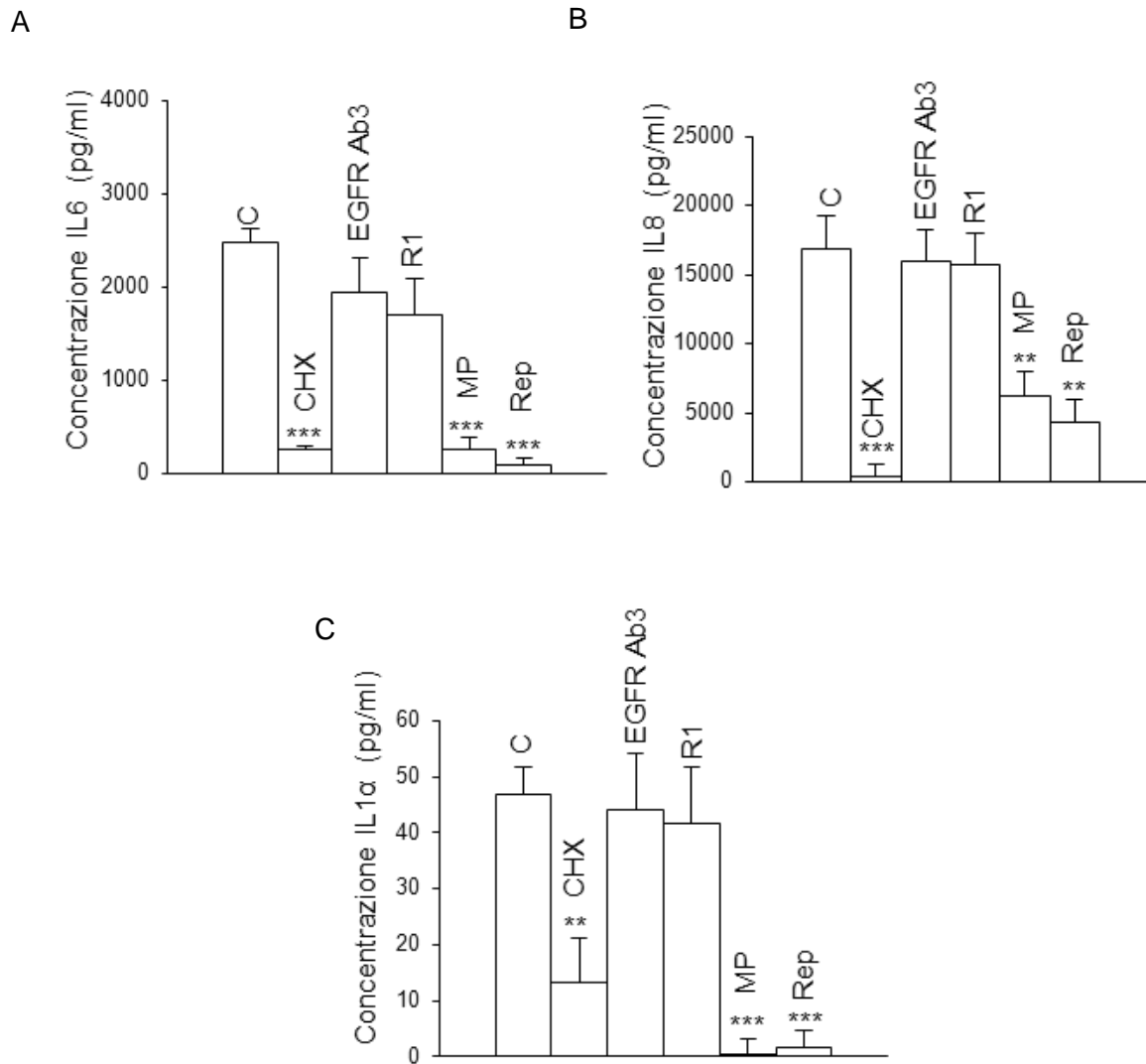


Fig 10. Valutazione della secrezione di IL-6 (A), IL-8(B) e IL-1α (C) a seguito del trattamento con l'anticorpo anti-EGFR( EGFR Ab3, 5µg/ml per 96h), la rapamicina (R1, 1ng/ml per 48h), il metilprednisolone (MP, 10nM overnight) e il repertaxin (Rep, 1nM overnight) mediante test immunoenzimatico nelle cellule LAM/TSC. ANOVA test p-values: \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 vs cellule LAM/TSC controllo.

