

Università degli Studi di Milano-Bicocca

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina Sperimentale

Laboratorio di Patologia Generale

Corso di Dottorato in Tecnologie Biomediche (Ciclo XXIV)



**CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E FUNZIONALE DELLA
LISIL OSSIDASI (LOX) MEDIANTE SILENZIAMENTO GENICO IN
COLTURE CELLULARI PRIMARIE UMANE DI CORTEX E
CARCINOMA RENALE (RCC)**

Coordinatore: Prof.ssa Marina DEL PUPPO

Tutore: Dott.ssa Cristina BIANCHI

Co-Tutore: Prof. Roberto PEREGO

TESI DI DOTTORATO di
Dott.ssa Vitalba DI STEFANO
Matr. 707610

Anno accademico 2010-2011

INDICE

INDICE DELLE FIGURE E DELLE TABELLE	4
ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI	10
RIASSUNTO	12
INTRODUZIONE	15
Il pathway della pVHL	15
Regolazione di HIF-1 α	15
Geni target di HIF-1 α	16
HIF-1 e regolazione del metabolismo del glucosio.....	17
HIF-1 e angiogenesi (VEGF).....	17
HIF-1, motilità e invasione cellulare.....	18
Struttura e funzione di LOX	20
Attività catalitica di LOX.....	20
Il propeptide LOX regola la secrezione e l'attività dell'enzima LOX.....	21
LOX nello sviluppo embrionale.....	22
Il dominio propeptidico di LOX funge da oncosoppressore.....	23
Pathway molecolari regolati dalla proteina LOX-PP.....	24
Regolazione della β -catenina.....	24
LOX (32kDa) e LOX-PP (18kDa) svolgono un ruolo opposto sul pathway molecolare che promuove la migrazione cellulare.....	25
L'enzima LOX influenza la proliferazione cellulare.....	27
LOX promuove l'invasione e la formazione delle metastasi.....	28
La proteina LOX è coinvolta nella formazione delle nicchie premetastatiche...	30
Altri target della proteina LOX.....	31
LOX reprime l'espressione della E-Caderina.....	31
LOX regola il segnale del fattore di trascrizione di crescita trasformante- β (TGF- β).....	32
Struttura e funzione di S100A4	34
S100A4, motilità ed invasione.....	35
S100A4 e altri target.....	35
S100A4 ed NF-kB.....	35
S100A4 e proteine regolatorie, TGF- β 1 e β -catenina.....	35

MATERIALI E METODI	37
Allestimento di colture primarie da tessuto renale normale e tumorale.....	37
FACS.....	39
Estrazione delle proteine dalle colture.....	40
Estrazione di proteine da medium di coltura.....	41
Dosaggio proteine mediante metodo BCA.....	42
Elettroforesi monodimensionale.....	43
1D-Western Blot.....	44
Estrazione di RNA mediante Trizol.....	45
Estrazione di RNA mediante QIAzol.....	46
Sintesi di cDNA.....	46
PCR Real-time.....	46
Primer e probes.....	47
Condizioni di reazione e analisi dei dati.....	48
Silenziamento genico mediante tecnica dell'RNA interference.....	49
Protocollo dell'RNA interference applicato alle colture primarie umane normali e tumorali.....	51
Saggi funzionali condotti sulle colture primarie dopo silenziamento genico.....	52
Valutazione della vitalità cellulare mediante saggio MTT.....	52
Saggio d'adesione cellulare.....	52
Saggio di migrazione mediante camera Boyden.....	53
Analisi statistica.....	54
SCOPO DELLA RICERCA	55
RISULTATI	57
Caratterizzazione molecolare delle colture primarie renali normali e tumorali.....	57

Valutazione, mediante Real time PCR, del livello di espressione dei trascritti di LOX, S10A4 ed E-caderina nelle colture primarie di carcinoma renale e nella loro controparte normale.....	57
Valutazione, mediante Western Blot, del livello di espressione delle proteine codificate dai trascritti precedentemente analizzati nella colture primarie di carcinoma renale e nella loro controparte normale.....	61
Analisi di pro-LOX, LOX e LOX-PP.....	61
Analisi di S100A4 ed E-Caderina.....	66
Analisi degli effetti molecolari e funzionali del silenziamento genico della lisil ossidasi nelle colture primarie renali normali e tumorali.....	69
Verifica del silenziamento genico della lisil ossidasi.....	69
Effetto molecolare del silenziamento genico di LOX nelle colture primarie renali normali e tumorali.....	70
Effetto del silenziamento genico della lisil ossidasi sulla vitalità cellulare nelle colture primarie normali e tumorali.....	75
Effetto del silenziamento sull'adesione cellulare delle colture primarie normali e tumorali.....	77
Effetto del silenziamento della lisil ossidasi sulla migrazione cellulare valutata con camera di Boyden nelle colture primarie normali e tumorali.....	78
DISCUSSIONE.....	80
BIBLIOGRAFIA.....	87

INDICE DELLE FIGURE E DELLE TABELLE

Figura 1: Pathway di VHL: Il pathway di VHL nella cellula renale normale, in cui la proteina VHL convoglia la proteina HIF-1 α ubiquitinata al proteasoma per la degradazione, e nelle cellule RCCcc (VHL-/-), dove il mancato funzionamento della proteina VHL causa l'attivazione costitutiva di HIF-1 α .
.....16

Figura 2: Struttura della proteina pro-LOX: La proteina pro-LOX (50kDa) una volta glicosilata viene secreta dalla cellula. Il taglio proteolitico della pro-LOX, ad opera della proteina BMP-1 (bone morphogenetic protein-1) libera due proteine, la LOX-PP (18kDa) che rappresenta l'estremità N-terminale della proteina pro-LOX e l'enzima LOX (32kDa) che rappresenta l'estremità C-terminale della proteina pro-LOX.....21

Figura 3: Funzioni della proteina LOX e LOX-PP. L'enzima LOX (32kDa) regola la matrice extracellulare e ha un ruolo nel riarrangiamento del citoscheletro e nella regolazione della migrazione cellulare. La proteina LOX-PP (18kDa) invece svolge una funzione inibitoria sui processi di progressione del tumore.....31

Tabella 1: Caratteristiche dei pazienti e dei corrispondenti tumori. RCC-cc= carcinoma renale a cellule chiare, DX= diagnosi, G= grading tumorale, pTN= stadi azione tumorale.....38

Tabella 2: Elenco degli anticorpi utilizzati per il western blot. Per ogni anticorpo sono stati indicati ospite, ditta produttrice e diluizione utilizzata.....45

Figura 4: L'immagine rappresenta il meccanismo dell'RNA interference mediante siRNA dove la degradazione dell'mRNA target impedisce la sintesi della corrispondente proteina.50

Figura 5: Western Blot rappresentativo dei lisati di due coppie di colture primarie renali normali e tumorali corrispondenti a omogenato totale. In ogni lane sono stati caricati 25 µg di proteine. Lo stesso filtro è stato ibridato con l'anticorpo anti-HIF-1α e anti-actina usata come normalizzatore di caricamento.....58

Figura 6: Analisi quantitativa mediante Real time PCR del trascritto di LOX condotta su coppie di colture renali normali e tumorali HIF-1α positive **(a)** e HIF-1α negative **(b)**. I valori nei diversi campioni indicati sono espressi con $2^{-\Delta\Delta Ct}$58

Figura 7: Analisi quantitativa mediante Real time PCR del trascritto di S100A4 condotta su coppie di colture renali normali e tumorali HIF-1α positive **(a)** e HIF-1α negative **(b)**. I valori nei diversi campioni indicati sono espressi come $2^{-\Delta\Delta Ct}$59

Figura 8: Analisi quantitativa mediante Real time PCR del trascritto di E-Caderina condotta su coppie di colture renali normali e tumorali HIF-1α positive **(a)** e HIF-1α negative **(b)**. I valori nei diversi campioni indicati sono espressi come $2^{-\Delta\Delta Ct}$60

Figura 9: a) Western Blot rappresentativo dei lisati di una coppia di colture primarie normali e tumorali corrispondenti a omogenato totale, frazione nucleare e citoplasmatica. In ogni lane sono stati caricati 25 µg di proteine. Lo stesso filtro è stato ibridato con l'anticorpo anti-LOX, anti-istone e anti-tubulina. **b)** L'analisi densitometrica riporta il valore medio ± SEM (5 casi) delle OD corrispondenti alla banda proteica di pro-LOX presente nei diversi lisati di tutte le coppie di colture analizzate normalizzato per le OD delle proteine totali caricate (colorate con Ponceau).....62

Figura 10: a) Western Blot rappresentativo dei lisati di una coppia di colture primarie normali e tumorali corrispondenti a omogenato totale, frazione nucleare e citoplasmatica. In ogni lane sono stati caricati 25 µg di proteine. Lo stesso filtro è stato ibridato con l'anticorpo anti-LOX, anti-istone e anti-tubulina. **b)** L'analisi densitometrica riporta il valore medio ± SEM (5 casi) delle OD corrispondenti alla banda proteica di LOX presente nei diversi lisati di tutte le coppie di colture analizzate normalizzato per le OD delle proteine totali caricate (colorate con Ponceau).....**63**

Figura 11: a) Western Blot rappresentativo dei lisati di una coppia di colture primarie normali e tumorali corrispondenti a omogenato totale, frazione nucleare e citoplasmatica. In ogni lane sono stati caricati 25 µg di proteine. Lo stesso filtro è stato ibridato con l'anticorpo anti-LOX-PP, anti-istone e anti-tubulina. **b)** L'analisi densitometrica riporta il valore medio ± SEM (5 casi) delle OD corrispondenti alla banda proteica di LOX-PP presente nei diversi lisati di tutte le coppie di colture analizzate normalizzato per le OD delle proteine totali caricate (colorate con Ponceau).....**64**

Figura 12: a) Western Blot rappresentativo dei lisati dei medium di coltura di due coppie cortex/tumore. Lo stesso filtro è stato ibridato con l'anticorpo anti-LOX. **b)** L'analisi densitometrica riporta il valore medio ± SEM (5 casi) delle OD corrispondenti alla banda proteica di LOX presente nei diversi lisati di tutte le coppie di colture analizzate normalizzato per le OD delle proteine totali caricate (colorate con Ponceau).....**66**

Figura 13 a) Western Blot rappresentativo dei lisati di una coppia di colture primarie normali e tumorali corrispondenti a frazione nucleare e citoplasmatica. In ogni lane sono stati caricati 25 µg di proteine. Lo stesso filtro è stato ibridato con l'anticorpo anti-S100A4, anti-istone e anti-tubulina. **b)** L'analisi densitometrica riporta il valore medio ± SEM (6 casi) delle OD corrispondenti alla banda proteica di S100A4 presente nei diversi lisati di tutte le coppie di colture analizzate normalizzato per le OD delle proteine totali caricate (colorate con Ponceau).....**67**

Figura 14 a) Western Blot rappresentativo dei lisati di una coppia di colture primarie normali e tumorali corrispondenti a frazione nucleare e citoplasmatica. In ogni lane sono stati caricati 25 µg di proteine. Lo stesso filtro è stato ibridato con l'anticorpo anti-E-caderina, anti-istone e anti-tubulina. **b)** L'analisi densitometrica riporta il valore medio ± SEM (6 casi) delle OD corrispondenti alla banda proteica di E-caderina presente nei diversi lisati di tutte le coppie di colture analizzate normalizzato per le OD delle proteine totali caricate (colorate con Ponceau).....**68**

Figura 15: I grafici rappresentano il livello medio ± SEM di espressione del trascritto della lisil ossidasi espresso come $2^{-\Delta C_t}$ nelle colture primarie di cortex (9 casi) **(a)** ed RCC (11 casi) **(b)** trattate con siRNA controllo (siRNA_CTRL) e siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX).....**69**

Figura 16: I grafici rappresentano il livello medio ± SEM di espressione del trascritto di S100A4 espresso come $2^{-\Delta C_t}$ nelle colture primarie di cortex (7 casi) trattate con siRNA controllo (siRNA_CTRL) e siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX). **b)** Western blot rappresentativo di omogenato totale ottenuto da colture primarie normali trattate per 48 ore con siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX) e siRNA controllo (siRNA_CTRL).....**71**

Figura 17: Il grafico rappresenta il livello medio ± SEM di espressione del trascritto di S100A4 espresso come $2^{-\Delta C_t}$ nelle colture primarie di RCC (8 casi) trattate con siRNA controllo (siRNA_CTRL) e siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX). **b)** Western blot rappresentativo di omogenato totale ottenuto da colture primarie di RCC trattate per 48 ore con siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX) e siRNA controllo (siRNA_CTRL).....**72**

Figura 18: Il grafico rappresenta il livello medio ± SEM di espressione del trascritto di E-Caderina espresso come $2^{-\Delta C_t}$ nelle colture primarie di cortex (5 casi) trattate con siRNA controllo (siRNA_CTRL) e siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX). **b)** Western blot rappresentativo di omogenato totale ottenuto da colture primarie di cortex trattate per 48 ore con siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX) e siRNA controllo (siRNA_CTRL).....**72**

Figura 19: Il grafico rappresenta il livello medio \pm SEM di espressione del trascritto di E-Caderina espresso come $2^{-\Delta C_t}$ nelle colture primarie di RCC (5 casi) trattate con siRNA controllo (siRNA_CTRL) e siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX). **b)** Western blot rappresentativo di omogenato totale ottenuto da colture primarie di RCC trattate per 48 ore con siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX) e siRNA controllo (siRNA_CTRL).....73

Figura 20: Western blot rappresentativo di un lisato di omogenato totale ottenuto da colture primarie di RCC trattate per 48 ore con siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX) e siRNA controllo (siRNA_CTRL). In ogni lane sono stati caricati 25 μ g di proteine. Lo stesso filtro è stato ibridato con l'anticorpo anti-LOX, anti-HIF1 α e anti-actina usata come normalizzatore.....74

Figura 21: I grafici rappresentano il livello medio \pm SEM di espressione di tre trascritti target di HIF-1, Snail, Zeb-2 e TGF- β 3, espressi come $2^{-\Delta C_t}$, nelle colture primarie di RCC (3 casi) trattate con siRNA controllo (siRNA_CTRL) e siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX).....74

Figura 22: a) Il grafico rappresenta in percentuale il valore medio \pm SEM del rapporto "Assorbanza-siRNA_LOX/Assorbanza-siRNA_CTRL" nelle diverse colture primarie normali analizzate (6 casi). **b)** Il grafico rappresenta in percentuale il valore medio \pm SEM del rapporto "Assorbanza-siRNA_LOX/Assorbanza-siRNA_CTRL" nelle diverse colture primarie tumorali analizzate (8 casi totali, 5 casi HIF-1 α + e 3 casi HIF-1 α -).....76

Figura 23: Analisi quantitativa della capacità di adesione delle cellule normali e tumorali, silenziate con siRNA_CTRL e siRNA_LOX espressa come valore di assorbanza (λ 550nm). Nei grafici sono riportati i valori medi \pm SEM di tre esperimenti.....77

Figura 24: Immagini rappresentative di una zona della membrana della camera di Boyden attraversata dalle cellule di cortex e tumore trattate con siRNA_CTRL

e siRNA_LOX dopo fissazione e colorazione con ematossilina/eosina.
(20X).....78

Figura 25: Analisi quantitativa delle capacità migratorie delle colture di cortex e di tumore silenziate con siRNA_CTRL e siRNA_LOX. I risultati, espressi come percentuale rispetto ai corrispettivi controlli scelti come calibratori posti pari al 100%, rappresentano i valori medi \pm SEM di 5 esperimenti nel caso della cortex e di 6 nel caso del tumore.....79

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

AAS: α -aminoadipic- δ -semialdehyde
ACP: aldol condensation product
Akt: active human protein kinase
Ala: alanin
AQUA: automated quantitative fluorescence
Arg: arginina
BMDC: bone marrow derived cell
BMP: bone morphogenetic protein
Crk: cas related kinase
CSS: cancer-specific survival
deLNL: anydrolysinonorleucine
EMT: epithelial mesenchimal transition
ER: estrogen receptor
FAK: focal adhesion kinase
Gln: glutamina
HIF-1 α : hypoxia inducible factor 1 α
LOX: lysyl oxidase
LTQ: lisil tirosil chinone
Lys: lisina
MC: mouse calvaria
MEK: mitogen-activated ERK protein kinase
NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NRK-49F: normal rat kidney-49 fibroblast
OS: overall survival
PDGFBB: platelet derived growth factor BB
PDGFR β : platelet derived growth factor receptor β
PI3k: phosphatidylinositol 3-kinases
RCCcc: renal cell carcinoma clear cell
RPTP-k: receptor-type protein tyrosine phosphatase-kappa
rrg: ras recision gene
SMC: smooth muscle cell

SNP: single nucleotide polymorfism
TGF- α : transforming growth factor- α
TGF- β : transforming-growth-factor- β
TTM: time to metastases
Tyr: tirosina
VEGF: vascular endothelial factor
VHLp: von-Hippel-Lindau protein

RIASSUNTO

Il carcinoma renale, che rappresenta circa il 3% dei tumori dell'adulto (Klatte et al, 2007), si manifesta in vari sottotipi istologici di cui quello a cellule chiare (RCCcc) è il più frequente. Nell'80% delle forme sporadiche di RCCcc si ha un'inattivazione biallelica del gene oncosoppressore VHL, responsabile dell'espressione costitutiva del fattore inducibile dall'ipossia (HIF) che determinerà l'espressione di molteplici geni che codificano proteine coinvolte nella proliferazione, migrazione e invasività cellulare e nel processo angiogenico e metastatico. Fra i target di HIF coinvolti nella migrazione cellulare e nel processo metastatico troviamo la lisil ossidasi (LOX), che è un enzima che agisce sia a livello extracellulare che intracellulare. Il gene LOX, che mappa sul cromosoma 5, codifica per una proteina di 48kDa (prepro-LOX) che, una volta glicosilata alla sua estremità N-terminale, viene secreta dalla cellula come proteina pro-LOX (50kDa). Nella matrice extracellulare essa subisce un taglio proteolitico ad opera dell'enzima BMP-1 (bone morphogenetic protein-1) liberando così la proteina LOX-PP (18kDa) e l'enzima LOX (32kDa) (Lucero et al, 2006). La proteina LOX-PP funge da oncosoppressore, inibendo numerosi pathways molecolari come quello di PI3k/Akt e Raf/MEK che altrimenti, come visto in cellule di carcinoma mammario, favorirebbero la crescita, la proliferazione e la migrazione cellulare (Zhao et al, 2009). L'enzima LOX invece, a livello extracellulare, ossida i residui di lisina di collagene ed elastina, promuovendo la loro interazione e la formazione di fibre insolubili e stabili (Maki et al, 2005). A livello intracellulare LOX stimola l'attivazione di tirosino-chinasi che favoriscono la formazione di strutture pro-migratorie come le adesioni focali, i lamellipodi e i filopodi (Payne et al, 2005). Con questi meccanismi l'enzima LOX favorisce la progressione del tumore, e in particolare l'invasività e la formazione delle metastasi.

La nostra attenzione si è soffermata soprattutto sull'espressione e sulle funzioni dell'enzima LOX capaci di favorire la progressione del tumore e infatti è overespresso in molti tumori. L'obiettivo iniziale del nostro studio è stato quello di valutare, nel modello di colture primarie di cortex renale ed RCC già ampiamente caratterizzate (Bianchi et al, 2010), l'espressione del trascritto e delle proteine LOX. L'analisi mediante Real time PCR ha mostrato che il livello

del trascritto di LOX è overespresso nelle colture cellulari tumorali rispetto alla controparte normale e in maniera statisticamente significativa solo nei campioni tumorali HIF-1 α positivi, confermando che anche nel carcinoma renale l'espressione di LOX è correlata all'espressione di HIF-1 α . Anche la proteina pro-LOX (50 kDa) e la proteina attiva LOX (32 kDa) sono più espresse nel citoplasma della cellula tumorale rispetto alla controparte normale. Inoltre LOX è presente anche nel nucleo delle cellule tumorali. La proteina LOX-PP, che si ipotizza funga da oncosoppressore, con effetti molecolari spesso antitettici a quelli dell'enzima LOX, è invece statisticamente più espressa nella frazione nucleare delle colture normali. Nella frazione citoplasmatica, invece, sembrerebbe che non ci sia una notevole differenza tra colture normali e tumorali per quanto riguarda LOX-PP.

Nella seconda parte del nostro studio abbiamo valutato, mediante RNA Interference, l'effetto prodotto dal silenziamento della lisil ossidasi nelle colture primarie renali normali e tumorali. In particolare abbiamo studiato l'effetto del silenziamento di LOX sull'espressione di molecole quali S100A4 ed E-Caderina, coinvolte nell'acquisizione di proprietà invasive. La proteina S100A4 è descritta in letteratura come target di HIF (Liao et al, 2009). Nelle nostre colture cellulari renali normali il trascritto e la proteina S10A4 sono overesprese rispetto alle colture tumorali e quindi l'espressione di S100A4 non correla con l'espressione di HIF-1 α . Nelle cellule renali normali il silenziamento genico della LOX determina un incremento dell'espressione di S100A4 e di β -catenina che aumenta sia nel nucleo che nel citoplasma (Giampuzzi et al, 2001). Dati in letteratura hanno dimostrato che la β -catenina funge da fattore di trascrizione anche per S100A4 (Stein et al, 2006) quindi è possibile che l'incremento osservato dell'espressione di S100A4 venga mediato dalla β -catenina. Nelle colture primarie tumorali invece l'espressione di S100A4 risulta downregolata. Anche in questo caso l'effetto del silenziamento di LOX sull'espressione di S100A4 potrebbe essere mediato da β -catenina che risulta infatti lievemente downregolata. L'altro target da noi analizzato è l'E-Caderina che, in numerosi carcinomi risulta downregolata da HIF (Schietke et al, 2010). L'analisi delle nostre coppie di colture primarie di cortex e tumore ha mostrato che l'E-Caderina è overespressa nelle colture normali rispetto alle controparti tumorali. Nelle cellule normali l'inibizione dell'espressione di LOX comporta un aumento

dell'espressione E-Caderina, nelle cellule tumorali invece ne induce un decremento. Sulla base dei dati di letteratura che dimostrano l'esistenza di un loop regolatorio tra LOX ed HIF-1 α (Pez et al, 2011) abbiamo osservato che nelle cellule tumorali la downregolazione di LOX causa un lieve decremento dell'espressione di HIF-1 α e di alcuni suoi target, come Snail. Tuttavia la minore espressione di Snail, che è un repressore trascrizionale di E-Caderina, non correla con la downregolazione dell'E-Caderina osservata nelle cellule tumorali silenziate. Nell'ultima parte di questo studio abbiamo valutato gli effetti funzionali del silenziamento di LOX. Tramite saggio d'adesione abbiamo osservato che la downregolazione della LOX causa una minore adesione ai substrati sia delle cellule normali che tumorali. Questo dato potrebbe parzialmente spiegare il motivo per cui, come visto tramite saggi di migrazione con camera di Boyden, le cellule silenziate tendano a migrare meno. L'analisi della vitalità cellulare, tramite saggi MTT, non ha mostrato alcuna variazione nelle cellule normali. Nel caso delle cellule tumorali invece si è osservata una significativa diminuzione solo nel caso dei campioni RCC HIF-1 α positivi. Del resto è descritto in letteratura che l'enzima LOX regola la crescita cellulare tramite il pathway PI3k/Akt che tra l'altro induce un aumento della sintesi di HIF-1 α (Pez et al, 2011). Anche questo dato sembra riconfermare il fatto che esista un loop regolatorio tra la proteina LOX ed HIF-1 α .

Dato che anche nel nostro modello renale è stata riscontrata l'esistenza di un possibile loop regolatorio tra LOX ed HIF-1 α , la soppressione dell'attività cellulare di LOX potrebbe servire anche a modulare in senso inibitorio l'attività trascrizionale di HIF che regola molti processi fondamentali per la biologia della cellula tumorale. In conclusione i risultati ottenuti a livello molecolare e funzionale nelle colture tumorali, per effetto del silenziamento genico di LOX potrebbero essere dei buoni presupposti per future indagini circa l'eventuale utilizzo di LOX come target terapeutico e/o marcatore prognostico dell'RCCcc. Inoltre, alla luce dei risultati riguardanti S100A4, descritto in letteratura come target di HIF (Liao et al, 2009), sarà interessante indagare ulteriormente il suo ruolo funzionale dato che, al contrario di quanto osservato negli altri tipi di tumore, nel nostro modello sperimentale risulta downespresso nelle colture tumorali.

INTRODUZIONE

Il carcinoma renale, che rappresenta il 3% di tutti i tumori dell'adulto (Klatte et al, 2007), definisce un gruppo di tumori eterogeneo che include differenti sottotipi tra cui il carcinoma renale a cellule chiare, il papillare e il cromofobo. Il carcinoma renale a cellule chiare (RCCcc), che rappresenta circa l'80% dei carcinomi renali, ha origine dalle cellule dell'epitelio del tubulo prossimale ed è altamente vascolarizzato. Le cellule tumorali vengono definite "cellule chiare" perché il loro citoplasma è molto ricco di lipidi e glicogeno che si perdono durante la colorazione istologica. A livello molecolare il RCCcc presenta differenti anomalie e nell'80% dei casi sporadici si ha l'inattivazione biallelica dell'oncosoppressore VHL (von Hippel-Lindau) (William et al, 2008).

Il pathway di pVHL

L'oncosoppressore VHL, che si trova sul cromosoma 3p25, induce l'espressione e la sintesi della proteina VHL (pVHL) che è una componente del complesso E3 ubiquitin-ligasi dove sono presenti altre proteine, l'elongina B, l'elongina C, Cul2 ed Rbx1. Il complesso E3 ubiquitin-ligasi promuove l'ubiquitinazione dei suoi substrati favorendone la degradazione da parte del proteasoma 26S. La pVHL contiene due domini: il dominio *a* che lega l'Elongina-C e il dominio *b* che lega la proteina che verrà ubiquitinata. Sono stati identificati diversi substrati del complesso E3 ubiquitin-ligasi, come aPKC λ (atypical protein kinase C λ) e due subunità della RNA polimerasi II (Rpb1 ed Rpb7). Comunque, la proteina-target più conosciuta e maggiormente studiata è l'hypoxia inducible factor (HIF-1 α) (Nyhan et al, 2008).

Regolazione di HIF-1 α

La regolazione di HIF-1 α da parte del complesso E3-ubiquitin ligasi è critica per il normale funzionamento cellulare. Hypoxia-inducible factor è un fattore di trascrizione eterodimerico che media le risposte cellulari all'ipossia. Esso è costituito da una subunità α ossigeno-sensibile e una subunità β costitutivamente espressa. In condizioni fisiologiche, quindi in presenza di O₂, la subunità α di HIF viene idrossilata così da potersi legare alla proteina VHL

del complesso E3 ubiquitin-ligasi, da cui verrà ubiquitinata per la conseguente degradazione. In condizioni di ipossia, la mancata idrossilazione di HIF-1 α ne impedisce il riconoscimento da parte della proteina VHL, in questo modo la subunità HIF-1 α , che non viene degradata, trasloca nel nucleo e con la subunità β (HIF- β), costitutivamente espressa, formerà l'eterodimero HIF-1 che attiverà la trascrizione di differenti geni. Anche quando il gene VHL va incontro ad alterazioni, per eventi genetici o epigenetici, HIF-1 α non viene degradato quindi è costitutivamente espresso. Le alterazioni di VHL caratterizzano l'80% dei carcinomi renali a cellule chiare sporadici.

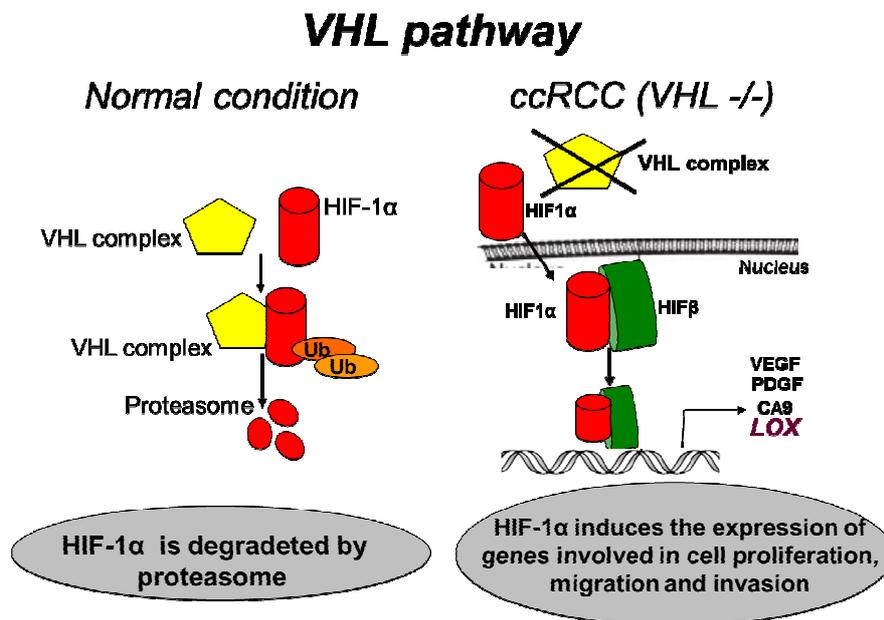


Figura 1: Pathway di VHL: Il pathway di VHL nella cellula renale normale, in cui la proteina VHL convoglia la proteina HIF-1 α ubiquitinata al proteasoma per la degradazione, e nelle cellule RCCcc (VHL-/-), dove il mancato funzionamento della proteina VHL causa l'attivazione costitutiva di HIF-1 α .

Geni target di HIF-1 α

Numerosi studi hanno dimostrato come l'espressione di HIF sia determinante nella patogenesi del carcinoma renale con inattivazione biallelica del VHL. Hypoxia inducible factor (HIF-1) induce l'espressione di differenti geni target come il TGF- α , che causa una disregolata proliferazione cellulare, il VEGF, che favorisce l'angiogenesi, e repressori trascrizionali della E-Caderina che impediscono l'adesione cellula-cellula.

HIF-1, attivando la trascrizione di altri geni, induce anche la motilità e l'invasione delle cellule tumorali e favorisce il metabolismo del glucosio (Semenza et al, 2003).

HIF-1 e regolazione del metabolismo del glucosio

Una delle tante classi di geni regolati da HIF-1 è quella che codifica per le proteine coinvolte nel metabolismo del glucosio. Una cellula tumorale, al contrario di una cellula normale, soddisfa, tramite la glicolisi, circa il 50% del suo fabbisogno energetico contro il solo 10% di una cellula normale. Questo è un modo che probabilmente la cellula tumorale usa per poter sopravvivere in presenza di una bassa quantità di O₂. Il fattore HIF-1 infatti è overespresso sia nei casi in cui il VHL è mutato (come nel carcinoma renale a cellule chiare) che in condizioni di ipossia.

In queste condizioni, HIF-1 favorisce la produzione di energia glicolitica transattivando i geni che codificano per proteine che trasportano il glucosio nella cellula (GLUT1 e GLUT3), e per enzimi glicolitici. Inoltre, HIF-1 decrementa la funzione mitocondriale, infatti, alcuni lavori mostrano che un altro importante target di HIF-1 è la piruvato deidrogenasi chinasi che fosforila e quindi inattiva la piruvato deidrogenasi che, se attiva, promuoverebbe l'entrata del piruvato nei mitocondri. Tutto ciò comporta, in ultima analisi, una riduzione della fosforilazione ossidativa, una minore produzione di energia mitocondriale e un ridotto consumo di ossigeno molecolare (Denko et al, 2008).

HIF-1 e angiogenesi (VEGF)

La crescita tumorale e la formazione delle metastasi richiede il supporto dei vasi sanguigni, i quali forniscono O₂ e sostanze nutritive alle cellule tumorali. Durante l'evoluzione di un processo tumorale è particolarmente importante la fase dell'angiogenesi cioè la formazione di nuovi vasi. Uno dei più importanti fattori promuoventi l'angiogenesi è il VEGF (vascular endothelial growth factor) che è uno dei principali target trascritti da HIF-1. Inoltre HIF-1 decrementa l'espressione di fattori anti-angiogenici come la trombospondina (Semenza et al, 2003).

HIF-1, motilità e invasione cellulare

L'invasione e la formazione delle metastasi sono le fasi della crescita tumorale che più incidono sulla sopravvivenza del paziente. Anche in questi processi l'hypoxia-inducible factor ha un ruolo determinante. La formazione delle metastasi è un evento multistep che è favorito dal processo della transizione epitelio-mesenchimale (EMT), a cui va incontro la cellula epiteliale durante la trasformazione neoplastica. Il processo di EMT determina una serie di eventi multicellulari, come la distruzione delle interazioni cellula-cellula, la perdita della polarità apico-basale, la riorganizzazione del citoscheletro e infine la degradazione della membrana basale. HIF-1 promuove l'espressione di proteine come Snail e LOX che insieme innescano un pathway che attenua l'espressione della E-Caderina, in questo modo le cellule perdono le loro proprietà di adesione e possono invadere i tessuti circostanti e migrare verso siti distanti dalla sede del tumore primario. Per consentire la migrazione e quindi la formazione delle metastasi sono importanti i cambiamenti che subisce la matrice extracellulare, le cui proteine regolano anche processi come la proliferazione, la differenziazione cellulare, oltre che la migrazione cellulare e l'invasione (Schietke et al, 2010).

Un'importante proteina-target di HIF-1, coinvolta nella migrazione cellulare e nella formazione delle metastasi, è la Lisil ossidasi (LOX). La proteina LOX agisce sulle proteine della matrice extracellulare, sul collagene e sull'elastina, favorendo la formazione di cross-link che mantengono integra la struttura della matrice. A livello intracellulare la proteina LOX promuove differenti pathway biologici che diminuiscono l'adesione cellula-substrato favorendo la migrazione cellulare e quindi la formazione delle metastasi (Erler et al, 2006). Un'altra interessante proteina, anch'essa target di HIF-1, coinvolta nella motilità e nell'invasione delle cellule tumorali (Liao et al, 2009) è la S100A4. La proteina S100A4 è una proteina legante il Ca^{2+} , trovata overespressa in moltissimi tipi di tumore come in quello della mammella, del pancreas, della prostata, dell'esofago, del polmone e della tiroide. Per quanto riguarda il carcinoma renale, i dati in letteratura sono pochissimi, soltanto Bandiera et al (2009) hanno individuato una sua overespressione in una metastasi polmonare di carcinoma renale e le analisi di immunohistochemica hanno localizzato la proteina soprattutto negli infiltrati infiammatori, nelle cellule endoteliali e nei fibroblasti

presenti nel contesto del tumore. Numerosi studi in letteratura mettono in evidenza che il gene S100A4 viene espresso soltanto nelle fasi più avanzate della crescita tumorale e nelle metastasi. Lopez-Lago e colleghi (2010), infatti, hanno osservato che il gene S100A4 viene modulato diversamente nei vari stadi di crescita del tumore. Il confronto del profilo genico di una linea cellulare tumorale derivata da carcinoma renale non-metastatica (SN12C) e una linea cellulare di una metastasi del carcinoma renale (LM1), ha messo in evidenza che nella linea cellulare metastatica i markers mesenchimali, come appunto S100A4, sono upregolati mentre quelli epiteliali sono down-regolati. La medesima differenza è stata vista anche confrontando le biopsie di carcinoma renale primario e metastatico. L'analisi dei siti di metilazione ha poi rilevato che il promotore del gene S100A4 subisce un silenziamento epigenetico dovuto cioè ad una ipermetilazione nelle cellule non metastatiche (SN12C).

Struttura e funzione di LOX

Il gene LOX, che si trova sul cromosoma 5 (5q23.3-31.2), è costituito da sette esoni e codifica per una proteina di 417 aminoacidi, la lisil ossidasi (LOX). La proteina LOX è sintetizzata come preproteina di 48 kDa (preproLOX) che, una volta glicosilata alla sua estremità N-terminale, viene secreta dalla cellula come una proproteina (pro-LOX) di 50kDa. Nella matrice extracellulare il taglio proteolitico della pro-LOX ad opera della proteina BMP1 (bone morphogenetic protein-1) libera due proteine attive, la proteina LOX-PP di 18 kDa che rappresenta l'estremità N-terminale della proteina pro-LOX, dove si trova una sequenza segnale, e la proteina enzimatica LOX di 32kDa che rappresenta la regione C-terminale della proteina pro-LOX. L'estremità C-terminale è una regione altamente conservata tra le proteine della famiglia LOX (LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3, LOXL4), essa contiene un sito di legame per gli ioni rame, un dominio di legame per il cofattore Lisil tirosil chinone, un sito cataliticamente attivo e un dominio di legame analogo ai recettori di citochine e di fattori di crescita (Lucero et al, 2006).

Attività catalitica di LOX

La proteina LOX appartiene alla categoria degli enzimi che catalizzano reazioni di ossido-riduzione. La lisil ossidasi, per poter espletare la sua funzione necessita di due cofattori, il lisil tirosil chinone (LTQ), che è parte integrante dell'enzima, e gli ioni rame (Cu^{2+}) che invece non sono direttamente coinvolti nell'attività catalitica della LOX ma servono a rendere stabile la conformazione dell'enzima e a mantenere integra la struttura del suo cofattore. Nella matrice extracellulare la lisil ossidasi ossida i residui di lisina delle proteine di collagene e di elastina la cui interazione formerà fibre insolubili e stabili. La reazione di deaminazione ossidativa catalizzata dalla proteina LOX, converte la Peptidil-lisina in peptidil aldeide (α -aminoadipico- δ -semialdeide (AAS)). Il peptidil aldeide formato può interagire con residui di lisina non modificati formando il crosslink anidrolisinorleucina (deLNL) oppure con un altro peptidil aldeide formando il crosslink aldolo (ACP). Studi in vitro hanno dimostrato che la proteina LOX ossida soltanto proteine globulari con un punto isoelettrico >8 . Non si ha alcuna informazione sulla struttura tridimensionale della proteina LOX

ma la sua sequenza aminoacidica mostra che i residui anionici sono distribuiti soprattutto nelle immediate vicinanze del suo sito attivo e dove la lisina 314 e la tirosina 349 interagiscono per formare il cofattore LTQ (Lucero et al, 2006).