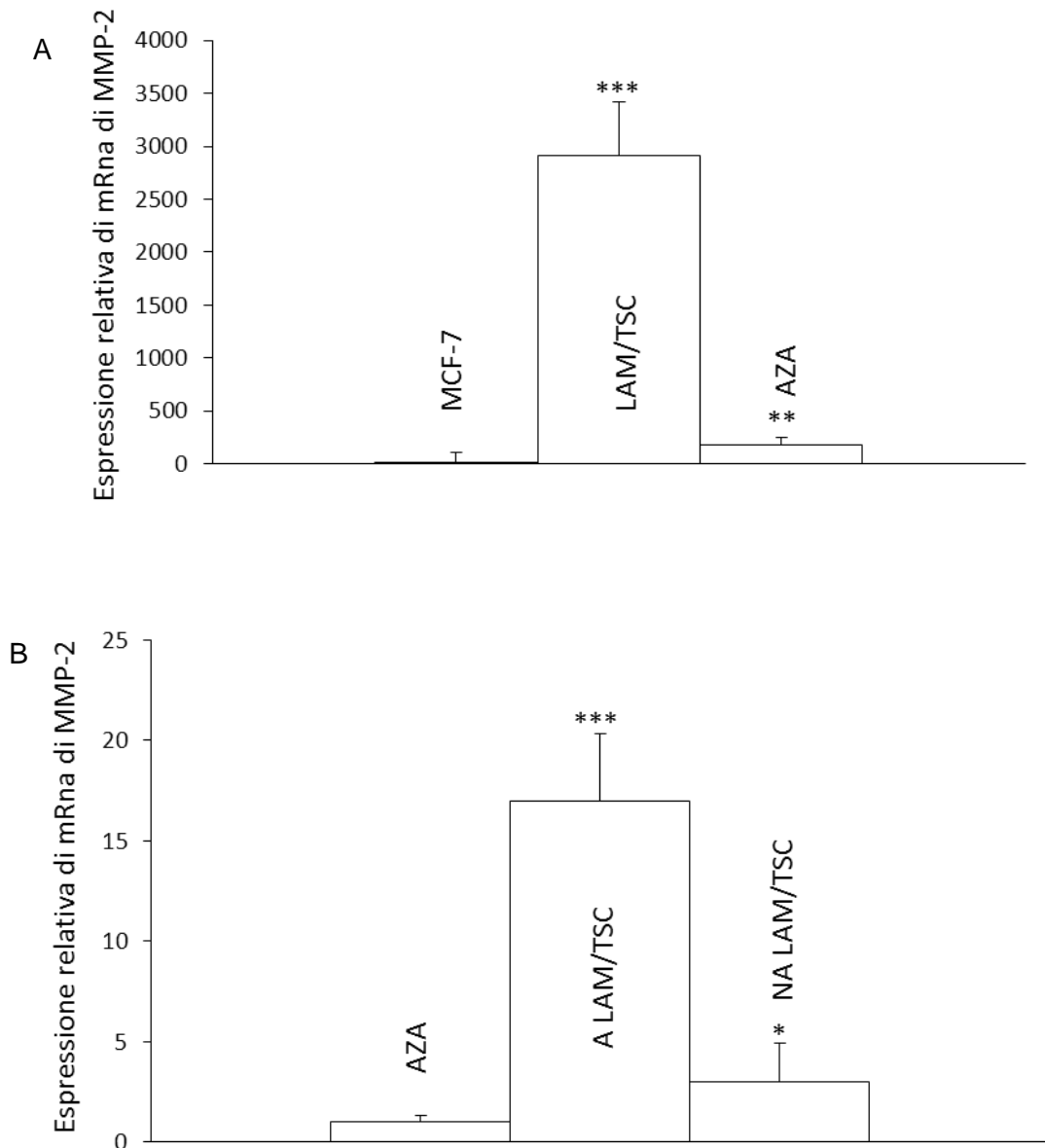


Fig 11.(A)Valutazione dell' RNA messaggero della MMP-2 nelle cellule LAM/TSC a seguito del trattamento con la 5-azacitidina (Aza, 1 $\mu$ M per 96h) mediante real-time PCR utilizzando come calibratore i livelli di mRNA delle MMP-2 delle cellule MCF7.

Test t-Student \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs MCF-7

(B) Valutazione dell' RNA messaggero della MMP-2 nelle cellule LAM/TSC in fase di adesione e in fase di sospensione mediante real-time PCR utilizzando come calibratore i livelli di mRNA di MMP-2 presenti nelle cellule che esprimono tuberina a seguito del trattamento con la 5-azacitidina.

Test t-Student \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs cellule LAM/TSC che esprimono tuberina a seguito del trattamento con 5-azacitidina (Aza).

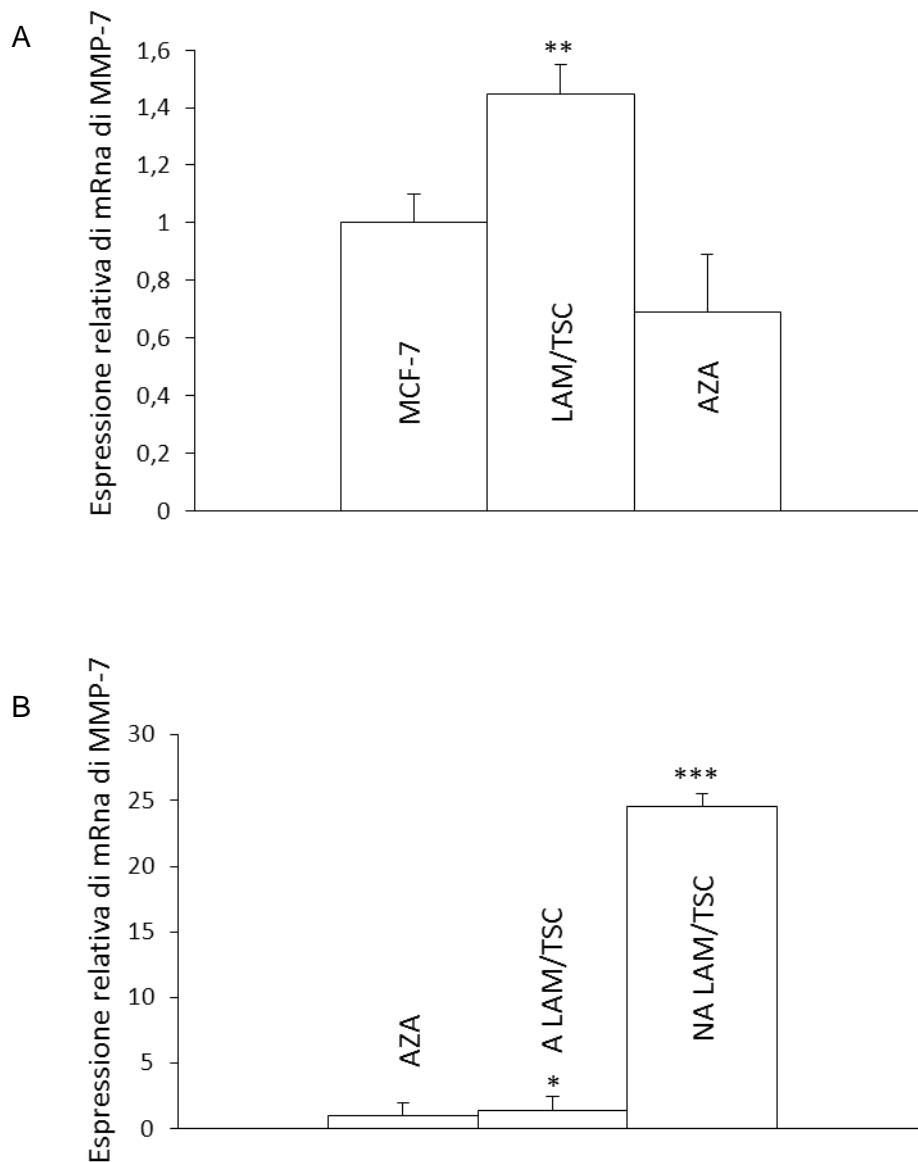


Fig 12.(A) Valutazione dell' RNA messaggero di MMP-7 nelle cellule LAM/TSC e in seguito al trattamento con la 5-azacitidina (Aza, 1 $\mu$ M per 96h) mediante real-time PCR. I livelli di mRNA delle cellule MCF7 sono stati utilizzati come calibratore (=1).

Test t-Student \*\* $p < 0,01$  vs MCF-7

(B) Valutazione dell' RNA messaggero di MMP-7 nelle cellule LAM/TSC in fase di adesione(A LAM/TSC) e di sospensione (NA LAM/TSC) valutata mediante real-time PCR utilizzando come calibratore le cellule LAM/TSC che esprimono tuberina a seguito del trattamento con la 5-azacitidina (Aza).