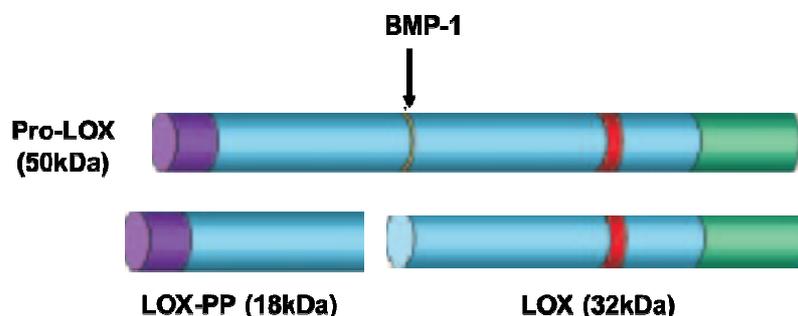


Figura 2: Struttura della proteina pro-LOX: La proteina pro-LOX (50kDa) una volta glicosilata viene secreta dalla cellula. Il taglio proteolitico della pro-LOX, ad opera della proteina BMP-1 (bone morphogenetic protein-1) libera due proteine, la LOX-PP (18kDa) che rappresenta l'estremità N-terminale della proteina pro-LOX e l'enzima LOX (32kDa) che rappresenta l'estremità C-terminale della proteina pro-LOX.

Il propeptide LOX regola la secrezione e l'attività dell'enzima LOX

Il trascritto di LOX (mRNA) codifica per una pre-proproteina (pre-pro-LOX) di 417 aminoacidi, che subirà alcune modificazione post-traduzionali nel lume del reticolo endoplasmatico. Per prima cosa si ha la N-glicosilazione della sequenza del propeptide, costituita da 147 aminoacidi, il clivaggio della sequenza segnale di 21 aminoacidi che si verifica indipendentemente dall'avvenuta glicosilazione. La rimozione della sequenza segnale porta alla formazione della pro-proteina (pro-LOX) che viene rilasciata nella matrice extracellulare e solo in presenza della pro-sequenza ma indipendentemente dalla glicosilazione. La glicosilazione del propeptide è però importante perché influenza l'attività enzimatica della LOX matura. Infatti, cellule trasfettate con la pro-LOX presentano un'attività enzimatica della LOX matura maggiore rispetto a cellule trasfettate con la pro-LOX contenente una mutazione che impedisce la sua glicosilazione. La LOX matura, viene rilasciata nella matrice extracellulare, dove svolge le sue funzioni biologiche, ma diffonde anche nella cellula distribuendosi in regioni del reticolo endoplasmatico più vicine al nucleo. La pro-LOX invece si distribuisce nella restante superficie del reticolo endoplasmatico. Questo è indice di una maggiore stabilità, cioè di un equilibrio tra la quantità di

proteina prodotta e la quantità di proteina sintetizzata/secretata e degradata. La proteina LOX che invece è più concentrata nella periferia nucleare, tende più facilmente ad essere traslocata nel reticolo endoplasmatico per essere quindi degradata nel citoplasma. Questa sua distribuzione la rende una proteina facilmente degradabile. Infatti in sistemi cellulari trattati con epoxomicina, un inibitore dei proteasomi, il livello della LOX matura aumenta notevolmente rimane invece invariato quello della pro-LOX (Grimsby et al, 2010).

LOX nello sviluppo embrionale

La formazione dei cross-links di elastina e di collagene ad opera della proteina LOX porta ad un incremento della forza tensile e dell'integrità strutturale necessari per il normale funzionamento del tessuto connettivo. La proteina LOX gioca un ruolo importante durante l'embriogenesi, in particolare durante la gastrulazione e la migrazione del mesenchima primario. Studi in vivo hanno dimostrato che topi LOX $-/-$ muoiono immediatamente dopo la gestazione o comunque alla nascita a causa degli stress fisiologici a cui sono sottoposti, come il trauma fisico dovuto al passaggio attraverso il canale uterino. In questi modelli si osserva una riduzione dei cross-link dell'elastina e del collagene rispettivamente del 60% e del 40%. La combinata riduzione dei cross-link dell'elastina e del collagene risultava in una perdita dell'integrità strutturale dell'aorta e di anomalie diaframmatiche. Poiché i topi muoiono alla nascita, non si possono esaminare le funzionalità degli altri organi, tuttavia si osserva anche che la pelle si lacera facilmente e le coste sono piuttosto deboli. Quindi anche se i cross-link LOX-indotti non sono determinanti per l'organogenesi sono però fondamentali per lo sviluppo della forza tensile del collagene e per l'elastogenesi che servono all'organismo per la sopravvivenza ex-utero. Negli stessi studi è stato notato che gli altri membri della famiglia delle lisil ossidasi non riescono a compensare l'attività enzimatica della Lox. Ciò può essere dovuto alla loro incapacità di riconoscere substrati specifici della LOX o probabilmente per la loro diversa distribuzione temporale e spaziale (Hornstra et al, 2003).

Maki e colleghi (2005) hanno dimostrato che la proteina LOX è essenziale anche per il normale sviluppo del sistema respiratorio e della pelle. Studi in vivo dimostrano che topi LOX $-/-$ presentano un minor numero di bronchioli (23%)

rispetto ai wild type. Le cellule epiteliali dei bronchioli di topi LOX^{-/-} risultano disorganizzate e in minor numero rispetto al normale e nel complesso lo strato epiteliale presenta uno spessore significativamente ridotto. L'analisi immunoistochimica mostra che le sezioni di polmoni di topi LOX^{-/-} hanno un minor numero di fibre elastiche che però risultano essere piuttosto sottili e poco organizzate. La stessa osservazione è stata fatta sulle fibre di collagene che appaiono altrettanto disperse, corte e incapaci di formare fasci di fibre regolari. La medesima analisi fatta sulla pelle di topi Knock-out per LOX messi a confronto con topi wild type ha portato alle medesime conclusioni (Maki et al 2005).

Il dominio propeptidico di LOX funge da oncosoppressore

Alcuni studi dimostrano che la proteina LOX-PP (18kDa) funge da oncosoppressore. Infatti è stato visto che l'espressione genica di LOX inibisce l'attività trasformante dell'oncogene ras. Molte linee cellulari tumorali e alcuni tipi di tumori umani hanno una bassa espressione del trascritto della lisil ossidasi. Palamakumbura et al (2004) hanno dimostrato che linee cellulari ras trasformate, il cui fenotipo trasformato reverte spontaneamente o per induzione farmacologica, come il trattamento con suramina, sono in grado di ripristinare l'espressione della lisil ossidasi e a livello funzionale mostrano una maggiore permanenza nella fase G1 del ciclo cellulare e una minor velocità di crescita rispetto alle cellule ras trasformate (RS485: NIH 3T3 ras trasformate). Gli stessi autori hanno anche dimostrato che il ruolo oncosoppressore di LOX risiede nel suo dominio propeptidico e non dipende dalla sua attività enzimatica. Infatti, cellule RS485 trattate con suramina e con β APN (β -aminopropionitrile), che inibisce in maniera irreversibile l'attività enzimatica di LOX, manifestavano ugualmente una minore velocità di crescita e una maggiore permanenza nella fase G1 del ciclo cellulare. A livello molecolare, l'inibizione dell'attività dell'oncogene ras da parte della proteina LOX-PP previene l'attivazione di NF- κ B un fattore trascrizionale che gioca un importante ruolo nello sviluppo del cancro e nella formazione delle metastasi. (Jeay et al 2003).

Min et al (2007) hanno dimostrato che l'overspressione della LOX-PP reverte il fenotipo invasivo anche in linee cellulari derivate da tumore alla mammella in

cui è overespresso Her2/neu, un recettore di membrana la cui attivazione stimola i pathways di attivazione dell'oncogene ras. Il tumore mammario che overesprime Her2/neu è una forma particolarmente aggressiva, infatti mostra incrementate proprietà mesenchimali e quindi tendenza all'invasione e alle metastasi. Anche in questo caso l'attività tumor-suppressor di LOX-PP viene espletata mediante l'inibizione del pathway PI3k/Akt. L'enzima LOX invece promuove l'attivazione di Akt, mostrando quindi un'attività uguale e opposta a LOX-PP. Alla luce di questi dati è possibile ipotizzare che la regione propeptidica della proteina nascente pro-LOX ma soprattutto di LOX-PP svolge una funzione regolatoria sulla proteina LOX che invece promuove la crescita e la migrazione delle cellule tumorali.

Questi stessi autori hanno individuato in sei delle nove linee cellulari derivate da cancro alla mammella uno SNP (single-nucleotide polymorfism) (rs1800449) nella regione del gene che codifica per il dominio propeptidico di LOX-PP. Questo SNP porta ad una sostituzione aminoacidica, Arg158Gln. Studi di espressione hanno messo in evidenza che la variante Gln del dominio propeptidico comporta una mancata inibizione della crescita e dell'invasione tumorale. Inoltre, analisi di microarray fatte su circa 311 casi di cancro alla mammella aggressivo e 446 controlli hanno mostrato una forte correlazione tra lo SNP (rs1800449) e l'incrementato rischio di tumore ER-negativo, una delle forme più aggressive di tumore alla mammella. Oltretutto, i tumori alla mammella ER-negativi mostrano un'alta espressione dell'mRNA di LOX e quindi, da un lato avremo la variante Gln della proteina LOX-PP incapace di espletare la sua funzione tumor-suppressor e dall'altro l'attività protumorigenica dell'enzima LOX che favorisce la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali (Min et al 2009).

Pathway molecolari regolati dalla proteina Lox-PP

Regolazione della β -catenina

Giampuzzi et al (2005) hanno osservato che la downregolazione di LOX in fibroblasti normali (NRK-49F: normal rat kidney fibroblast) determina un sostanziale cambiamento fenotipico, incrementato turnover cellulare, crescita ancoraggio indipendente e formazioni di tumori in topi nudi. Tra i tanti

cambiamenti molecolari si osserva un incremento dell'espressione della β -catenina, sia a livello nucleare che citoplasmatico, e quindi una maggiore espressione dei suoi target, come la ciclina D1. La regolazione della β -catenina, da parte della proteina LOX-PP, è mediata dal recettore di membrana RPTP-k (Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase-Kappa). La proteina oncosoppressore LOX-PP tutela la struttura di questo recettore, in particolare, della sua subunità P intracellulare tramite cui vengono consolidati i complessi E-Caderina/ β -catenina nelle giunzioni cellula-cellula ostacolando così la traslocazione della β -catenina nel nucleo della cellula (Morgan et al, 2011).

LOX (32kDa) e LOX-PP (18kDa) svolgono un ruolo opposto sul pathway molecolare che promuove la migrazione cellulare

Il processo molecolare che porta alla migrazione cellulare è piuttosto complesso poiché coinvolge numerosi pathways che attivano differenti target per la formazione di strutture quali le adesioni focali, i lamellipodi e filopodi che, in maniera organica, promuovono il movimento cellulare. Uno dei processi chiave alla base della motilità cellulare è la formazione delle adesioni focali, punti di contatti tra la cellula e le proteine della matrice extracellulare, come ad esempio la fibronectina nel caso delle cellule tumorali. Questo processo è regolato da due importanti proteine: Src e FAK (focal adhesion kinase). L'attivazione di FAK/Src promuove la formazione delle adesioni focali, la polimerizzazione dell'actina e quindi la migrazione cellulare. Le proteine FAK/Src promuovono la fosforilazione e l'attivazione di p130 Cas che legandosi a Crk (Cas related kinase) formerà un complesso che recluta DOCK180, una Rac-GEF, responsabile della formazione di Rac-GTP e quindi dei lamellipodi. Il medesimo pathway molecolare promuove l'attivazione di Cdc42 che invece consentirà la formazione dei filopodi. Contemporaneamente a ciò la proteina Rho che promuove la formazione delle stress fibers e quindi favorisce un fenotipo non migratorio, viene inattivata. Payne et al (2005) hanno dimostrato che l'espressione ectopica della LOX favorisce, in cellule tumorali di cancro alla mammella una maggiore adesione a substrati proteici come il collagene e la fibronectina. Tutto questo si verifica perché l'enzima LOX tramite un

meccanismo H_2O_2 -dipendente promuove l'attivazione della chinasi Src che fosforila FAK (focal adhesion kinase) in un residuo di tirosina del suo dominio chinamico (Tyr-576), e la fosforilazione di una delle più importanti proteine presenti nelle adesioni focali e cioè la paxillina (Tyr-118) ad opera sia della chinasi FAK che ad opera di meccanismi H_2O_2 -dipendenti (Laczko et al 2007).

Payne et al (2006) hanno osservato che in linee cellulari di tumore alla mammella, l'inibizione dell'attività di LOX, tramite trattamento con β APN, porta all'attivazione di Rho che promuove la formazione delle stress fibers conferendo alla cellula un fenotipo non migratorio. Inoltre saggi di immunoprecipitazione hanno messo in evidenza che l'inibizione enzimatica di LOX decrementa la formazione del complesso CAS-DOCK180-Crk. I meccanismi attraverso cui l'enzima LOX attiva i principali target per la migrazione cellulare sono tutti mediati da H_2O_2 . Gli studi fatti da Postovit et al (2008) mettono in evidenza la correlazione tra stadi di ipossia/riossigenazione cellulare, attività catalitica dell'enzima LOX e migrazione cellulare indotta dalla proteina LOX. Infatti, mentre l'ipossia, che è una condizione preliminare per l'inizio della migrazione e quindi della formazione delle metastasi, favorisce l'espressione dell'mRNA e della proteina LOX, solo la successiva riossigenazione promuove l'attività enzimatica di LOX infatti in linee tumorali di cancro alla mammella (come le T-47D) si osserva un incremento di FAK (Tyr-576) e Src (Tyr-418) fosforilato.

Lucero et al (2008) hanno osservato in colture di cellule muscolari lisce dell'aorta di ratto (SMC) che la reazione di deaminazione ossidativa catalizzata dall'enzima LOX è fondamentale per promuovere la migrazione cellulare indotta da agenti chemiotattici come il PDGFBB (Platelet derived growth factor BB). Colture di SMC trattate con β APN infatti mostrano una minore quantità di proteine ossidate sulla membrana plasmatica delle cellule d'interesse come ad esempio il recettore di PDGFBB e anche una ridotta quantità di proteine fosforilate (come Akt ed ERK) di pathways molecolari, dipendenti dal suddetto recettore, che inducono la proliferazione e la migrazione cellulare. L'ossidazione del recettore PDGFR- β da parte dell'enzima LOX facilita il legame col suo ligando (PDGF-BB) aumentando la risposta chemiotattica della cellula.

Invece, l'espressione ectopica di LOX-PP in cellule NF639 (linea cellulare derivata da cancro alla mammella stabilmente trasformate per Her2-neu) ma

anche in linee cellulari di tumore alla mammella riduce la migrazione cellulare solo quando promossa dalla fibronectina. A livello molecolare si assiste ad una attenuata concentrazione di proteine delle adesioni focali fosforilate come FAK (nel sito di auto fosforilazione, Tyr-397, e in un residuo di tirosina (576) del dominio catalitico fosforilato dalla proteina Src) e p130-Cas (Zhao et al 2009). Inoltre gli stessi autori hanno verificato che l'espressione ectopica dell'enzima LOX aumenta la migrazione cellulare, riconfermando quindi ciò che è già stato osservato in altri modelli cellulari, l'espressione ectopica della pro-LOX, che una volta secreta nella matrice extracellulare viene processata in LOX e LOX-PP, attenua anch'essa, come la LOX-PP, l'apoptosi stimolata dal complesso fibronectina-integrina, suggerendo quindi che la proteina LOX-PP ha un ruolo dominante sull'enzima LOX.

L'enzima LOX influenza la proliferazione cellulare

L'enzima LOX è stato ampiamente studiato in numerose linee tumorali derivate da differenti tumori, dal tumore alla mammella, al polmone e al colon, per studiare il processo di adesione, di migrazione e di invasione. Baker et al (2011) hanno indagato, mediante analisi di immunohistochimica, il livello di espressione della proteina LOX in pazienti con cancro al colon, osservando che è progressivamente più alto negli stadi più avanzati della malattia. Successivamente è stato indagato, in linee di cancro al colon invasive e non (SW480 ed SW620) il ruolo della proteina LOX nella proliferazione cellulare. L'overespressione di LOX in cellule SW480 determina, rispetto alle cellule controllo (trasfettate con un vettore vuoto), un incremento statisticamente significativo della crescita cellulare su collagene, come visto dal livello di espressione dell'antigene Ki67, una proteina nucleare associata alla proliferazione cellulare. In queste cellule è stata osservata un'alta espressione della proteina Src fosforilata (Tyr-418) infatti, se trattate con dasatinib, un inibitore dell'attività di Src, l'attività proliferativa decrementa in maniera statisticamente significativa. Inoltre l'overespressione di LOX con una mutazione (Lys320Ala) nel suo dominio catalitico non causa né un incremento nel livello di espressione della proteina Src fosforilata né tanto meno un aumento della proliferazione cellulare. La regolazione della fosforilazione della proteina Src e quindi della proliferazione sono mediati da proteine di

membrana, come le integrine, specializzate nella trasduzione di stimoli provenienti dalla matrice extracellulare come l'attività della proteina LOX. Quando queste proteine vengono bloccate con anticorpi specifici le cellule che overesprimono LOX mostrano una ridotta proliferazione cellulare. Tramite la regolazione della proteina Src, l'overespressione di LOX promuove in vitro l'invasione delle cellule su collagene e in vivo la formazione delle metastasi. Inoltre (Pez et al, 2011) hanno studiato e analizzato un ulteriore pathway molecolare attraverso cui l'enzima LOX promuove la proliferazione cellulare. Sempre tramite studi in vitro, che usano come modello linee di cancro al colon, è stato visto che la proteina LOX regola, attivandolo, il pathway PI3K/Akt che, tra le tante funzioni biologiche, promuove appunto la proliferazione cellulare. L'overespressione di LOX in linee cellulari di cancro al colon, infatti, determina un incremento della proliferazione cellulare, sia in normossia che in ipossia. Come nel caso del tumore alla mammella e al rene, anche nel tumore al colon, l'espressione della proteina LOX correla con l'espressione di HIF-1 α . Poiché in studi passati è stato visto che la proteina LOX regola il pathway PI3K/Akt (Levental et al 2009) e che il medesimo pathway incrementa la sintesi della proteina HIF-1 α (Zhong et al 2000), Pero e colleghi (2011) hanno dimostrato sperimentalmente che esiste un loop di regolazione tra la proteina LOX e il fattore di trascrizione HIF-1 α . Infatti, l'overespressione di LOX incrementa la sintesi della proteina HIF-1 α e tramite la stessa proteina HIF-1 α promuove la proliferazione cellulare. Al momento solo Saad et al (2010) accennano ad una localizzazione nucleare, oltre che citoplasmatica ed extracellulare, della proteina attiva LOX che, probabilmente, influenza la proliferazione cellulare, regolando la crescita della struttura nucleare.