Test t-Student \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs cellule LAM/TSC che esprimono tuberina a seguito del trattamento con 5-azacitidina.



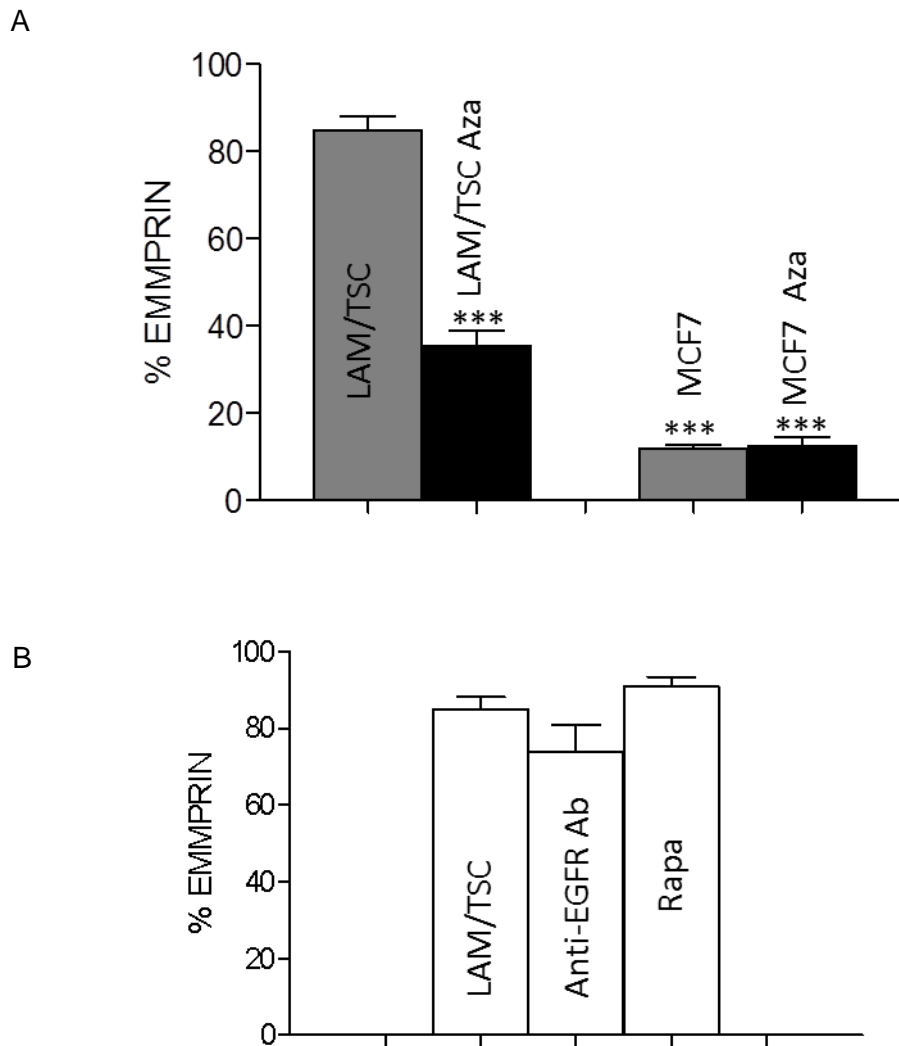


Fig 13. (A) Quantificazione mediante il software CXP 2.2 della percentuale di EMMPRIN nelle cellule LAM/TSC, nelle cellule MCF7 e nelle stesse popolazioni cellulari (A) in seguito al trattamento con la 5-azacitidina (Aza, 1 $\mu$ M per 96h) e (B) nelle cellule LAM/TSC in seguito al trattamento con l'anticorpo anti-EGFR (5 $\mu$ g/ml per 48h) e la rapamicina (5ng/ml per 48h)

Test t-Student \*\*\* $p < 0,001$  vs cellule LAM/TSC

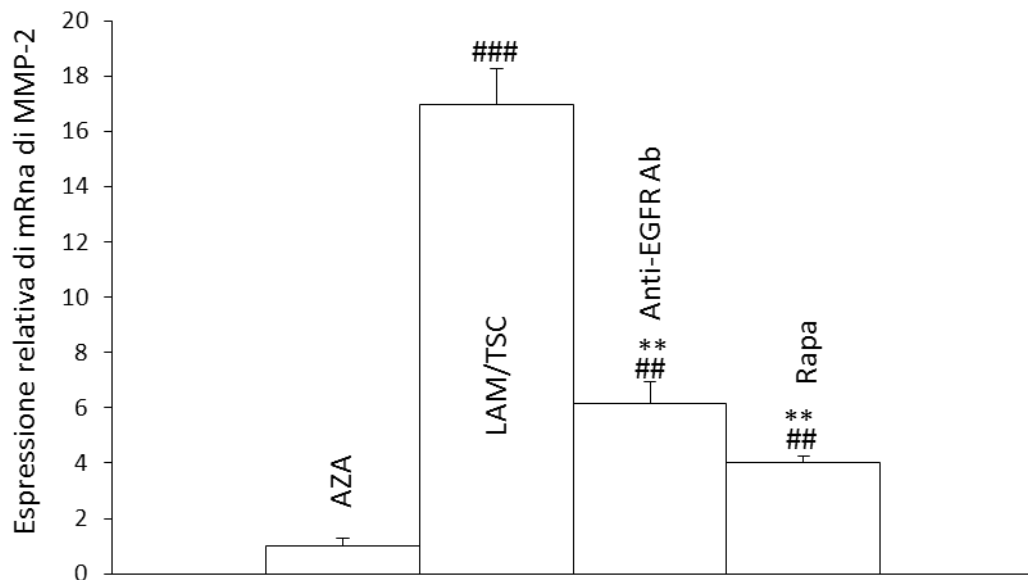


Fig 14. Valutazione dell' RNA messaggero della MMP-2 nelle cellule LAM/TSC in seguito al trattamento con l'anticorpo anti-EGFR (5 $\mu$ g/ml per 48h) e la rapamicina (5ng/ml per 48h) mediante real-time PCR. L' mRNA delle MMP-2 delle cellule LAM/TSC incubate con la 5-azacitidina (1 $\mu$ M per 96h) per indurre l'espressione di tuberina è stato utilizzato come calibratore.

Test t-Student \*\* $p < 0,01$  vs livelli di mRNA delle MMP-2 delle cellule LAM/TSC controllo  
 ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  vs LAM/TSC che esprimono tuberina in seguito al trattamento con la 5-azacitidina (Aza).

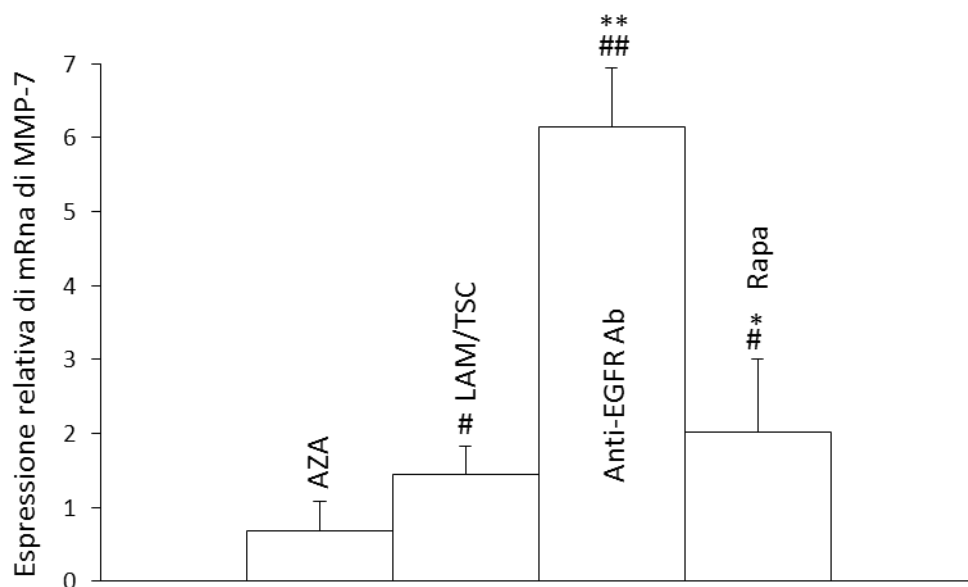


Fig 15. Valutazione dell' RNA messaggero a seguito del trattamento con l'anticorpo anti-EGFR (5µg/ml per 48h) e la rapamicina (5ng/ml per 48h) mediante real-time PCR. L' mRNA delle MMP-2 delle cellule LAM/TSC incubate con la 5-azacitidina (Aza, 1µM per 96h) per indurre l'espressione di tuberina è stato utilizzato come calibratore.

Test t-Student \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs livelli di mRNA delle MMP-2 delle cellule LAM/TSC controllo

#p<0,05, ## p<0,01 vs livelli di mRNA della MMP-2 delle LAM/TSC che esprimono tuberina in seguito al trattamento con la 5-azacitidina (Aza).

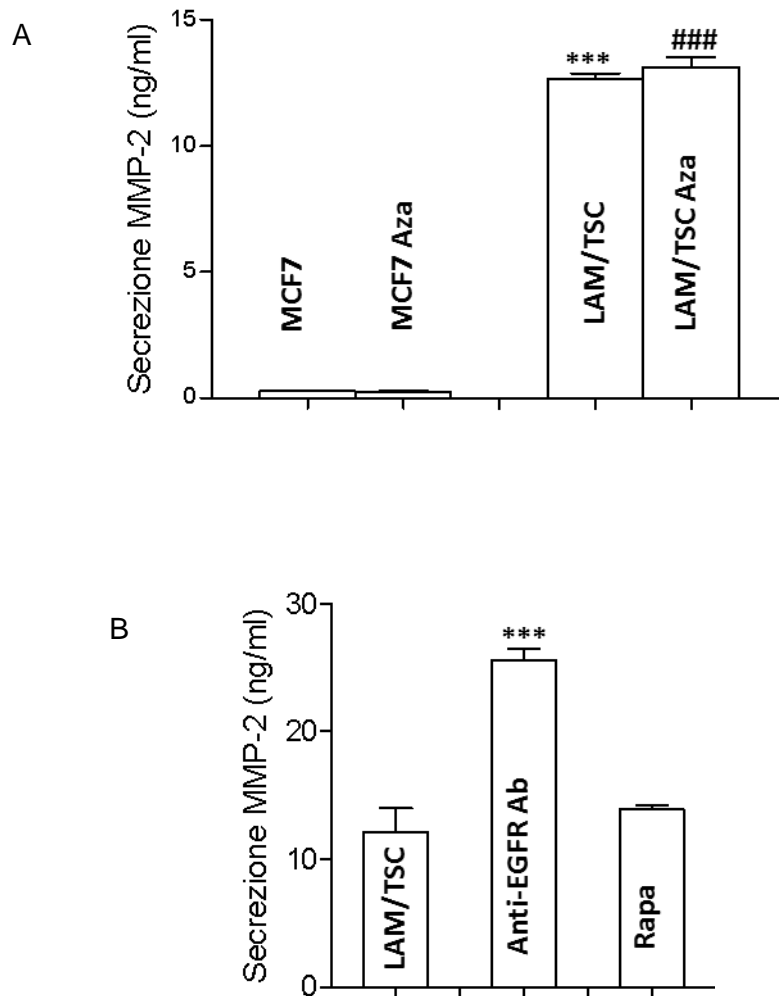


Fig 16. (A) Valutazione tramite ELISA dei livelli di secrezione della MMP-2 nelle cellule LAM/TSC e nelle cellule tumorali MCF7 a seguito dell'incubazione con 5-azacitidina (1 $\mu$ M per 96h) .

Test t-Student \*\*\* $p < 0,001$  vs cellule MCF7 controllo, ###  $p < 0,001$  vs cellule MCF7 in seguito al trattamento con 5-azacitidina

(B) Valutazione dei livelli di secrezione della MMP-2 nelle cellule LAM/TSC controllo e a seguito dei trattamenti con l'anticorpo anti-EGFR (5 $\mu$ g/ml per 48h) e con la rapamicina (5ng/ml per 48h).