LOX promuove l'invasione e la formazione delle metastasi

L'evoluzione di un processo neoplastico rende le cellule tumorali capaci di acquisire caratteristiche invasive e determinare la formazione delle metastasi, con un processo multi-step. Ancora oggi più del 90% dei decessi per cancro è dovuto alla formazione delle metastasi. Molti studi hanno messo in evidenza che sia il trascritto che la proteina lisil ossidasi sono più espressi nel tumore rispetto alla controparte normale e tale espressione tende ad aumentare di più

negli stadi più avanzati. Questo dato è comune a differenti tipi di tumori, quali il tumore della mammella, del sistema nervoso centrale, della prostata, del polmone e anche del carcinoma renale a cellule chiare. Ad esempio Sakai et al (2009) hanno analizzato sia il livello di trascritto che di proteina in linee cellulari di carcinoma a cellule squamose dell'esofago a diversa differenziazione, e in tessuti. Le analisi con Real Time PCR mostrano che lo 84% dei tessuti tumorali presi in esame ha un'espressione del trascritto più alta rispetto alla controparte normale, a livello di proteina la percentuale di sovraespressione è presente solo nel 53% dei casi (Sakai et al 2009). Successivamente sono stati presi in esame le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti che mostravano un'alta espressione del trascritto della lisil ossidasi, ed è stato visto che la sua overespressione mostra una correlazione statisticamente significativa con la formazione e col numero di metastasi nei linfonodi. Inoltre i pazienti con carcinoma a cellule squamose dell'esofago (ESCC) e con alta espressione di LOX avevano un tasso di sopravvivenza significativamente più basso rispetto ai pazienti con ESCC ma con bassa espressione di LOX. Ulteriori analisi hanno messo in evidenza che l'alta espressione di LOX era anche correlata con lo stadio tumorale e la distanza delle metastasi. Un'analisi simile è stata fatta anche da Thu-Le et al (2009) su un gruppo di circa mille pazienti con carcinoma della testa e del collo. I campioni di tessuto tumorale sono stati analizzati mediante la tecnica AQUA (Automated quantitative fluorescence) che ha mostrato un maggiore segnale della proteina LOX sia a livello nucleare che citoplasmatico e inoltre questa differenza era statisticamente significativa. La medesima analisi ha messo in evidenza che la localizzazione nucleare della proteina LOX era altamente predittiva di TTM (time to metastases), CSS (cancer-specific survival) e OS (overall survival). Inoltre, Wilgus et al (2011) hanno valutato il livello di espressione della proteina LOX in circa 166 campioni di tessuti di adenocarcinoma polmonare. Anche in questo tipo di tumore è stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa tra il livello di espressione della proteina LOX e l'invasività tumorale e l'incrementato rischio di morte nell'arco di cinque anni. Saggi di immunohistochimica hanno localizzato la proteina LOX solo nelle cellule tumorali ed endoteliali e no nello stroma. La correlazione vista in questa analisi fa riferimento quindi solo alla proteina LOX espressa nelle cellule tumorali. Questo fa ipotizzare che è la proteina LOX

intracellulare, e non quella individuata nella matrice extracellulare, a modulare il processo invasivo e le successive metastasi. Tutti questi dati candidano la proteina LOX come un potenziale marker di metastasi.

La proteina LOX è coinvolta nella formazione delle nicchie premetastatiche

La nicchia premetastatica, sede della futura metastasi, è costituita dalle cellule derivate dal midollo osseo (BMDCs). Le BMDCs hanno il compito di creare un ambiente favorevole all'invasione e all'alloggiamento delle cellule tumorali. (Condeelis et al, 2006). Erler et al (2006) hanno dimostrato che l'inibizione dell'attività di LOX riduce l'invasione e la formazione di metastasi polmonari in un modello ortotopico di cancro alla mammella. E' stato studiato quindi il ruolo della proteina LOX nel reclutamento e nell'invasione delle BMDCs nei siti premetastatici e nella formazione delle nicchie premetastatiche. Infatti, è stato visto che in un modello ortotopico di cancro alla mammella con cellule MDA-MB-231 (linea cellulare umana di cancro alla mammella) si formavano molte più metastasi polmonari rispetto ad un modello ortotopico con cellule MDA-MB-231 trasfettate con un shRNA specifico per lo mRNA-LOX. L'analisi in immunohistochimica delle metastasi polmonari ha individuato la presenza di un'alta concentrazione della proteina LOX e della fibronectina, prodotte entrambi dalle cellule tumorali. Nella stessa area, che coincide con bronchioli terminali e alveoli distali, sono state trovate cellule di origine mieloide (BMDCs CD11b+/F4/80 negative), reclutate dall'enzima LOX, e cellule tumorali. L'enzima LOX, la cui principale funzione è quella di formare dei crosslink tra le proteine della matrice, agisce sulle proteine di collagene IV rimodellando così la membrana basale della nicchia metastatica di neoformazione. Le BMDCs, che nel frattempo sono state reclutate dalla proteina LOX, aderendo al substrato di collagene IV, appena modificato dalla proteina LOX, rilasciano le proteine MMP-2 (metalloproteinasi) che degraderanno il collagene IV liberando peptidi di collagene IV che, esercitando una funzione chemiotattica, recluteranno altre BMDCs e le cellule tumorali. Il continuo susseguirsi di questi eventi porterà alla formazione delle metastasi. Alla luce di questi risultati la proteina LOX potrebbe essere un potenziale target terapeutico per il trattamento e la prevenzione delle metastasi (Erler et al, 2009).

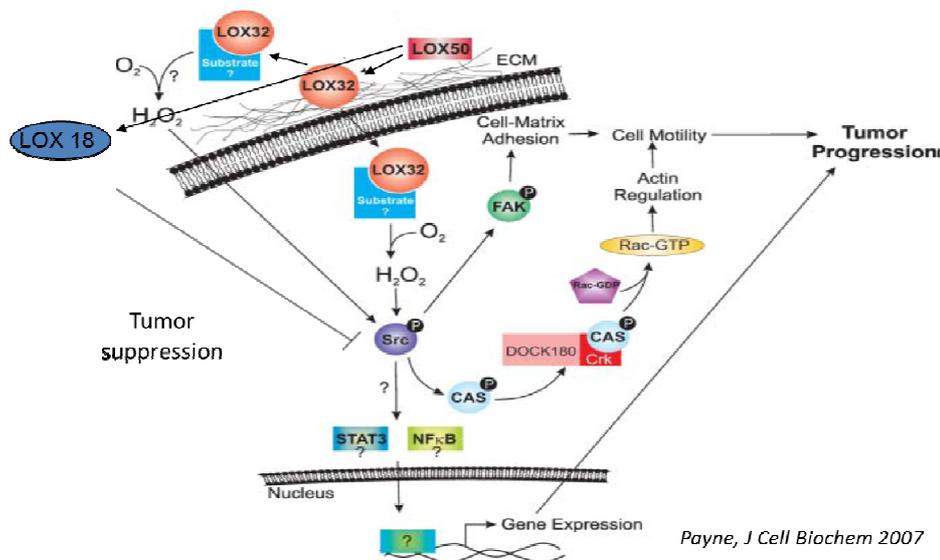


Figura 3: Funzioni della proteina LOX e LOX-PP. L'enzima LOX (32kDa) regola la matrice extracellulare e ha un ruolo nel riarrangiamento del citoscheletro e nella regolazione della migrazione cellulare. La proteina LOX-PP (18kDa) invece svolge una funzione inibitoria sui processi di progressione del tumore.

Altri target della proteina LOX

LOX reprime l'espressione della E-Caderina

Molti lavori in letteratura dimostrano che la proteina LOX interagendo con determinate proteine ne regola, attivandole o inibendole, l'attività biologica. Schietzke et al (2010) hanno dimostrato che in linee di carcinoma renale la proteina LOX, ma anche la proteina LOX-2, è necessaria e sufficiente per reprimere l'espressione della E-Caderina, la cui down-regolazione è un marker di transizione epitelio-mesenchimale e potrebbe favorire la progressione del carcinoma renale. Diversi studi hanno dimostrato che il livello di espressione della E-Caderina può essere regolato dallo stato del VHL e dall'espressione di HIF-1 α . Analisi di immunistochemica e di western blotting di campioni tissutali di carcinoma renale a cellule chiare e della controparte normale hanno messo in evidenza che la proteina E-Caderina è sempre overespressa nel tessuto normale, ma solo debolmente nel tumore. La proteina HIF-1 α è invece più espressa nel tumore come anche la proteina LOX, che sappiamo essere un diretto target di HIF-1 α . Peinado et al (2004) hanno dimostrato che le proteine della famiglia LOX (LOX, LOX-2) che reprimono la trascrizione della E-Caderina

formando dei complessi con Snail che è uno dei principali fattori di repressione trascrizionale della E-Caderina

LOX regola il segnale del fattore di crescita trasformante- β 1 (TGF- β 1)

L'enzima LOX, oltre a catalizzare i cross-link intra e intermolecolari del collagene e dell'elastina, sembra che abbia anche una funzione regolatoria su alcune proteine come il fattore di crescita fibroblastico (FGF) o le proteine istoniche (H1 o H2), ma anche su proteine presenti soprattutto nel tessuto osseo, come il fattore di crescita trasformante (TGF- β 1) o la bone morphogenetic protein (BMP) che upregolano l'espressione del collagene. In particolare, il TGF- β 1 stimola il reclutamento e la proliferazione dei progenitori degli osteoblasti ma ne inibisce lo stadio tardivo di differenziazione e la mineralizzazione della matrice ossea (Maeda et al, 2004). Atsawasuwana et al (2008) hanno dimostrato che l'enzima LOX, inibisce l'attività biologica del TGF- β 1. Saggi di immunoprecipitazione infatti hanno individuato un legame diretto tra le due proteine che colocalizzano nella matrice extracellulare di osteoblasti in coltura e quindi, in vivo, nella matrice ossea e precisamente nelle frazioni della matrice solubile e non associate ai minerali. L'overespressione di LOX in cellule MC (mouse calvaria-derived MC3T3-E1) inibisce quindi l'attività biologica del TGF- β 1, infatti diminuisce la fosforilazione di alcune proteine regolate da pathway TGF- β 1 dipendenti, come ad esempio Smad-3. Goto e colleghi (2005) però hanno dimostrato, in topi con glomerulonefrite cronica di fibrosi tubulo interstiziale, un meccanismo opposto, cioè un'incremento dell'attività enzimatica di LOX da parte del fattore di crescita trasformante (TGF- β). Topi con glomerulonefrite hanno un'overespressione del trascritto del TGF- β 1 e della sua corrispettiva proteina attiva e la stessa cosa è stata vista per l'mRNA e l'attività enzimatica della proteina LOX, prodotti entrambi dalle cellule epiteliali del tubulo renale. Infatti colture primarie umane di cellule epiteliali di tubulo prossimale renale trattate con quantità progressivamente più alte di TGF- β 1 mostravano un incremento della quantità del trascritto di LOX. Alla luce di questi risultati ottenuti, in un modello di fibrosi renale, il TGF- β 1, overespresso dalle cellule epiteliali tubulari, ha un effetto paracrino sulle cellule del tubulo differenziandole in miofibroblasti capaci di sintetizzare il collagene. Inoltre TGF- β 1 svolge anche un effetto autocrino, stimolando la produzione della proteina

LOX sulle cellule epiteliali tubulari. La proteina LOX una volta secreta favorirà la formazione dei cross-link tra le proteine della matrice contribuendo a creare una rete fibrotica attorno al tubulo renale.

Struttura e funzione di S100A4

La proteina S100A4 appartiene alla famiglia delle proteine S100, è una proteina legante il Ca^{2+} che generalmente si presenta, all'interno della cellula, come omodimero o eterodimero, nella matrice extracellulare, invece ha forma multimerica. Il gene S100A4 fa parte di un cluster genico del cromosoma 1q21. La proteina codificata ha un peso molecolare di circa 11,5 kDa, contiene due siti di legame per gli ioni Ca^{2+} che, legati alla proteina, determinano un cambiamento conformazionale con la formazione di una tasca idrofobica accessibile alla proteina-target. La proteina S100A4 è localizzata nel nucleo, nel citoplasma e nello spazio extracellulare. Molti dati in letteratura dimostrano che essa è soprattutto espressa nei tumori in stadi avanzati ma è anche presente in cellule normali come fibroblasti, monociti, macrofagi, granulociti e cellule endoteliali. Tra le tante proteine con cui interagisce, ricordiamo l'actina, la miosina non muscolare IIA e IIB e la tropomiosina. Se si trova nello spazio extracellulare tende invece a legarsi con proteine recettoriali della superficie cellulare. Molti studi sperimentali conferiscono alla proteina S100A4 differenti ruoli determinanti per la progressione tumorale. Dati in letteratura dimostrano che la proteina S100A4 è coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare, infatti la sua espressione incrementa notevolmente durante la fase S del ciclo cellulare, inoltre Parker e colleghi (1994) hanno dimostrato che la proteina S100A4 interagisce con la proteina p53, consentendo così alla cellula di passare dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. Studi sperimentali mostrano anche che la proteina S100A4 è coinvolta nella regolazione del processo apoptotico poiché modula la funzione biologica di alcune proteine come le caspasi, che vengono solitamente attivate o da un'alta concentrazione di Ca^{2+} intracellulare o da proteine leganti il Ca^{2+} come appunto la proteina S100A4. Tuttavia sequestrando la proteina p53 può anche inibire le attività pro-apoptiche. Altri studi hanno dimostrato anche una funzione opposta, la proteina S100A4 interagendo con p53 ne modula l'attività di oncosoppressore favorendo l'apoptosi della cellula (Boye et al, 2010).

S100A4, motilità ed invasione

La proteina S100A4 è stata principalmente studiata come una dei più importanti fattori che promuovono la migrazione cellulare, l'invasione e la metastasi. S100A4 interagisce con diverse proteine per modularne l'attività come ad esempio la proteina miosina IIA la cui organizzazione in filamenti nel citoplasma cellulare è essenziale per la motilità cellulare. Studi sperimentali hanno dimostrato che la proteina S100A4 incrementa il turnover dei filamenti di miosina IIA nella porzione apicale delle cellule migranti aumentandone la motilità (Li et al, 2006) Jenkinson et al (2004) hanno visto, in modelli in vivo, che, iniettando linee cellulari tumorali con diversi livelli di espressione della proteina S100A4, la formazione di metastasi era correlata in maniera statisticamente significativa col livello di overespressione della proteina S100A4. Inoltre, modelli animali in cui si ha la sola overespressione di S100A4 non vanno incontro a nessuna trasformazione neoplastica. E' probabile che la proteina legante il Ca²⁺ non svolga alcun ruolo nelle fasi di iniziazione e di crescita di un tumore primitivo.

S100A4 e altri target

S100A4 ed NF-κB

Il fattore di trascrizione NF-κB è uno dei più importanti fattori di trascrizione coinvolti nello sviluppo e nella progressione del cancro. In condizioni normali però viene trattenuto nel citoplasma dalla proteina inibitoria IκBs. L'attivazione della chinasi IKK (IκB chinasi) però fosforila la proteina inibitoria IκBs che non potendo legare NF-κB ne consentirà la traslocazione nel nucleo e quindi l'attivazione dei suoi geni target. Grotterod e colleghi (2010) hanno dimostrato che l'overespressione della proteina S100A4 extracellulare, in linee cellulari di osteosarcoma, stimola la fosforilazione e quindi l'attivazione della chinasi IKK, favorendo infine la traslocazione del fattore NF-κB con conseguente attivazione dei suoi target che favoriscono la progressione neoplastica.

S100A4 e proteine regolatorie, TGF-β1 e β-catenina

Xie et al (2009) hanno dimostrato che esiste un'ipotetica correlazione, anche se non diretta, tra l'espressione di S100A4, principale promotore della migrazione

e dell'invasione delle cellule tumorali, e il TGF- β 1. Il TGF- β 1 ha delle funzioni opposte a seconda degli stadi di progressione del tumore. Nelle fasi iniziali infatti inibisce la crescita delle cellule tumorali ma nelle fasi tardive promuove l'invasione e la metastasi. Nel carcinoma dell'endometrio è stato visto che la motilità e l'invasione, promosse dal trattamento con il TGF- β 1, sono mediate dalla proteina S100A4. Infatti, linee cellulari invasive di carcinoma dell'endometrio (HEC-1A), che hanno già alti livelli endogeni di S100A4, sia come trascritto che come proteina, se trattate con TGF- β 1 aumentano ancora di più il livello di espressione di S100A4 migrando di più. Inoltre, se nelle stesse cellule trattate con TGF- β 1 veniva silenziato S100A4, si osservava una significativa diminuzione della motilità e dell'invasione delle cellule tumorali. Anche nel caso del cancro al colon il livello di espressione del trascritto di S100A4 è maggiore negli stadi più avanzati. Stein et al (2006) hanno dimostrato che il gene S100A4, in linee cellulari tumorali di cancro al colon, è un diretto target della β -catenina che nelle fasi più avanzate del tumore del colon è soprattutto localizzata nel nucleo delle cellule tumorali. Anche in questo caso, la maggiore espressione di S100A4 favorirà, in vitro, la migrazione e l'invasione e in vivo la metastasi.

MATERIALI E METODI

Allestimento di colture primarie da tessuto renale normale e tumorale

Frustoli di corticale renale e tumore, ottenuti dai pezzi operatori della nefrectomia parziale o totale, vengono conservati a 4°C in DMEM low-glucose freddo addizionato di FBS 10%, penicillina/streptomina 1%, fungizone 1% ed L-glutamina 1%, fino al momento del processamento che viene effettuato comunque entro 24 ore dal prelievo dei campioni. I pezzi vengono lavati 4 o 5 volte con HBSS (Hank's buffer salt solution) a 4 °C e processati meccanicamente, così da ottenere piccoli frammenti da 1 mm³ circa. Questi ultimi vengono trasferiti in una falcon da 50 ml e risospesi in un volume di collagenasi IV (1.25 mg/ml in PBS, SIGMA-Aldrich) adeguato alla quantità di materiale. La sospensione così ottenuta, viene lasciata a 37°C per circa 1-2 ore (o comunque fino a completa digestione del tessuto), vortexando la falcon ogni 15 minuti. Al tessuto così digerito viene aggiunto il terreno completo (DMEM low-glucose 10%FBS, 1% penicillina/streptomina, 1% fungizone, 1% L-glutamina), per inattivare l'enzima. Si effettuano a questo punto due cicli di lavaggi in HBSS a 4°C centrifugazione a 1300 rpm 4 °C per 5 minuti, terminati i quali si piastra il materiale ottenuto in piastre petri da 100 mm con l'aggiunta di 7 ml del terreno completo già citato. Le cellule vengono incubate a 37°C in presenza del 5% di CO₂. Il giorno successivo al processamento le colture vengono lavate con PBS e riaddizionate con 7 ml di terreno completo che viene successivamente cambiato ogni 2-3 giorni. Il tasso di crescita cellulare viene stimato in base al tempo necessario affinché le cellule raggiungano la I e la II confluenza. La valutazione della morfologia cellulare viene invece effettuata analizzando e confrontando le immagini di diversi campi per ogni piastra, ottenute dall'osservazione al microscopio a contrasto di fase invertito Olympus CK40, con ingrandimento 100x (obbiettivo 10x e oculare 10x) e acquisite con Olympus Digital camera C-4040ZOOM. Tutti gli studi di espressione vengono condotti su cellule semiconfluenti (~90%). La tabella 1 mostra l'elenco dei pazienti e le caratteristiche dei corrispondenti tumori da cui sono state allestite le colture primarie per gli esperimenti descritti in questa tesi.