Test t-Student \*\*\* $p < 0,001$  vs cellule LAM/TSC

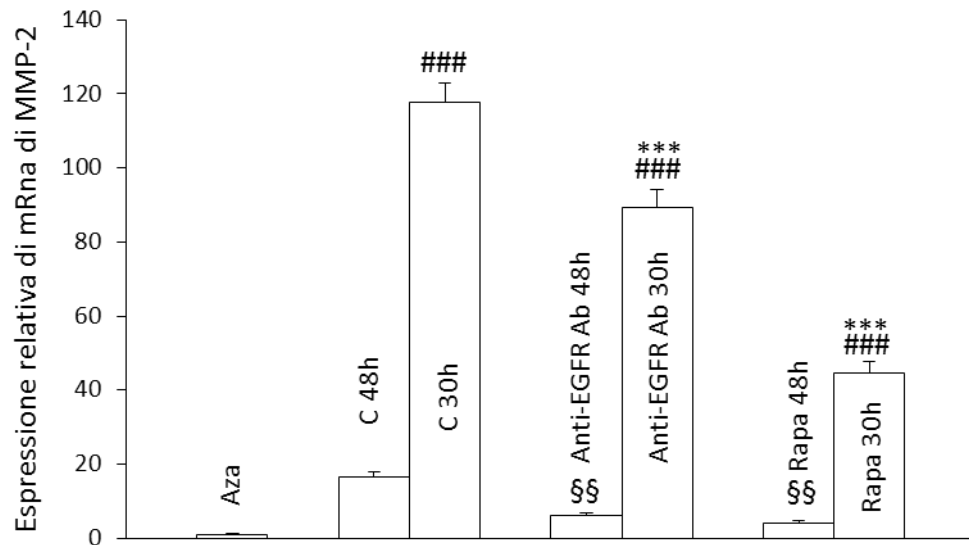


Fig 17. Valutazione dell' RNA messaggero delle MMP-2 nelle cellule LAM/TSC in seguito alla sospensione del trattamento (30 h) mediante real-time PCR utilizzando come calibratore i livelli di mRNA delle MMP-2 delle cellule incubate con 5-azacitidina (Aza, 1 $\mu$ M per 96h).

Test t-Student \*\*\* $p < 0,001$  vs cellule LAM/TSC controllo 30h dopo il cambio terreno (C30h)

### $p < 0,001$  vs livelli di mRNA ottenuti al termine del trattamento di ciascun gruppo

§§  $p < 0.01$  vs livelli di mRNA delle cellule LAM/TSC controllo

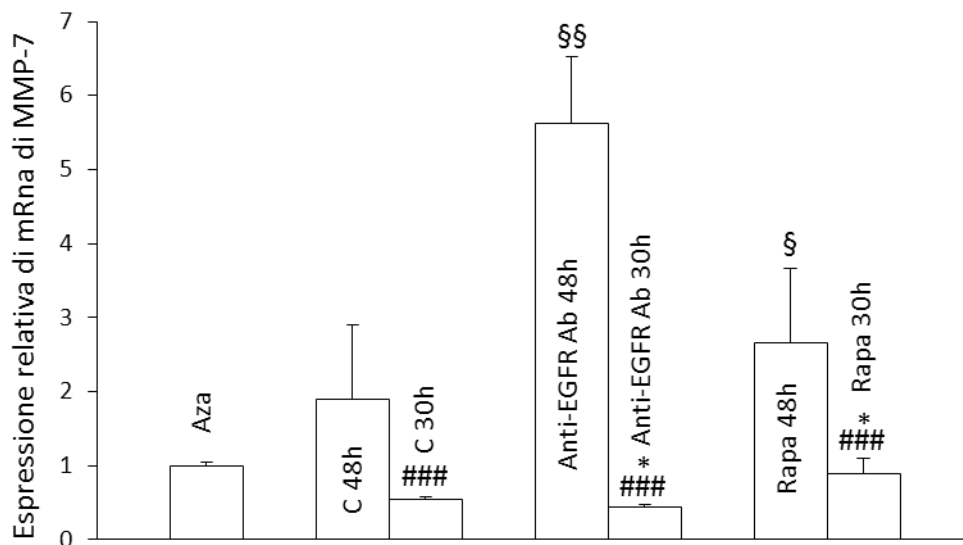


Fig 18. Valutazione dell' RNA messaggero delle MMP-2 nelle cellule LAM/TSC in seguito alla sospensione del trattamento (30 h) mediante real-time PCR utilizzando come calibratore i livelli di mRNA delle MMP-2 delle cellule incubate con 5-azacitidina (Aza, 1 $\mu$ M per 96h).

Test t-Student \* $p < 0,05$  vs cellule LAM/TSC controllo 30h dopo il cambio terreno (C30h)

### $p < 0,001$  vs livelli di mRNA ottenuti al termine del trattamento di ciascun gruppo

§ $p < 0,05$ , §§ $p < 0,01$  vs livelli di mRNA delle cellule LAM/TSC controllo

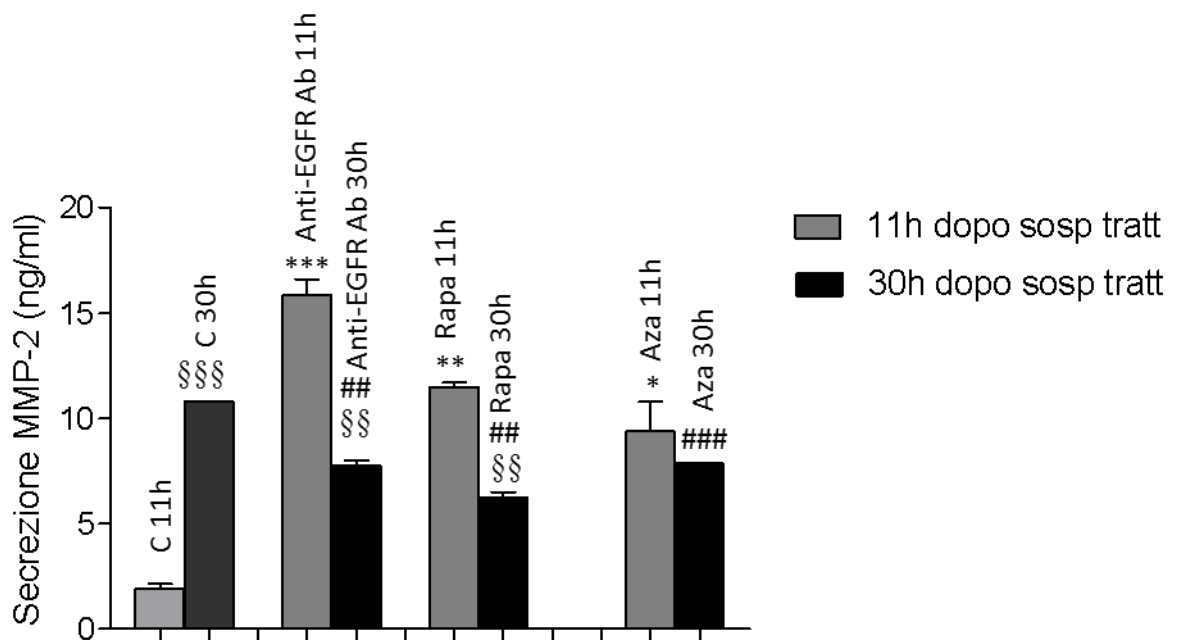


Fig 19. Valutazione dei livelli di secrezione della MMP-2 tramite ELISA nelle cellule LAM/TSC 11h e 30h dopo la sospensione del trattamento con anticorpo anti-EGFR (5µg/ml per 48h) e rapamicina (5ng/ml per 48h) e 5-azacitidina (1µM per 96h).