CAMPIONE	SESSO	ETA' alla Dx	pT	N	G	DIAGNOSI	HIF-1 α
25 MI	F	85	3a	x		RCC-cc misto	-
28 RA	M	63	1	x	2	RCC-cc	-
39	M	61	1b	x	2	RCC-cc	+
42	F	76	1a		2	RCC-cc	-
43	F	76	1a		2	RCC-cc	-
44	F	75	1b		2	RCC-cc	
46	F	83	1a		2	RCC-cc	+
56 SMC	F	65	2	0	2	RCC papillare di tipo I	-
59 RG	M	72	1b	X	2	RCC-cc	+
61 FG	M	56	1b	x	2	RCC-cc	+
63 BD	M	60	1	x		RCC papillare	-
66 SML	F	48	2	0	2	RCC-cc	+
70	M	63	1a		2	RCC papillare di tipo I	-
72 FG	M	59	1a	X	2	RCC-cc	+
74 GG	M	72	2	X	2	RCC-cc	+
77	F	64	3a		3	RCC-cc	+
77 FG	M	70	1b	x	2	RCC-cc	+
80	M	71	3a		3	RCC-cc	+
88 FC	M	57	3b	X	2	RCC-cc misto	-
93 ZG	M	76	1b	X	3	RCC-cc	+
95 RA	M	46	2	X	2	RCC-cc	+
105 APvF	M	47	1b	0	3	RCC-cc	+
106 CS	S	58	2	0	1	RCC-cc	+
113 NG	F	86	1a	X	2	RCC-cc	+
123 AA	F	84	1b	0	2	RCC-cc	+
146 MC	M	71	3a	0	3	RCC-cc	+
155 CB	M	82	3a	0	1	RCC-cc	+

Tabella 1: Caratteristiche dei pazienti e dei corrispondenti tumori. RCC-cc= carcinoma renale a cellule chiare, DX= diagnosi, G= grading tumorale, pTN= stadi azione tumorale.

FACS

Le colture primarie umane normali e tumorali, una volta allestite vengono caratterizzate fenotipicamente mediante FACS. I marker che vengono analizzati ci danno un'informazione sulla purezza delle colture ottenute e sulla composizione cellulare. I maratori utilizzati sono:

Citocheratina, che è considerata un marcatore di differenziamento epiteliale. L'anticorpo monoclonale anti-citocheratina (clone MNF116, Dako) (6ul in 100ul) riconosce le citocheratine dei filamenti intermedi costituenti il citoscheletro della maggior parte delle cellule epiteliali eucariotiche.

CD13 che è utilizzato come marcatore delle cellule epiteliali del tubulo renale prossimale. L'anticorpo monoclonale anti-CD13 (clone WM-59, Sigma) (5ul in 100ul) riconosce l'aminopeptidasi N o CD13 che è una glicoproteina transmembrana di tipo II di 150 kDa espressa nella maggior parte delle cellule di origine mieloide e in una quota di cellule epiteliali.

L'anidrasi carbonica 9 (CA9) viene usata come marcatore per quanto riguarda la natura tumorale delle cellule renali. La CA9 è uno dei più importanti marcatori del carcinoma renale espresso soprattutto nel sottotipo a cellule chiare, poco espresso nel sottotipo papillare e quasi mai individuabile nelle cellule normali renali. Per individuare l'anidrasi carbonica è stato usato l'anticorpo anti-CA IX (clone M75, gentilmente concesso da Silvia Pastorekova, Bratislava) (30ul in 100ul).

Di seguito verrà descritto il protocollo da seguire per la preparazione dei campioni per l'analisi al FACS. Una volta che le cellule hanno raggiunto la semiconfluenza, verranno tripsinizzate, risopese in terreno di crescita completo (DMEM low-glucose addizionato di FBS 10%, penicillina/streptomycin 1%, fungizone 1% ed L-glutamina 1%) e suddivise in aliquote da circa 500.000 cells/tubo. Si effettua così una centrifugazione a 1300 rpm per 5 min così da eliminare il surnatante e lasciare il pellet cellulare in incubazione per 15 min con 1 ml di soluzione FACS (NaN₃ 0.1%, FBS 5% in PBS), una soluzione di blocking che serve a coprire i siti aspecifici. Al termine del blocking verrà fatta un'ulteriore centrifugazione a 1300 rpm per 5 minuti, e nelle fasi successive, tra un'incubazione e l'altra, per rimuovere il surnatante e fissare le cellule in Formalin solution 10% Neutral Buffered (Sigma-Aldrich) per 15 minuti. Dopo il fissaggio le cellule verranno incubate per 15 min (al buio se si utilizzano uno o

più anticorpi già marcati con il fluorocromo) e a temperatura ambiente con gli anticorpi primari diluiti in saponina 0,1% (Sigma) sciolta nella soluzione FACS. Il controllo negativo verrà incubato solo con la soluzione. Prima di procedere con l'incubazione con l'anticorpo secondario, le cellule verranno lavate con 1ml della soluzione FACS e dopo aver tolto il surnatante le cellule verranno lasciate per 30 minuti a 4°C e al buio per l'anticorpo secondario anti IgG di topo coniugato al fluorocromo Alexa-488, diluito 1:100 nella soluzione FACS. Alla fine, dopo un ultimo lavaggio, le cellule verranno risospese in PBS 1X e conservate a 4°C fino al momento dell'analisi citofluorimetrica.

Gli anticorpi primari utilizzati sono tutti anticorpi monoclonali diretti verso le proteine umane e prodotti in topo. La fluorescenza dei campioni viene rilevata dallo strumento FACS Canto e l'acquisizione dei dati e la relativa analisi viene condotta mediante FACS Diva software (Becton Dickinson). Tutti i valori percentuali di espressione dei diversi marcatori sono stati calcolati analizzando un totale di 20.000 eventi (numero di cellule).

Estrazione delle proteine dalle colture

Le cellule al 90% di confluenza vengono lisate in piastra con una miscela costituita da un cocktail di inibitori di proteasi (Sigma), inibitori delle fosfatasi (Cocktail 2 e 3. Sigma) e buffer di lisi (Tris HCl 50 mM pH 7.4, NP-40 1%, DOC 0.25%, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM pH 7.4) in rapporto 1:100 in agitazione in ghiaccio per 5 min. Il lisato viene quindi raccolto in una eppendorf e dopo averlo mantenuto in ghiaccio per 30 min, verrà sottoposta agli ultrasuoni così da rompere tutte le membrane cellulari (Vibra cell Sonics e Materials, Amplitude 50). Infine una centrifugazione a 1300rpm per 5 minuti a 4°C servirà a far precipitare le membrane e tutto ciò che dovrà essere eliminato, il surnatante (il campione di proteine) verrà quindi raccolto in un'altra eppendorf e conservato a -80°C. Questi campioni includono le proteine di tutte le componenti cellulari, nucleo e citoplasma compresi. Per ogni campione sono state preparate anche le frazioni citoplasmatiche e nucleari purificate. In questo caso, dopo aver raccolto il lisato proteico dalla piastra si procede con una prima centrifugata di 13000 rpm per 15 minuti a 4°C. In questo modo precipiteranno tutti i nuclei e la componente citoplasmatica dei campioni cellulari rimarrà come surnatante. Al termine della centrifugazione, verranno separate le due componenti, il

surnatante, quindi la parte citoplasmatica, verrà trasferita in un'altra eppendorf e il pellet, cioè il nucleo, rimasto verrà lavato con PBS 1X (circa 100ul).

La frazione nucleare, ben risospesa in PBS 1X, viene ricentrifugata per 5 minuti a 13000 rpm a 4°C, il surnatante (PBS 1X) verrà scartato e il pellet nucleare verrà risospeso in una miscela costituita da un cocktail di inibitore delle proteasi (Sigma), inibitori delle fosfatasi (cocktail 2 e 3, Sigma) e RIPA Buffer (150mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Sodio deossicolato, 0,1% SDS e 50mM Tris HCl, pH 8.0)componenti) in rapporto 1:100.

Una volta risospeso il pellet nucleare, si procede con la sonicazione, come già descritto prima, sia della componente nucleare che citoplasmatica.

Infine i campioni, ora separati e sonicati, verranno ricentrifugati per 3 minuti a 13000 rpm a 4°C per raccogliere i surnatanti. I pellet di detriti vengono eliminati. I protocolli sopradescritti per l'estrazione di proteine da colture a confluenza sono stati usati anche per l'estrazione di proteine da campioni transfettati con siRNA dopo 48 ore di silenziamento.

Estrazione di proteine da medium di coltura

Per estrarre le proteine dal medium di coltura è fondamentale che esso non contenga siero, poiché l'albumina presente in alta percentuale compromette la corsa elettroforetica del campione proteico estratto. In questi casi infatti viene aggiunto alle piastre un terreno privo di siero così composto (DMEM-F12 con aggiunta di penicillina/streptomina 1%, glutammina 1%, 500ug/ml di insulina, transferrina e selenio, 5 ng/ml di T3, 5ug/ml di idrocortisone, 10 ng/ml di prostaglandina E1 e 10 ng/ml di EGF. Il terreno raccolto da una piastra di cellule a semiconfluenza, verrà centrifugato a 1300 rpm per 5 minuti per far precipitare ed eliminare i detriti. Il surnatante purificato verrà quindi trasferito in una falcon e conservato a -80°C fino al momento del suo successivo processamento. Per estrarre le proteine dal medium di coltura si procede quindi alla precipitazione overnight a -20°C in etanolo al 100% (circa 3ml di terreno in 4Volumi (12ml) di etanolo). Il giorno successivo si effettua una centrifugazione di 13000 rcf per 30 minuti a 4°C. Dopo di ciò verrà eliminata una parte del surnatante e il pellet di proteine, che si sarà depositato lungo tutta la parete del tubo, verrà risospeso con il restante surnatante (circa 1ml) e trasferito in una eppendorf. Si procede così con un'altra centrifugazione di 30 minuti a 13000 rcf per 4°C per poter

eliminare completamente il surnatante. Il pellet proteico verrà quindi fatto essiccare in una centrifuga a vuoto e poi sciolto in una miscela di NuPAGE® LDS Sample Buffer 1x (soluzione madre 4x; Invitrogen) e b-mercaptoetanololo (soluzione madre 4X/10), portato a volume con aggiunta di acqua deionizzata e infine scaldato a 70°C per 10 min. A questo punto il campione è pronto per essere caricato su gel.

Dosaggio proteine mediante metodo BCA

L'acido bicinconinico (BCA), sotto forma del suo sale sodico solubile in acqua, è un reagente solubile in acqua, sensibile, stabile ed altamente specifico per gli ioni Cu^+ . I legami peptidici e quattro aminoacidi (cisteina, cistina, triptofano e tirosina) sono considerati responsabili della produzione di colore nei campioni proteici dosati mediante BCA.

Il reattivo è costituito da una soluzione di solfato di rame alcalino contenente tartrato di sodio. Gli ioni Cu^{2+} vengono ridotti dai residui aminoacidici dei campioni proteici a ioni Cu^+ . La reazione di due molecole di BCA con uno ione Cu^+ sviluppa un colore violaceo con un massimo di assorbimento a 562 nm.

Reagenti:

Soluzione A

1000 ml di reagente base, che contiene carbonato di sodio, bicarbonato di sodio, reagente BCA e tartrato di sodio in 0,2 N NaOH.

Soluzione B

25ml di soluzione di solfato di rame 4%.

E' stata utilizzata una micro-plates contenente 96 pozzetti. Nella prima fila 2 pozzetti sono stati occupati dal bianco, costituito da acqua distillata per un volume di 10 μl in ciascun pozzetto.

Nei successivi 6 pozzetti è stato seminato il primo "standard" (albumina 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), in doppio, in questo modo:

2 μl (0,4 μg)

4 μl (0,8 μg)

10 μl (2 μg)

Nei seguenti 8 pozzetti è stato seminato il second "standard" (albumina 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), sempre in doppio, così:

2 μl (4 μg)

3 μl (6 μg)

5 μl (10 μg)

8 μl (16 μg)

A questo punto sono state seminate le opportune quantità di campioni, tutte in doppio.

Alla fine tutti i pozzetti, relativi agli “standard” e ai campioni, sono stati portati ad un volume finale di 10 μl con acqua distillata.

La miscela di reazione è stata preparata miscelando le soluzioni A e B nel rapporto 50:1 (soluzione X).

In ogni pozzetto sono stati aggiunti 200 μl di soluzione X e la piastra è stata messa a 37° C per 30 minuti. Trascorso tale tempo è stata fatta la lettura allo spettrofotometro dell'assorbanza a 562 nm tramite Microplate Reader 550, Bio-Rad.

Il contenuto proteico dei vari campioni è stato quantificato per mezzo di una analisi automatizzata di regressione lineare utilizzando una retta di taratura costruita grazie all'utilizzo degli “standard”.

Elettroforesi monodimensionale

I campioni vengono sciolti in una miscela di NuPAGE[®] LDS Sample Buffer 1x (soluzione madre 4x; Invitrogen) e NuPAGE[®] Reducing Agent 1x (soluzione madre 10x; Invitrogen), portati a volume con aggiunta di acqua deionizzata scaldati a 70°C per 10 min e caricati su gel (25 μg /pozzetto) insieme al marcatore di peso molecolare (Precision Plus Protein Standards, Biorad). L'elettroforesi viene fatta su gel di poliacrilamide NuPAGE[®] Novex[®] Bis-Tris Mini Gels (Invitrogen) in gradiente 4-12%, in un apparato XCell SureLockTM Mini-Cell (Invitrogen). La corsa viene condotta in presenza di 500 ml di NuPAGE[®] SDS Running Buffer 1x (25 ml di NuPAGE[®] MES SDS Running Buffer 20x in 475 ml di acqua deionizzata), ad un voltaggio costante di 200 V e ad un amperaggio di 120mA per circa 40 minuti (o comunque fino al raggiungimento del grado di separazione desiderato).

1D-Western Blot

Dopo la corsa elettroforetica il gel di poliacrilamide e la membrana di nitrocellulosa vengono assemblati in un "sandwich" con della carta assorbente e disposti all'interno della vaschetta di trasferimento, con la membrana rivolta verso il polo positivo del circuito. Il trasferimento viene effettuato in presenza di 200ml Transfer Buffer 1X (10ml di Transfer Buffer 20X, 30ml di Metanolo in 160ml di H₂O deionizzata) per 1 ora ad un amperaggio di 170 mA e un voltaggio di 30V.

Al termine del trasferimento la membrana viene prelevata, colorata con Ponceau solution (Sigma-Aldrich), per visualizzare l'effettivo trasferimento del materiale proteico e, in seguito a lavaggio in TBS Tween20 0.1% di circa 10 minuti, incubata per 1 ora con la soluzione di blocking per i siti aspecifici (TBS, Tween20 0.1%, latte in polvere 5% o BSA 5%, a seconda dell'anticorpo da usare dopo) a temperatura ambiente. Successivamente si incuba la membrana per tutta la notte a 4°C in agitazione con l'antico rpo primario, opportunamente diluito nella soluzione di blocking. La tabella 1 illustra tutti gli anticorpi utilizzati. Il giorno dopo la membrana viene sottoposta a 3 lavaggi, ognuno di 10 min, in TBS 1X con Tween20 0.1% e successivamente incubata per 1 ora in agitazione con l'anticorpo secondario (Pierce), anche questo diluito opportunamente nella soluzione di blocking (anti-IgG di topo 1:5000 o anti-IgG di coniglio 1:5000 per. Al termine dell'incubazione con l'anticorpo secondario, la membrana verrà sottoposta nuovamente a 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno. Gli anticorpi secondari utilizzati in western blot sono coniugati alla perossidasi di rafano (Horseradish peroxidase, HRP). La perossidasi di rafano è in grado di catalizzare la reazione di ossidazione del luminolo e di riduzione dell'H₂O₂. Pertanto è possibile utilizzare come tecnica di rilevazione il sistema ECL ("Enhanced Chemio-luminescence"), in base al quale il luminolo, ossidato in presenza dell'anticorpo secondario legato in maniera specifica, emette luce impressionando una lastra fotografica e permettendo così di rilevare la presenza della proteina d'interesse. La rilevazione dei vari target è stato ottenuto, utilizzando rispettivamente il Kit SuperSignal West Detection System Femto, Dura e Pico (Pierce) ed esponendo la membrana alla lastra autoradiografica per diversi periodi di tempo.

Alcune delle proteine di interesse hanno lo stesso peso molecolare quindi, se la membrana dovrà essere ibridata più volte, tra un'ibridazione e l'altra, verranno fatti dei lavaggi con Stripping Buffer (Pierce).

Per ottenere un dato quantitativo sull'intensità dei segnali rilevati, è stata condotta un'analisi densitometrica delle lastre autoradiografiche, che si è avvalsa dell'utilizzo del programma informatico Image J.

I valori di densità ottica (O.D.), ottenuti per ogni banda proteica presente nel lisato proteico del singolo campione, omogenato totale, frazione nucleare e frazione citoplasmatica, sono stati normalizzati per le OD delle proteine totali caricate (colorate con Ponceau). La banda proteica corrispondente alla tubulina e all'istone viene utilizzata per valutare il livello di purificazione della fase nucleare e citoplasmatica ottenute.

Anticorpo	Ospite	Ditta produttrice	Diluizione
HIF-1a	Mouse	BD Transd.Lab	1:500 in latte 5%
E-caderina	Mouse	BD Trans.Lab	1:2500 in latte 5%
b-catenina	Mouse	Dako	1:1000 in latte 5%
Pro-LOX/LOX	Rabbit	Abcam	1:500 in latte 5%
Actina	Rabbit	Sigma	1:1000 in latte 5%
Tubulina	Mouse	Dako	1:1000 in latte 5%
Istone	Rabbit	Dako	1:1000 in latte 5%
S100A4	Rabbit	Dako	1:2000 in latte 5%
LOX-PP	Rabbit	Novus Biologicals	0,70ug/ml in BSA 5%

Tabella 2: Elenco degli anticorpi utilizzati per il western blot. Per ogni anticorpo sono stati indicati ospite, ditta produttrice e diluizione utilizzata.

Estrazione di RNA mediante Trizol®

Le cellule al raggiungimento della semiconfluenza vengono lisate su piastra con 1 ml di Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) per 5 minuti a temperatura ambiente. Vengono quindi aggiunti 0,2 volumi di cloroformio e, dopo breve agitazione su vortex, i campioni vengono centrifugati a 12000 rpm per 15 minuti a 4-8°C. Il sovrantante acquoso viene trasferito in un nuovo tubo, al quale vengono

aggiunti 0,5 volumi di alcool isopropilico. Il pellet di RNA, ottenuto da una seconda centrifugazione a 12000 rpm per 10 minuti a 4-8°C, viene lavato con un volume di etanolo al 75%, essiccato, risospeso in H₂O precedentemente trattata con DEPC (diethylpyrocarbonate), e dosato al Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer) che ci dà, oltre alla concentrazione del campione di RNA in esame (ng/ul), i rapporti di assorbanza A260/A280 e A260/A230 che, se i campioni sono qualitativamente buoni e ben puliti, saranno compresi tra 1,7 e 2.