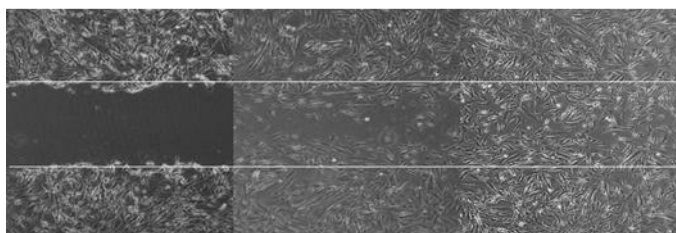
Test t-Student \* $p > 0,05$ , \*\* $p > 0,01$ , \*\*\* $p > 0,001$  vs i livelli di secrezione di MMP-2 in 11h nelle cellule LAM/TSC controllo

##  $p > 0,01$  , ###  $p > 0,001$  vs i livelli di secrezione di MMP-2 in 30h nelle cellule LAM/TSC controllo

§§  $p > 0,01$ , §§§  $p > 0,001$  vs i livelli di secrezione di MMP-2 11h dopo la sospensione del trattamento di ciascun gruppo sperimentale

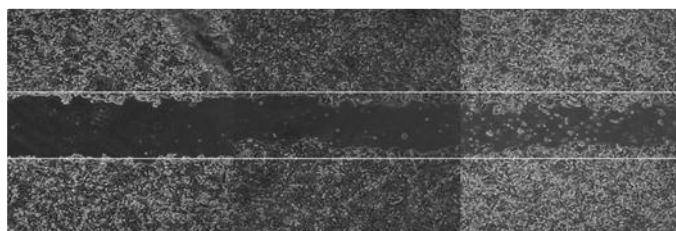
A LAM/TSC

T0 9ore 11ore



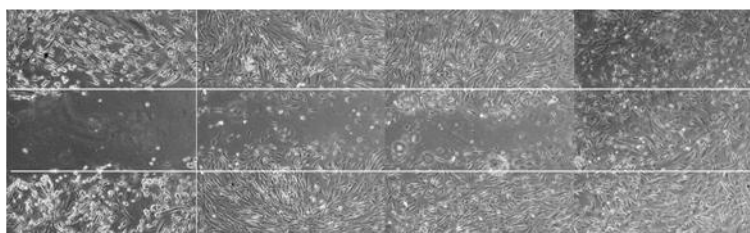
MCF7

T0 11ore 40ore



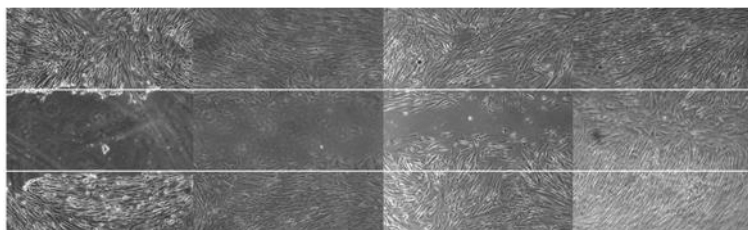
Rapamicina

T0 9ore 11ore 25ore



Anti-EGFR Ab

T0 9ore 11ore 25ore





5-azacitidina

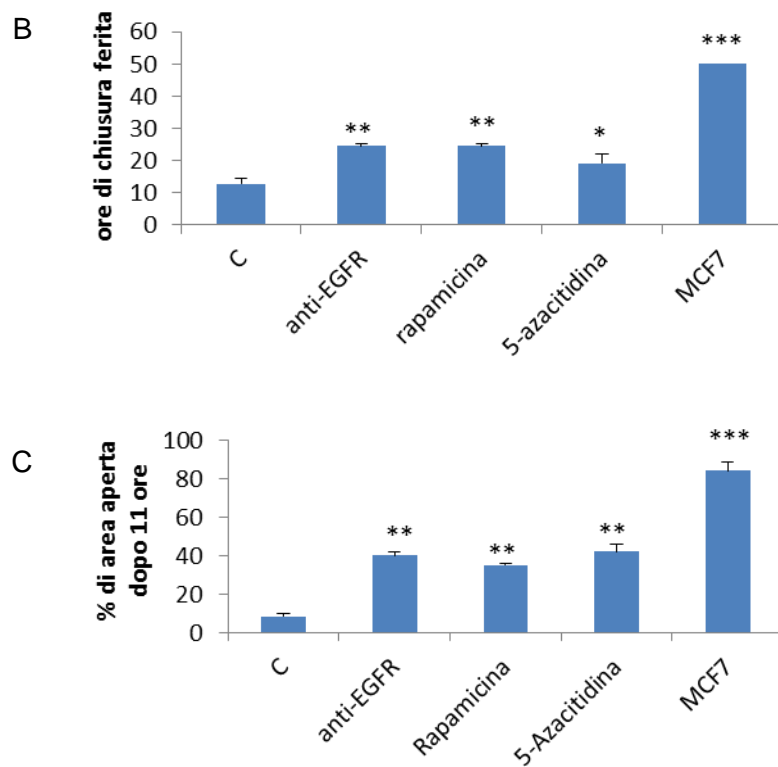
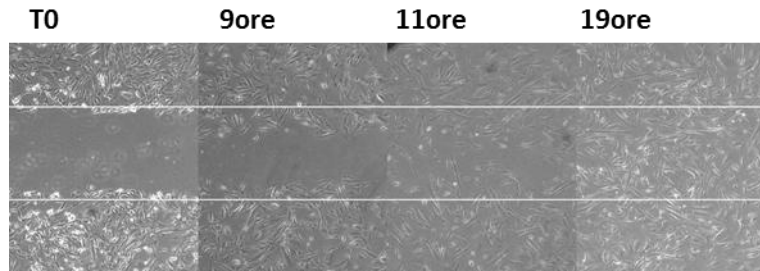


Fig 20.(A) Valutazione della capacità migratoria delle cellule LAM/TSC mediante il saggio di wound healing nelle cellule LAM/TSC, nelle cellule tumorali MCF7 e nelle cellule LAM/TSC a seguito del trattamento con la rapamicina (5ng/ml per 48h), con l'anticorpo anti-EGFR 5µg/ml per 48h) e con la 5-azacitina (1µM per 96h).

(B) Quantificazione della capacità migratoria delle cellule LAM/TSC espressa in ore necessarie a chiudere la ferita e (C) percentuale di area "aperta" dopo 11 ore dalla ferita.