Estrazione di RNA mediante QIAzol

Le cellule sottoposte a silenziamento genico invece sono state lisate su piastra con 700 ul di QIAzol Lysis Reagent (Qiagen). Si procederà poi all'estrazione dell'RNA mediante un apposito kit (miRNAeasy Mini Kit) dotato di colonnine con membrana silicica su cui verranno adsorbite le molecole di RNA che, dopo alcuni lavaggi con specifici buffer, verranno eluite con H₂O-DEPC. L'utilizzo del kit consente di estrarre una sufficiente quantità di RNA a partire da campioni con poche cellule . Una volta estratto l'RNA si procederà con il dosaggio mediante Nanodrop.

Sintesi di cDNA

Un'aliquota di 1 µg dell'RNA estratto viene retrotrascritta a cDNA in un volume finale di 20 µl in una miscela di reazione contenente random primers 10X, RT Buffer 10X; dNTPs mix 25X 100mM, MultiScribe TM Reverse Transcriptase e portata a volume finale con H₂O DEPC. La reazione prevede quattro steps: 10 min a 25°C, per favorire l'annealing dei primers ai filamenti di RNA; 120 minuti a 37°C, per la reazione di sintesi del cDNA e 5 minuti a 85°C per inattivare la trascrittasi inversa. Una volta terminata la retrotrascrizione i campioni di cDNA verranno conservati a -20°C fino al loro utilizzo.

Real-time PCR

La Real-time PCR permette la quantificazione dei prodotti di PCR nel momento stesso in cui questi compaiono nella miscela di reazione. Questo scopo viene raggiunto grazie all'impiego di particolari sonde o coloranti, che permettono di visualizzare in tempo reale il procedere della reazione. La fluorescenza emessa dalle sonde, infatti, aumenta in maniera proporzionale alla quantità di

amplificato presente e, pertanto, essa risulta correlata in maniera direttamente proporzionale alla quantità di template presente all'inizio della reazione.

Visualizzando quindi la quantità di fluorescenza emessa ad ogni ciclo è possibile individuare la fase esponenziale della reazione di amplificazione nella quale si ha un aumento significativo (il segnale supera il rumore di fondo di circa 3 deviazioni standard) e direttamente proporzionale (la curva si linearizza) del segnale, che solo in questa fase è correlabile alla quantità di target presente.

Le sonde utilizzate in questo lavoro sono sonde di tipo Taqman (Applied Biosystem). Le sonde Taqman sono sequenze lineari del tutto complementari alla sequenza bersaglio e si basano sul principio della FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) per l'emissione della fluorescenza. Esse sono coniugate alle estremità 5' e 3' rispettivamente con un reporter, che emette fluorescenza se eccitato, e un quencher che smorza la fluorescenza emessa dal reporter. Un'architettura di questo tipo non permette alcuna emissione di fluorescenza rilevabile finché la sonda resta intatta, in quanto il quencher assorbe la fluorescenza emessa dal reporter. Una volta ibridate alla sequenza target, queste sonde vengono però idrolizzate dall'attività esonucleasica della Taq polimerasi e l'idrolisi comporta la separazione del reporter dal quencher, permettendo quindi l'emissione della fluorescenza.

Nel caso specifico il reporter legato alla sonda è il fluorocromo FAM (6-carboxy-fluorescein). Come quencher è stato invece utilizzato il fluorocromo TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine). Le variazioni di fluorescenza non correlate alla reazione di PCR vengono normalizzate mediante il fluoroforo interno ROX (6-carbossi-N,N,N',N'-tetrametilrodamina).

Primer e probes

I primers e le probes utilizzati in Real-time PCR devono rispondere ad alcuni requisiti fondamentali, per assicurare la buona riuscita del saggio.

La sonda deve avere un contenuto di G+C attorno al 40-60%, non può terminare con una G, non può contenere regioni complementari a quelle dei primers e può essere lunga 9-40 bp, se legata ad un quencher fluorescente, o al massimo 20 bp, se è una sonda MGB (minor groove binding). La temperatura di melting della sonda deve essere di almeno 5°C più alta della temperatura di

melting dei primer, in modo da garantire l'*annealing* della sonda alla sequenza target prima che inizi l'estensione dei primers.

La lunghezza dei primers è compresa tra 9-40 bp, con una concentrazione di G+C del 30-80%. La dimensione massima dell'amplicone non deve superare le 400 bp, anche se la dimensione ideale è compresa tra le 50 e le 150 bp. Infine se si desidera eliminare la possibilità che venga amplificato/visualizzato anche il DNA genomico eventualmente presente, è possibile disegnare dei primers o delle probes che riconoscano regioni a cavallo tra due esoni adiacenti.

La concentrazione ottimale della probe è 50-200 nM mentre per i primers la concentrazione ottimale varia da 100 a 900 nM. Si è soliti ottimizzare le concentrazioni dei primers utilizzando una griglia di concentrazioni differenti dei singoli primer (50, 300, 900 nM) in modo da vagliare tutte le possibili combinazioni di concentrazione e trovare quella che meglio si adatta alla cinetica della reazione.

Per la valutazione in Real-time PCR dell'espressione di LOX (Hs00942480_m1), S100A4 (Hs00243202_m1), E-caderina (Hs01013953_m1), Snail (Hs00195591_m1), TGF- β 3 (Hs01086000_m1), Zeb-2 (Hs00207691_m1) e del gene housekeeping GAPDH (Hs99998805_m1) sono stati usati TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystem), i cui codici sono stati indicati tra parentesi. I primers e le probes utilizzate amplificano e rilevano, nei diversi trascritti analizzati, le regioni comuni alla maggior parte delle diverse isoforme dei corrispondenti trascritti.

Condizioni di reazione e analisi dei dati

L'amplificazione è stata condotta in un ABI PRISM 7900HT Sequence Detector (Applied Biosystems). 100 ng di cDNA vengono amplificati in 20 μ l totali di reazione, contenenti Universal PCR master mix 1x (Applied Biosystem) e opportune concentrazioni di primers e probes. Come controllo interno della reazione e dell'efficienza della retrotrascrizione viene quantificato il trascritto del gene housekeeping umano della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (huGAPDH), la cui espressione è stata dimostrata essere relativamente stabile nel tempo in diverse condizioni di coltura e in diversi campioni da un'analisi precedentemente condotta in comparazione con altri geni housekeeping su

cellule epiteliali renali in coltura. Il dosaggio è stato eseguito in duplicato per ognuno dei campioni.

Le condizioni di reazione, in accordo con le linee guida (Applied Biosystem), sono state le seguenti: preincubazione iniziale di 2 min a 50 °C, per attivare l'AmpErase uracil-N-glycosylase (UNG); pre-incubazione di 10 min a 95°C, per l'attivazione dell'AmpliTaq Gold DNA polymerase; una serie di 40 cicli di 15 sec a 95°C e, infine, 1 min a 60°C.

Il software ABI7900 system fornisce le curve che descrivono l'andamento della reazione per ciascun campione. Una volta sistemati i parametri del grafico ottenuto, si può ricavare per ogni campione il valore di C_T (ciclo soglia), che rappresenta il ciclo più basso in corrispondenza del quale si può iniziare a rilevare una fluorescenza che sia al di sopra del rumore di fondo. Il C_T è inversamente correlato alla quantità iniziale di cDNA, maggiore è la quantità di amplificato prodotto, minore è il C_T . I valori di espressione genica dopo l'amplificazione sono stati calcolati utilizzando il metodo dei C_T comparativi descritti nell'User Bulletin No. 2 (Applied Biosystems). I nostri dati, che quindi esprimono il livello di espressione dell'mRNA target, sono stati espressi dalla formula $2^{-\Delta C_T}$ che serve a calcolare l'espressione del gene target normalizzata. Questo viene ottenuto sottraendo il valore medio del C_T del gene housekeeping (GAPDH) al valore medio del gene target allo scopo di ottenere il corrispondente valore di ΔC_T . Questi calcoli sono stati effettuati utilizzando il software RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems).

Silenziamento genico mediante tecnica dell'RNA interference

Il silenziamento genico è un meccanismo che, mediante la tecnica dell'RNA interference, inibisce l'espressione di uno specifico gene, poiché degrada il suo corrispondente mRNA, impedendo così la sintesi della proteina per cui codifica. Nel caso del silenziamento genico della lisil ossidasi messo a punto nei nostri esperimenti, la metodica ha utilizzato un pool di siRNA. , piccoli frammenti di RNA a doppio filamento costituiti da 19-21 nucleotidi che, riconoscendo l'mRNA target, vi si legano e ne causano la degradazione. Il pool di siRNA entra nella cellula mediante un meccanismo di trasfezione. Nei nostri esperimenti abbiamo utilizzato, come agente trasfettante, l'Interferin (Euroclone-Dharmacon), una molecola liposomica che ingloba, durante un adeguato tempo di incubazione in

terreno di coltura senza siero, le molecole di siRNA e successivamente, a contatto con le cellule, si fonde con la membrana cellulare per rilasciare gli oligonucleotidi nel citoplasma.

Una volta localizzati nel citoplasma cellulare, i siRNA vengono riconosciuti dal complesso proteico RISC (RNA induced silencing complex) che svolge numerose funzioni grazie ai suoi molteplici domini, come il dominio di esonucleasi, di endonucleasi, di ricerca di regioni omologhe, e il dominio di elicasi.

Il complesso RISC quindi lega la molecola siRNA e la “srotola” in modo che il suo filamento antisenso sia disponibile per riconoscere e legare mRNA-target.

A questo punto si riformeranno piccole porzioni di RNA a doppio filamento che consentiranno la degradazione dell’mRNA-target da parte del complesso RISC.

L’utilizzo di un pool di siRNA, aumenta, teoricamente, la probabilità di degradazione del target d’interesse, poiché i singoli siRNA si andranno a legare a regioni diverse del filamento dell’mRNA–target.

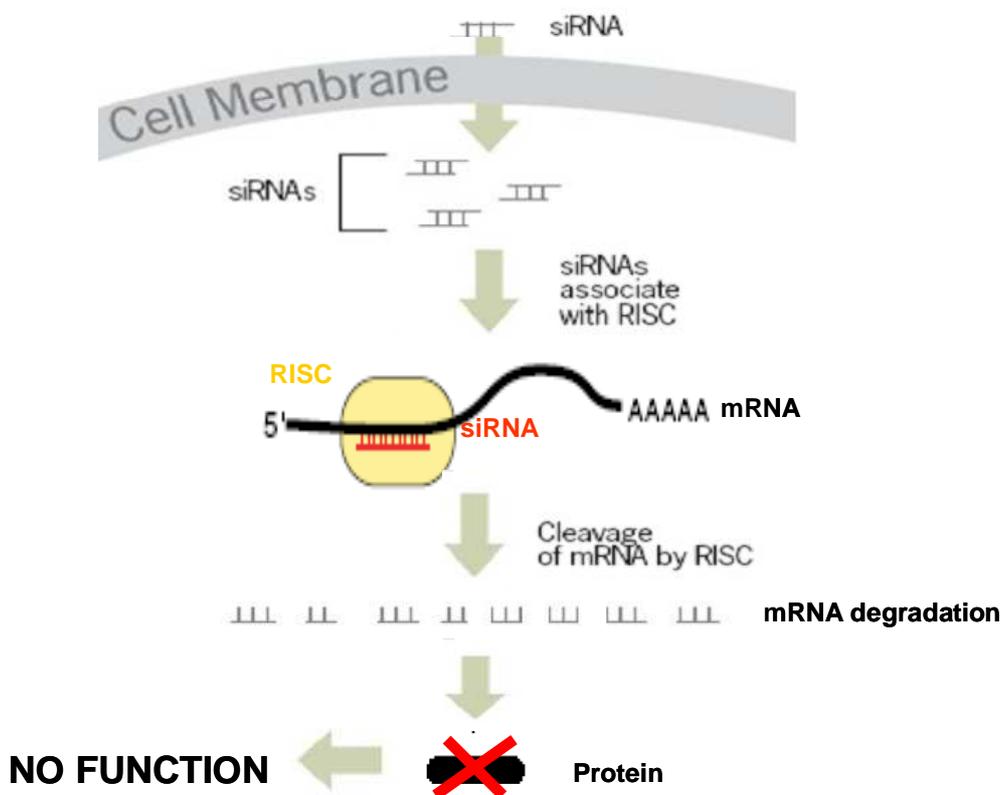


Figura 4: L’immagine rappresenta il meccanismo dell’RNA interference mediante siRNA dove la degradazione dell’mRNA target impedisce la sintesi della corrispettiva proteina.

Protocollo dell'RNA interference applicato alle colture primarie umane normali e tumorali

Le cellule delle colture primarie umane, che hanno raggiunto la prima confluenza, vengono tripsinizzate e risospese in terreno di coltura fresco per essere contate. Il numero delle cellule da piastrare, per gli esperimenti di silenziamento genico, dipende dalla superficie della piastra in cui verranno fatte crescere.

Per estrarre l'RNA e le proteine e per i saggi di migrazione e d'adesione, sono state usati i pozzetti delle multiwell da 6 in cui sono state piastrate circa $18 \cdot 10^4 / 20 \cdot 10^4$ cellule per pozzetto; per il saggio dell'MTT, invece, per cui sono stati usati i pozzetti della multiwell da 12, sono state piastrate circa $8 \cdot 10^4 / 9 \cdot 10^4$ cellule. Dopo aver aggiunto del terreno fresco di coltura (DMEM low glucose con 10% FCS, 1% glutamina, 1% di streptomicina/penicillina e 1% fungizone) le cellule verranno lasciate in incubatore a 37°C e solo quando raggiungeranno una confluenza di circa il 60% si potrà procedere con il silenziamento genico transiente mediante siRNA. Nonostante questa metodica garantisca un'altissima efficienza di silenziamento, la durata dell'inibizione del target è massima alle 48 ore ma non più garantita dopo le 72 ore. Tutti i nostri esperimenti, che verranno ampiamente descritti nella sessione dei Risultati, sono stati effettuati a 48 ore dal trattamento con siRNA.

Per prima cosa si iniziano a preparare i complessi trasfettanti, la cui miscela contiene terreno di coltura privo di siero con 1% di glutamina, 1% di penicillina-streptomicina e 1% di fungizone, l'agente trasfettante-liposomico Interferin (Dharmacon) e il pool di siRNA sciolti in H₂O DEPC ad una concentrazione finale di 30nM. Negli esperimenti illustrati in questa tesi sono stati usati, per il silenziamento genico della lisil ossidasi (LOX), un pool di siRNA specifici per il target in esame (Human Dharmacon ON-TARGET plus SMART pool (cod:DHL002000000005), Dharmacon). I campioni controllo sono stati invece trattati con un pool di siRNA aspecifici, da noi definiti, nella descrizione di tutti gli esperimenti, siRNA_CTRL (ON-TARGET plus Non targeting siRNA (cod: DHD0018101005), Dharmacon).

La miscela così preparata viene incubata a temperatura ambiente per dieci minuti, in questo modo gli agenti liposomici incorporeranno le molecole di siRNA. Dopo dieci minuti di incubazione gli agenti trasfettanti formati verranno

aggiunti alle cellule in coltura, e il tutto verrà lasciato in incubatore a 37°C per 48 ore. Dopo le 48 ore si procederà con l'estrazione dell'RNA e l'estrazione delle proteine, seguendo i protocolli illustrati nei paragrafi precedenti, e con l'allestimento dei saggi funzionali di seguito descritti.

Saggi funzionali condotti sulle colture dopo silenziamento genico

Valutazione della vitalità cellulare mediante saggio MTT

La vitalità cellulare è stata valutata tramite il monitoraggio colorimetrico della conversione del Thiazol Blue tetrazolium Blue (MTT) a Formazan da parte della deidrogenasi mitocondriale. Le cellule vengono sottoposte al saggio MTT dopo 48 ore dal silenziamento genico. Dopo eliminazione del terreno di crescita viene aggiunto ad ogni pozzetto 1 ml di DMEM senza siero contenente 0,5mg/ml di MTT e le cellule vengono quindi incubate per 1h e 30 minuti a 37°C. In seguito il medium contenente l'MTT non metabolizzato dalle cellule viene eliminato e viene aggiunto 1 ml di DMSO ad ogni pozzetto per lisare le cellule e per solubilizzare il Formazan prodotto dalla metabolizzazione cellulare. 100ul della soluzione di DMSO e Formazan vengono successivamente prelevati da ogni pozzetto e analizzati in triplicato in multi-wells da 96 mediante lettura allo spettrofotometro Microplate Reader 550 (Bio-Rad) alla λ di 570nm. I risultati vengono espressi come valore medio \pm SEM di sei esperimenti indipendenti, nel caso delle colture di cortex, e otto nel caso delle colture tumorali. Ogni campione, analizzato in triplicato, è stato normalizzato rispetto al proprio controllo. I dati rappresentati nel grafico sono espressi come percentuale di assorbanza ponendo il campione controllo pari a 100%.

Saggio d'adesione cellulare

Il saggio, condotto su piastre di 96 pozzetti, è servito a valutare la capacità di adesione alla plastica e alla fibronectina delle cellule silenziate per la lisil ossidasi rispetto ai loro controlli. I pozzetti ricoperti da fibronectina (10 μ g/ml in H₂O, Sigma) sono stati preparati 24 ore prima e lasciati over night a 4° C. Il giorno dopo tutti i pozzetti, ricoperti da fibronectina e non, sono stati incubati per 1 h a 37°C con una soluzione di blocking (BSA 5% in PBS) che serve a coprire

i siti aspecifici.

Le cellule di cortex e di RCC, silenziate per 48 ore con siRNA specifici per la lisil ossidasi e con siRNA di controllo, sono state staccate dalla piastra di coltura per tripsinizzazione e contate. Quindi in ogni pozzetto ricoperto o meno sono state piastrate $3 \cdot 10^4$ cellule risospese in terreno completo DMEM low-glucose 10% FBS fino ad un volume finale di 150 μ l. Le cellule, incubate a 37°C in presenza di 5% di CO₂, vengono lasciate adese alla superficie della piastra per 30 minuti. Una volta aspirato il terreno, le cellule adese sono state fissate con Formalin Solution 10% Neutral Buffered (Sigma-Aldrich) per ulteriori 30 minuti. Dopo alcuni lavaggi in PBS 1X è stato aggiunto il colorante cristal violet (0,05% in metanolo 20%) per 20 minuti a temperatura ambiente, per colorare le cellule adese alla piastra. Dopo i 20 minuti di incubazione i pozzetti vengono bene puliti e infine trattati con una soluzione di lisi (SDS 1% in H₂O), che rompe le cellule adese, favorendo il rilascio del colorante da esse incorporato. La lettura del lisato tramite spettrofotometro Victor (Victor³ PerkinElmer) ci fornisce i dati di assorbanza (550nm) che sono proporzionali alla quantità di cristal violet presente in ogni pozzetto dandoci così una stima delle cellule che hanno aderito alla piastra nelle diverse condizioni sperimentali. I risultati vengono espressi come valore medio \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. Ogni campione, analizzato in triplicato, è stato normalizzato con il rispettivo bianco (valore di assorbanza ottenuto dalla piastra di plastica o ricoperta di fibronectina senza l'aggiunta di cellule). I dati rappresentati nel grafico sono espressi considerando il campione controllo pari a 1 e il campione trattato normalizzato rispetto al controllo.

Saggio di migrazione mediante camera di Boyden

La capacità migratoria delle colture primarie umane, normali e tumorali, silenziate con siRNA_CTRL e siRNA_LOX, è stata valutata mediante camera di Boyden alloggiata in piastre da 24 pozzetti (Corning). La camera è dotata di una membrana contenente pori del diametro di 8 μ m. Il saggio di migrazione viene condotto dopo 48 ore dal silenziamento. Le cellule silenziate vengono staccate dalla piastra di coltura e contate. Nel compartimento inferiore della camera vengono aggiunti 400 μ l del terreno in cui erano state le cellule durante le 48 ore di silenziamento, nel compartimento superiore vengono piastrate $2 \cdot 10^4$

cellule risospese nello stesso terreno di coltura, fino ad un volume di 200 μ l. Dopo aver preparato il tutto, le cellule vengono lasciate migrare in incubatore per 6 ore. Al termine del tempo di incubazione, si procede con il fissaggio e la colorazione delle membrane per visualizzare le cellule che hanno oltrepassato i pori della membrana.

Per prima cosa viene aspirato il terreno sia sopra che sotto la camera e si procede col fare due lavaggi in PBS1X. Successivamente, le cellule presenti nella camera vengono fissate per 10 minuti in Metanolo (100%, conservato a -20°C). Dopo il fissaggio, si lascia la membrana per sei minuti in Ematossilina, colorante basico che colora in blu il nucleo. Successivamente la membrana verrà lavata in acqua distillata e dopo si procede per tre minuti con la seconda colorazione, in Eosina, colorante acido che serve per la colorazione del citoplasma. Per finire, si effettua un secondo lavaggio e si lascia quindi la membrana ad asciugare. Prima di staccare la membrana dalla camera si pulisce bene, con un cotton-fioc, il suo compartimento superiore affinché tutte le cellule che non hanno oltrepassato la membrana vengano tolte. Quindi, la membrana viene staccata e montata su un vetrino portaoggetti con olio (Immersion Oil 518F, Zeiss) e poi ricoperta da un vetrino coprioggetto. Per l'analisi quantitativa, vengono fatte delle foto al microscopio (Leica DMIL, 20X). Per ogni membrana sono state scelte casualmente dieci diverse zone. La conta delle cellule migrate è stata fatta col supporto del software Image J. I risultati vengono espressi come valore medio \pm SEM di cinque esperimenti indipendenti, nel caso delle colture di cortex, e sei nel caso delle colture tumorali. Ogni campione, analizzato in duplicato, è stato normalizzato rispetto al proprio controllo. I dati rappresentati nel grafico sono espressi come percentuale di cellule migrate, ponendo il campione controllo pari a 100%.

Analisi statistica

Per tutti gli esperimenti, l'analisi statistica è stata condotta con T-Test a due code mediante Microsoft Excel. Sono state considerate statisticamente significative le differenze con $p < 0,05$.

SCOPO DELLA RICERCA

Il carcinoma renale rappresenta circa il 3% dei tumori maligni dell'adulto (Klatte et al, 2007). Esso si può presentare in vari sottotipi istologici, di cui quello a cellule chiare (RCCcc) è di gran lunga il più frequente. Il carcinoma renale a cellule chiare, che ha origine dalle cellule dell'epitelio del tubulo prossimale, è molto vascolarizzato e presenta diverse anomalie molecolari come l'inattivazione biallelica dell'oncosoppressore VHL (von Hippel-Lindau) (William et al, 2008) che si manifesta nell'80% delle forme sporadiche di RCCcc. L'inattivazione biallelica del VHL è responsabile dell'espressione costitutiva del fattore inducibile dall'ipossia (HIF) che, come fattore di trascrizione, indurrà l'espressione di molteplici geni target che codificano per proteine coinvolte nella proliferazione, migrazione e invasività cellulare e nel processo angiogenico e metastatico. Fra i target di HIF descritti in letteratura e coinvolti nella migrazione cellulare e nel processo metastatico troviamo la lisil ossidasi (LOX) che è un enzima che agisce sia a livello extracellulare che intracellulare, ed S100A4, che è una proteina legante il Ca^{2+} coinvolta nelle fasi più avanzate della progressione tumorale e in particolare nella migrazione, invasione e metastatizzazione di diversi tipi di carcinoma come quello mammario, dell'ovaio e del colon. Il trascritto del gene LOX, che risulta overespresso nella maggior parte delle neoplasie, viene inizialmente tradotto come precursore di 50 kDa (pro-LOX) che, secreto nella matrice extracellulare, subirà un taglio proteolitico liberando due proteine, la proteina LOX-PP (18 kDa) e l'enzima attivo LOX (32 kDa). La proteina LOX-PP funge da oncosoppressore inibendo numerosi pathways molecolari come quello di PI3k/Akt e Raf/MEK che altrimenti, come visto in cellule di carcinoma mammario, favorirebbero la crescita, la proliferazione cellulare e la migrazione cellulare stimolata dalla fibronectina. L'attività enzimatica di LOX, invece, ha una funzione pro-oncogenica, con un ruolo prevalente nella stimolazione della migrazione cellulare, in quanto, a livello intracellulare, come visto nelle cellule di carcinoma mammario, è coinvolta in numerosi pathways che favoriscono la formazione di strutture pro-migratorie come le adesioni focali e i lamellipodi (Payne et al, 2005). Altri studi mostrano che l'enzima LOX è anche coinvolto nelle fasi più avanzate della progressione tumorale, quindi nell'invasività e nella formazione delle metastasi

come nel caso del carcinoma polmonare e dell'esofago. L'obiettivo iniziale del nostro studio è stato quello di caratterizzare, nel modello di colture primarie di cortex renale e di RCC già ampiamente caratterizzate (Bianchi et al, 2010), l'espressione dei trascritti e delle proteine di questi target molecolari e verificare se, anche nel contesto renale, la loro espressione fosse correlata all'espressione di HIF-1 α . Inoltre, dato il ruolo molteplici e complesso svolto dai diversi prodotti proteici del gene LOX descritto in letteratura per diversi tipi di carcinoma, abbiamo voluto valutare l'effetto, a livello molecolare e funzionale, prodotto dal suo silenziamento mediante RNA Interference nelle colture primarie renali normali e tumorali. In particolare abbiamo analizzato, mediante Real time PCR e Western blot, l'effetto del silenziamento della lisil ossidasi sull'espressione di S100A4 e di E-Caderina, anch'essa coinvolta, quando downregolata in modo HIF-dipendente, nell'organizzazione di un fenotipo mesenchimale ed invasivo nelle cellule tumorali di origine epiteliale. Abbiamo inoltre verificato se il silenziamento della LOX potesse avere effetti anche sulla vitalità, adesività e motilità cellulare delle nostre colture renali normali e tumorali, mettendo a punto specifici saggi di MTT, di adesione su substrati diversi e di migrazione cellulare in camera di Boyden. Tali studi nel complesso tendono a valutare il coinvolgimento della proteina attiva LOX nei pathway molecolari importanti per la progressione del carcinoma renale e quindi un suo eventuale ruolo come target terapeutico

RISULTATI

Caratterizzazione molecolare delle colture primarie renali normali e tumorali

Valutazione, mediante Real time PCR, del livello di espressione dei trascritti di LOX, S100A4 ed E-Caderina nelle colture primarie di carcinoma renale e nella loro controparte normale

Numerosi studi in letteratura hanno messo in evidenza che il trascritto della lisil ossidasi (LOX) è un target diretto dell'attività trascrizionale di HIF-1 e in molti tipi di carcinoma è descritto essere overespresso rispetto alla controparte normale. Abbiamo quindi voluto valutare il livello di espressione di questo target, mediante Real time PCR, in colture primarie umane di carcinoma renale, prevalentemente del sottotipo a cellule chiare ma anche in alcuni campioni di tipo papillare o misto. L'analisi, condotta stratificando i campioni tumorali in HIF-1 α positivi e HIF-1 α negativi (Figura 5), mostra che il trascritto di LOX è significativamente overespresso nei campioni tumorali rispetto alle controparti normali solo nel gruppo HIF-1 α positivo ($p= 0,00012$) e non nel caso di RCC HIF-1 α negativo ($p= 0,2493$) (Figura 6). Quindi anche nel carcinoma renale l'espressione del trascritto della lisil ossidasi risulta correlata al livello di HIF-1 α .

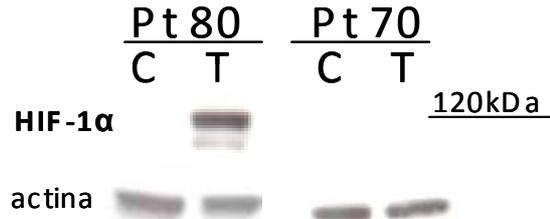
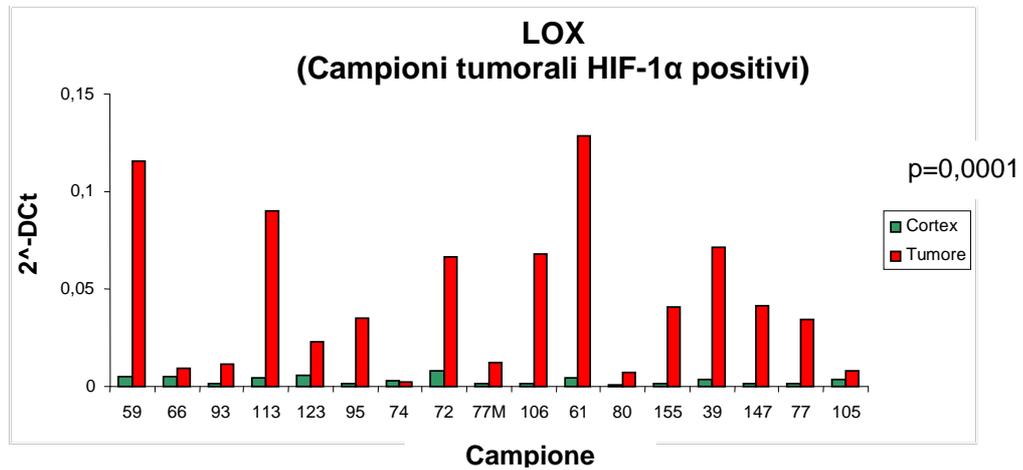


Figura 5: Western Blot rappresentativo dei lisati di due coppie di colture primarie renali normali e tumorali corrispondenti a omogenato totale. In ogni pozzetto sono stati caricati 25 μ g di proteine per ogni campione. Lo stesso filtro è stato ibridato con l'anticorpo anti-HIF-1 α e anti-actina usata come normalizzatore di caricamento.

a)



b)

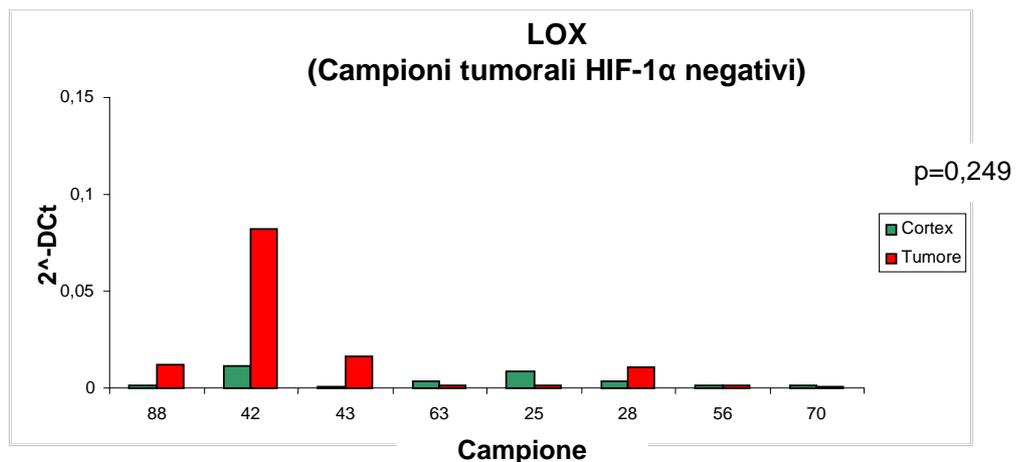
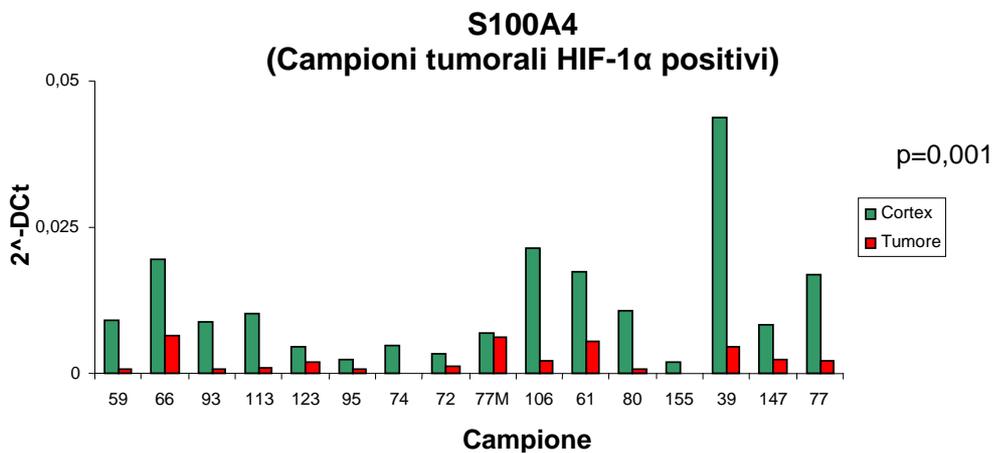


Figura 6: Analisi quantitativa mediante Real time PCR del trascritto di LOX condotta su coppie di colture renali normali e tumorali HIF-1 α positive (a) e HIF-1 α negative (b). I valori nei diversi campioni indicati sono espressi con $2^{-\Delta C_t}$.

Negli stessi campioni è stato analizzato, sempre mediante Real time PCR, il trascritto di S100A4, descritto anch'esso in letteratura come un target dell'attività trascrizionale di HIF-1. La proteina S100A4, come la lisil ossidasi, è coinvolta nella motilità cellulare ed è indice di invasività e di metastatizzazione in diversi tumori come quello mammario. L'analisi da noi condotta (Figura 7) tuttavia evidenzia che il trascritto di S100A4 è downespresso in maniera significativa nelle colture tumorali, sia in quelle HIF-1 α positive ($p= 0,001$) che HIF-1 α negative ($p= 0,028$), rispetto alla controparte normale, risultato questo in contrasto con i dati della letteratura ottenuti però su altri tipi cellulari.

a)



b)

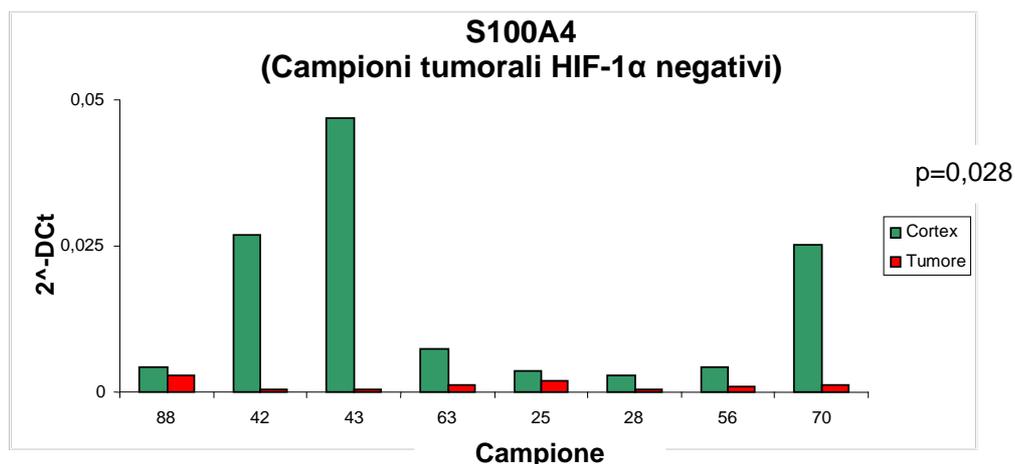
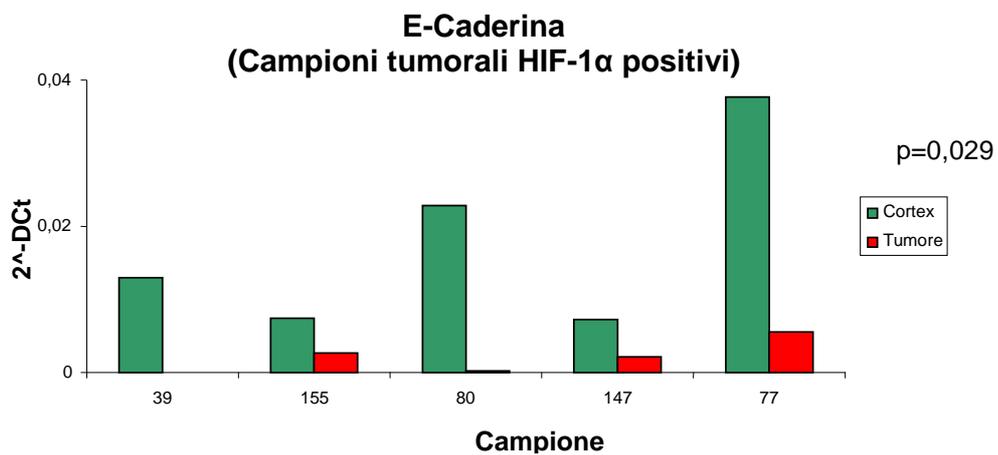


Figura 7: Analisi quantitativa mediante Real time PCR del trascritto di S100A4 condotta su coppie di colture renali normali e tumorali HIF-1 α positive (a) e HIF-1 α negative (b). I valori nei diversi campioni indicati sono espressi come 2^{-DCt} .