Test t-Student \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs cellule LAM/TSC controllo (C)

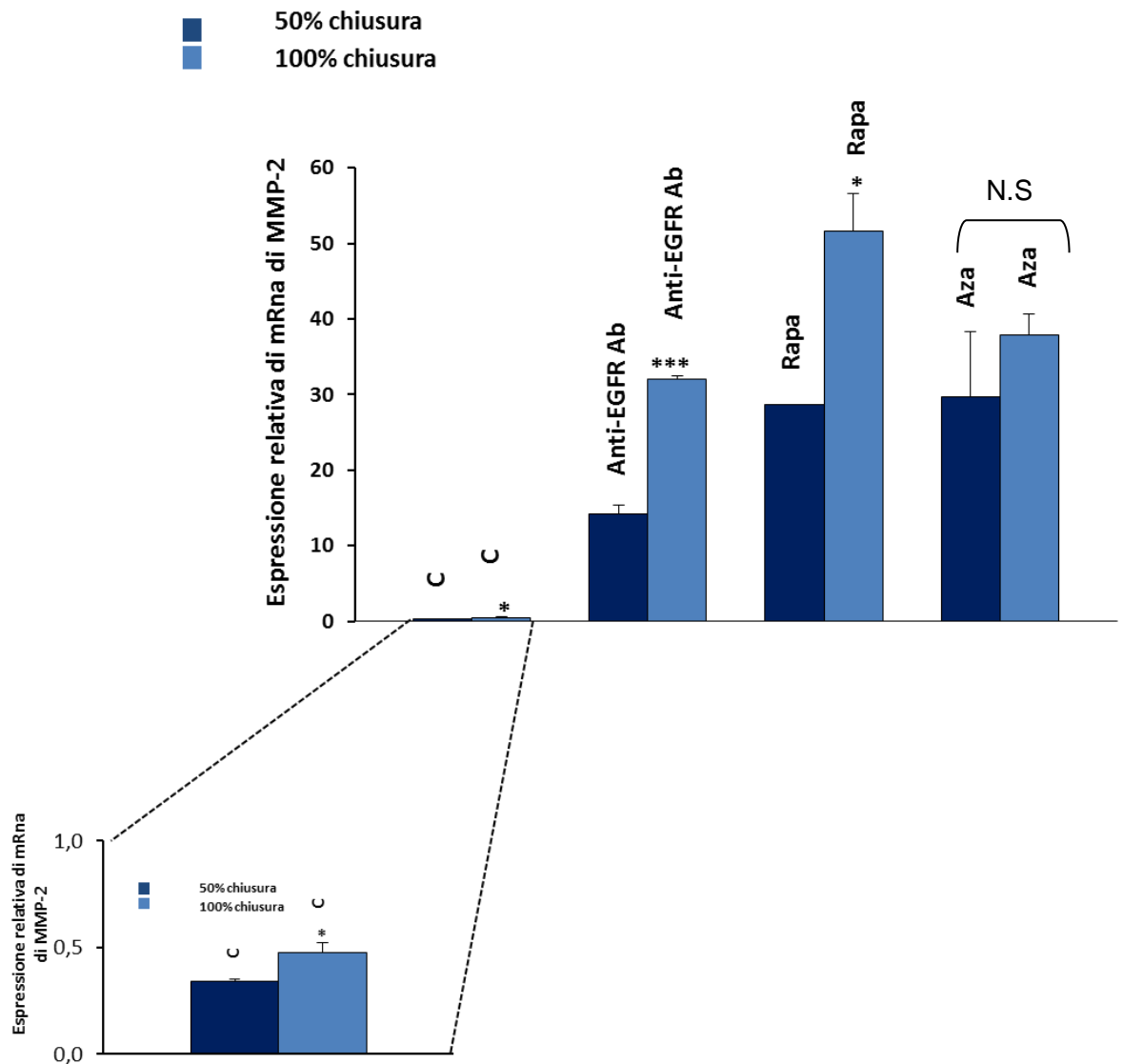


Fig 21. Valutazione dell' RNA messaggero della MMP-2 mediante real-time PCR al 50% e al 100% della chiusura della ferita durante il wound healing, in seguito al trattamento con l'anticorpo anti-EGFR (5 $\mu$ g/ml per 48h), la rapamicina (5ng/ml per 48h) e la 5-azacitidina (1 $\mu$ M per 96h). Come calibratore interno è stata considerata l'espressione dell' mRNA di ciascun gruppo a fine trattamento farmacologico, prima della ferita.

Test t-Student \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs mRNA valutato al 50% della chiusura della ferita all'interno di ciascun gruppo sperimentale.

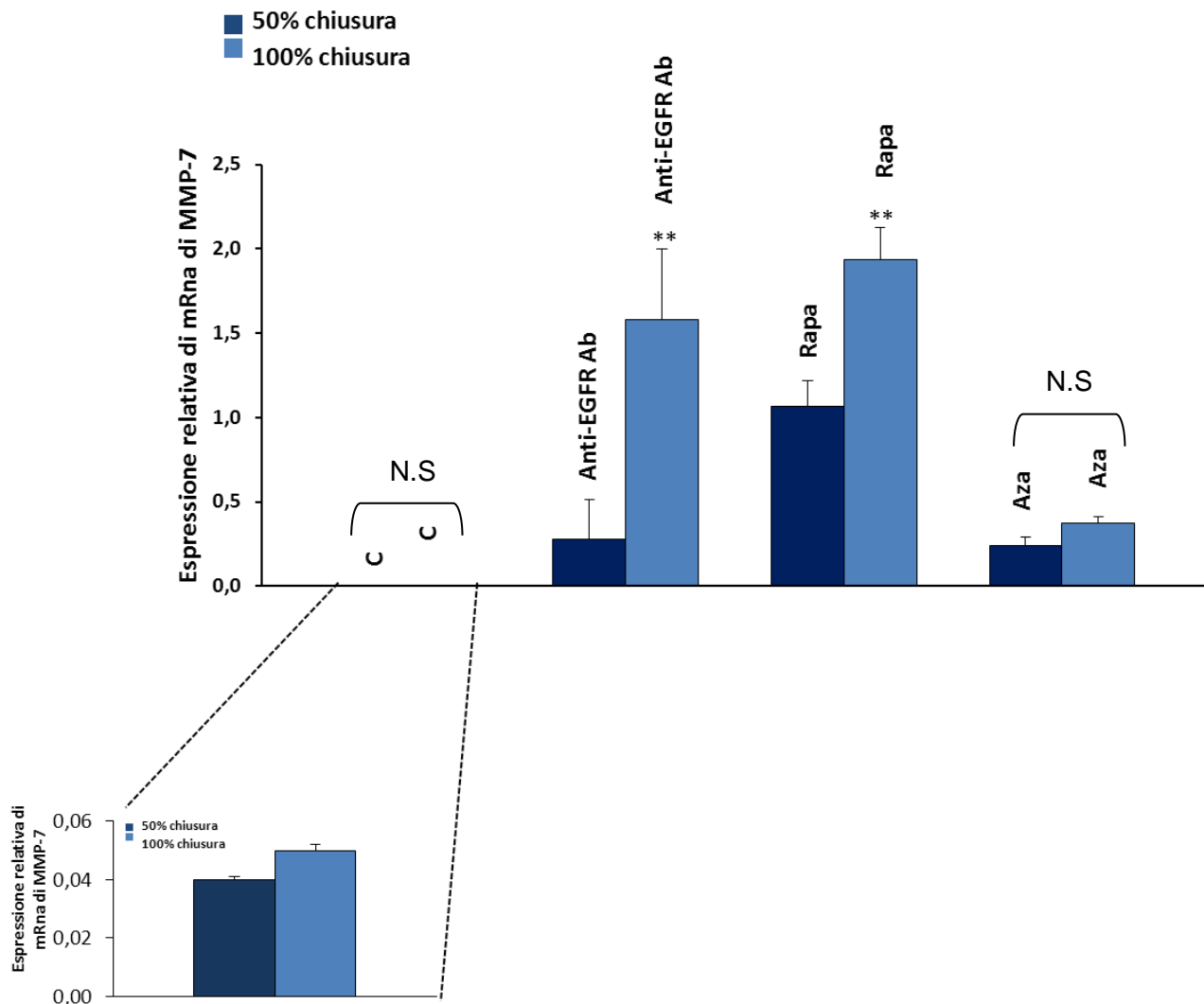


Fig 22. Valutazione dell' RNA messaggero della MMP-7 mediante real-time pcr misurato al 50% e al 100% della chiusura della ferita durante wound healing in seguito al trattamento con l'anticorpo anti-EGFR (5µg/ml per 48h), la rapamicina (5ng/ml per 48h) e la 5-azacitidina (1µM per 96h). Come calibratore interno è stata considerata l'espressione dell' mRNA di ciascun gruppo a fine trattamento farmacologico prima della ferita.

Test t-Student \*\*p<0,01 vs l'mRna misurato al 50% della chiusura della ferita all'interno di ciascun gruppo sperimentale

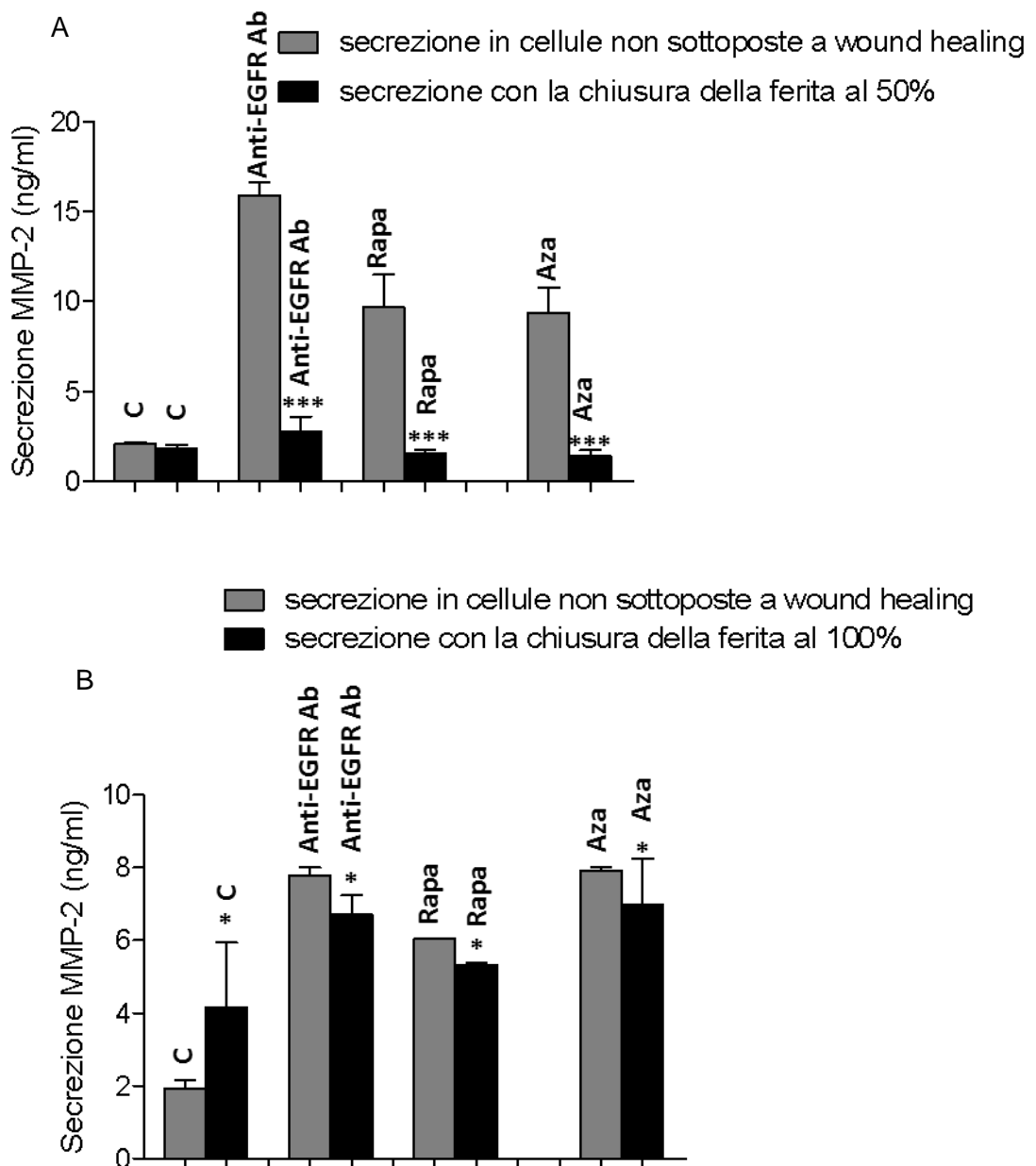


Fig 23. Valutazione della secrezione della MMP-2 nelle cellule LAM/TSC durante il wound healing con una chiusura della ferita (A) al 50% (8h per le cellule controllo e 11h per le cellule sottoposte a trattamento farmacologico) e (B) del 100% (11h per le cellule controllo e 30h per le cellule sottoposte a trattamento) e agli stessi tempi in cellule LAM/TSC non sottoposte a wound healing.

Test t-Student \* $p < 0,05$  , \*\*\* $p < 0,001$  vs i livelli di MMP-2 di cellule LAM/TSC non sottoposte a wound healing