Il terzo trascritto, la cui espressione è stata analizzata nelle nostre colture, è quello del marcatore epiteliale E-Caderina, descritto in letteratura come indirettamente regolato da HIF-1. Infatti HIF-1 induce l'espressione dei geni repressori trascrizionali dell'E-Caderina, come Snail e Zeb-2. La downregolazione dell'E-Caderina caratterizza, insieme alla perdita della polarità, l'acquisizione del fenotipo EMT (transizione epitelio-mesenchimale) nelle cellule tumorali di origine epiteliale (Schietke et al, 2010). Nei nostri campioni (Figura 8) il trascritto dell'E-Caderina risulta downpresso, indipendentemente dal livello di HIF-1 α , in maniera significativa (HIF-1 α positivi $p= 0,029$ e HIF-1 α negativi $p= 0,057$) nelle colture tumorali rispetto alle controparti normali.

a)



b)

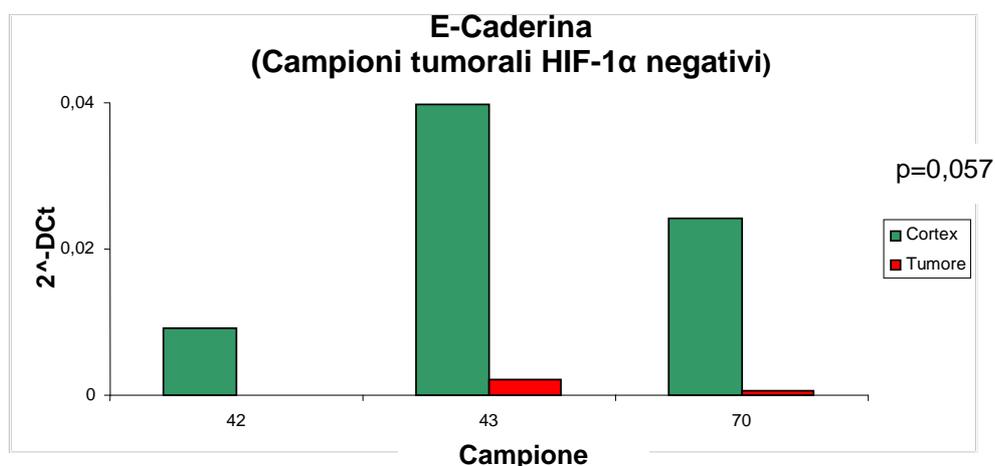


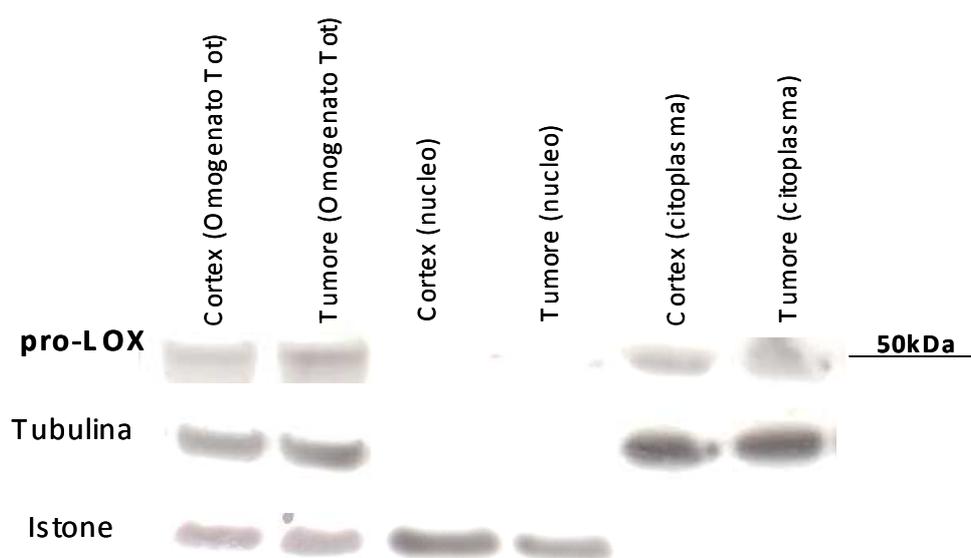
Figura 8: Analisi quantitativa mediante Real time PCR del trascritto di E-Caderina condotta su coppie di colture renali normali e tumorali HIF-1 α positive (a) e HIF-1 α negative (b). I valori nei diversi campioni indicati sono espressi come 2^{-DCt}.

Valutazione, mediante Western Blot, del livello di espressione delle proteine LOX, S100A4 ed E-caderina analizzate nelle colture primarie di carcinoma renale e nella loro controparte normale

Analisi di pro-LOX, LOX e LOX-PP

Il trascritto della lisil ossidasi, una volta tradotto, va incontro a diverse modificazioni post-traduzionali, come descritto nella sessione "Introduzione". La pro-proteina (pro-LOX) di 50 kDa verrà subito secreta nella matrice extracellulare. La figura 9a mostra un western blot rappresentativo dell'espressione di pro-LOX nell'omogenato totale e nelle frazioni nucleari e citoplasmatiche purificate di una coppia di coltura primaria cortex/tumore e l'analisi densitometrica (Figura 9b) che riporta i valori medi del livello di pro-LOX nei diversi casi analizzati. Le immagini riconfermano il dato del trascritto mostrando una sovraespressione, anche se non statisticamente significativa, di pro-LOX sia nell'omogenato totale che nel citoplasma delle colture tumorali rispetto alla controparte normale. Inoltre la separazione delle frazioni nucleari e citoplasmatiche mostra che la proteina localizza nel citoplasma prima di andare incontro al taglio proteolitico che avviene nella matrice extracellulare.

a)



b)

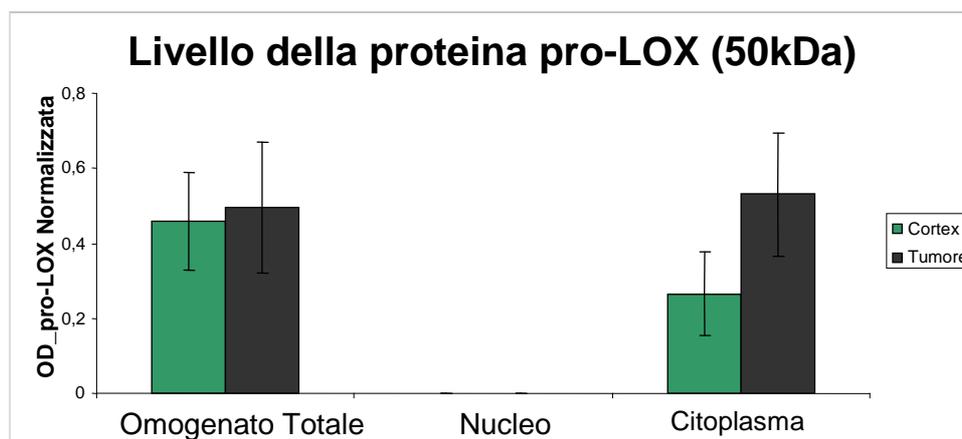


Figura 9: a) Western Blot rappresentativo dei lisati di una coppia di colture primarie normali e tumorali corrispondenti a omogenato totale, frazione nucleare e citoplasmatica. In ogni pozzetto sono stati caricati 25 μ g di proteine per ogni campione. Lo stesso filtro è stato ibridato con l'anticorpo anti-LOX, anti-istone e anti-tubulina. **b)** L'analisi densitometrica riporta il valore medio \pm SEM (5 casi) delle OD corrispondenti alla banda proteica di pro-LOX presente nei diversi lisati di tutte le coppie di colture analizzate normalizzato per le OD delle proteine totali caricate (colorate con Ponceau).

Sugli stessi lisati cellulari abbiamo valutato l'espressione della proteina LOX di 32 kDa che rappresenta la componente enzimaticamente attiva derivata, insieme al propeptide di 18 kDa (LOX-PP), dal taglio proteolitico di pro-LOX. L'analisi in western blot della suddetta proteina è stata complicata dalla scarsa qualità degli anticorpi disponibili in commercio, ciò nonostante siamo riusciti a valutarne il livello di espressione evidenziando una maggiore quantità, seppur non significativa, di LOX in tutte le frazioni ottenute dalle colture tumorali analizzate rispetto alle corrispondenti normali (Figura 10). Quanto osservato è in linea coi dati della letteratura.

a)



b)

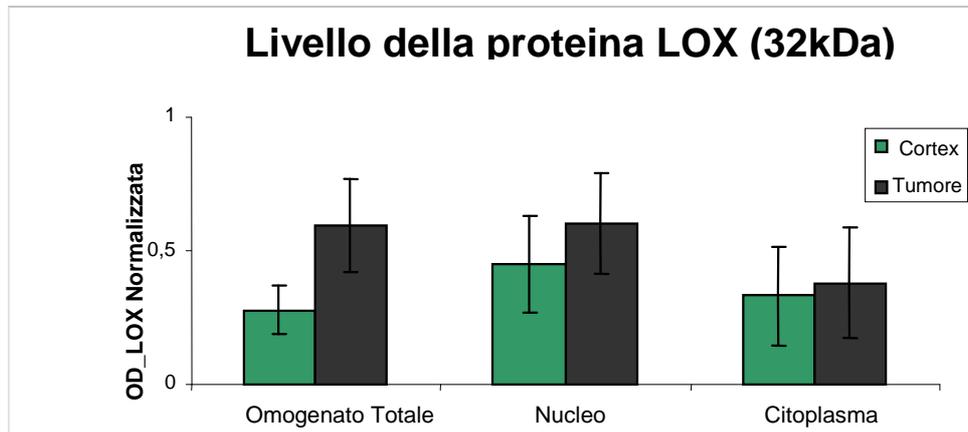
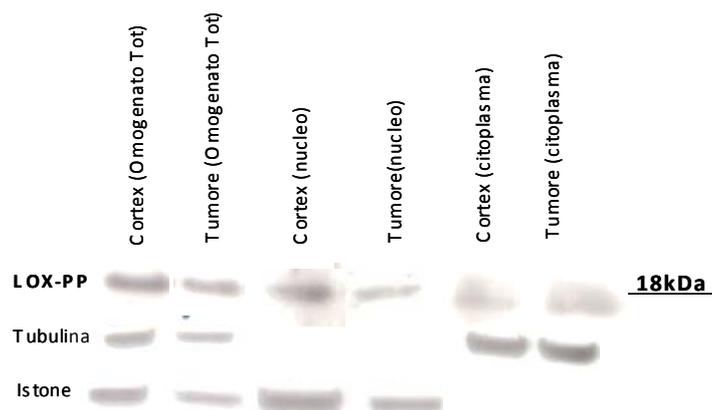


Figura 10: a) Western Blot rappresentativo dei lisati di una coppia di colture primarie normali e tumorali corrispondenti a omogenato totale, frazione nucleare e citoplasmatica. In ogni pozzetto sono stati caricati 25 μ g di proteine per ogni campione. Lo stesso filtro è stato ibridato con l'anticorpo anti-LOX, anti-istone e anti-tubulina. **b)** L'analisi densitometrica riporta il valore medio \pm SEM (5 casi) delle OD corrispondenti alla banda proteica di LOX presente nei diversi lisati di tutte le coppie di colture analizzate normalizzato per le OD delle proteine totali caricate (colorate con Ponceau).

Oltre alla proteina pro-LOX (50kDa) e all'enzima LOX (32kDa) abbiamo analizzato, sempre tramite western blot sugli stessi lisati, il livello di espressione della proteina LOX-PP (18kDa) che rappresenta la porzione N-terminale del precursore pro-LOX e che contiene il dominio propeptidico a cui è attribuita una funzione di oncosoppressore. Anche nel caso della proteina LOX-PP sono stati analizzati sia gli omogenati totali che le frazioni nucleari e citoplasmatiche

purificate (Figura 11a). Negli omogenati totali di colture corticali la proteina LOX-PP è più abbondante rispetto al tumore, in particolare nella frazione nucleare. La sua overespressione nelle colture corticali è risultata statisticamente significativa ($p= 0,040$). Nel caso invece della frazione citoplasmatica, dai dati ottenuti, sembrerebbe che ci sia una lieve differenza non significativa a favore delle colture tumorali.

a)



b)

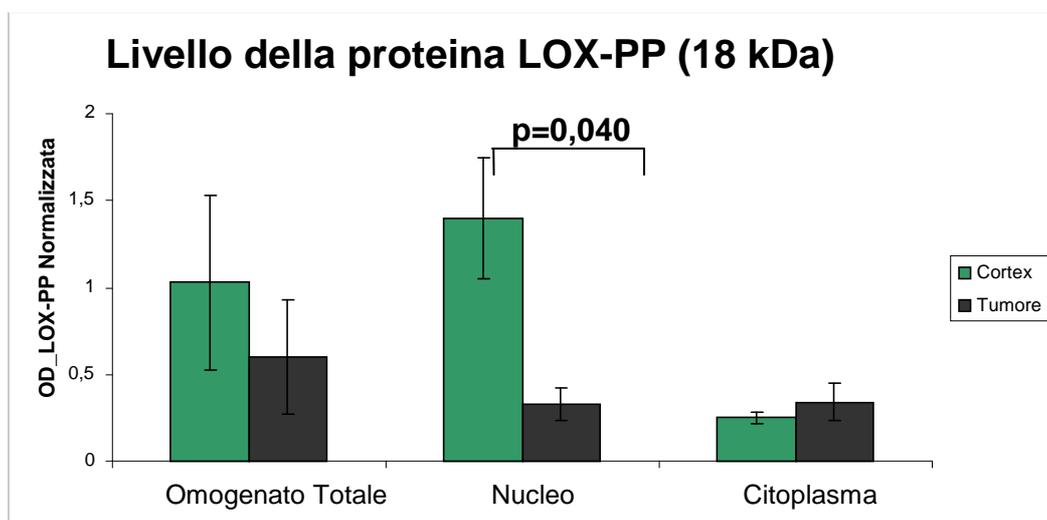
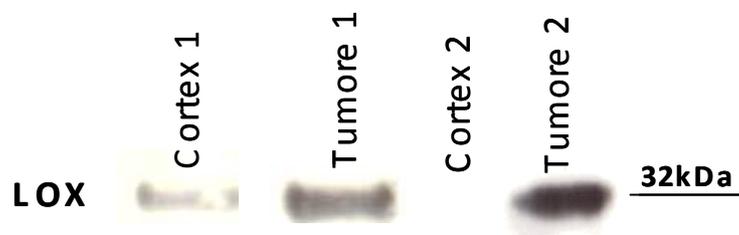


Figura 11: a) Western Blot rappresentativo dei lisati di una coppia di colture primarie normali e tumorali corrispondenti a omogenato totale, frazione nucleare e citoplasmatica. In ogni pozzetto sono stati caricati 25 μ g di proteine per campione. Lo stesso filtro è stato ibridato con l'anticorpo anti-LOX-PP, anti-istone e anti-tubulina. **b)** L'analisi densitometrica riporta il valore medio \pm SEM (5 casi) delle OD corrispondenti alla banda proteica di LOX-PP presente nei diversi lisati di tutte le coppie di colture analizzate normalizzato per le OD delle proteine totali caricate (colorate con Ponceau).

Per valutare l'espressione a livello extracellulare delle diverse componenti proteiche derivate dal trascritto di LOX, abbiamo analizzato la loro espressione, mediante western blot, anche nei terreni di coltura in cui sono cresciute le cellule delle nostre colture primarie. Il precursore pro-LOX di 50 kDa non è risultato riscontrabile nei terreni di coltura di cortex e tumore probabilmente perché il taglio proteolitico da parte dell'enzima BMP-1 avviene subito dopo il suo rilascio nella matrice extracellulare, infatti, nessun dato in letteratura, al momento, ha mai conferito alla proteina pro-LOX una funzione biologica. Anche il propeptide LOX-PP (18 kDa) non risulta valutabile nei terreni di coltura. Del resto la letteratura non accenna ad alcuna funzione biologica extracellulare della proteina LOX-PP, suggerisce invece che, subito dopo il taglio proteolitico, il propeptide traslochi dentro la cellula per espletare le sue funzioni biologiche. L'analisi dei medium di coltura ha invece messo in evidenza che la proteina LOX (32 kDa) è overespressa in maniera statisticamente significativa ($p=0,003$) (Figura 12b) nelle colture tumorali rispetto alle colture normali dove la banda proteica è spesso non riscontrabile (Figura 12a).

a)



b)

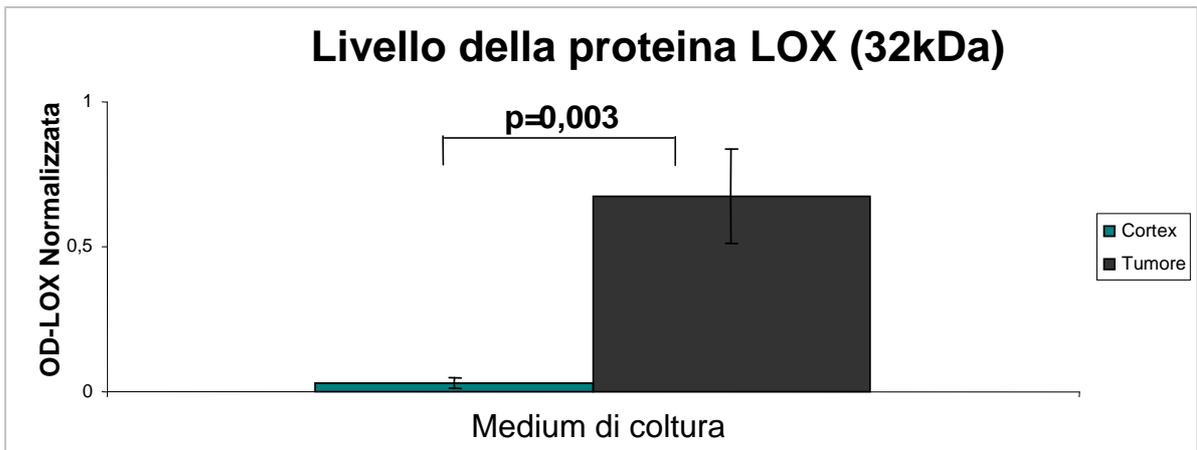
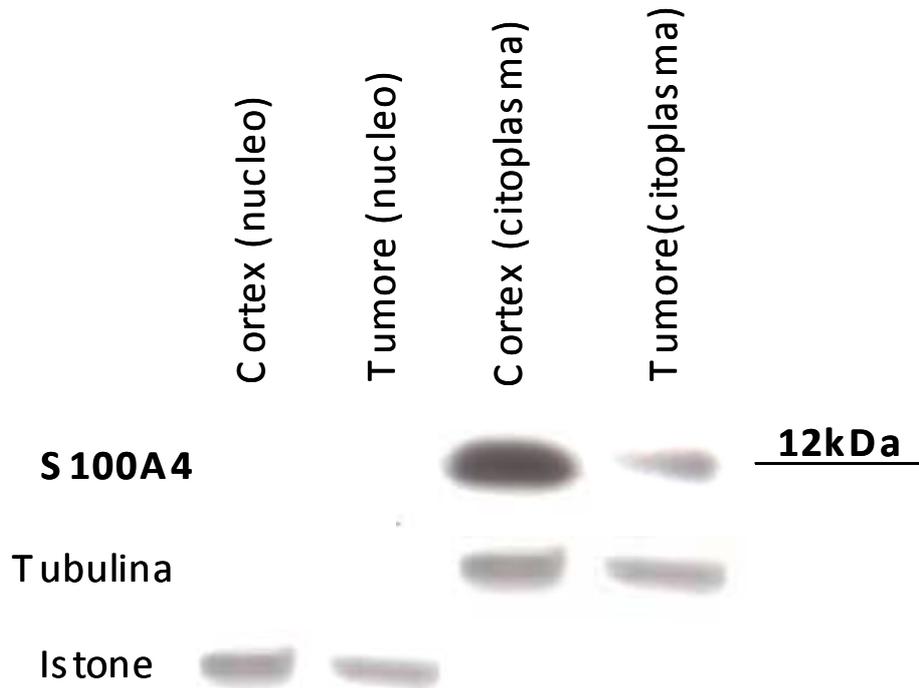


Figura 12: a) Western Blot rappresentativo dei lisati dei medium di coltura di due coppie cortex/tumore. Lo stesso filtro è stato ibridato con l'anticorpo anti-LOX. **b)** L'analisi densitometrica riporta il valore medio \pm SEM (5 casi) delle OD corrispondenti alla banda proteica di LOX presente nei diversi lisati di tutte le coppie di colture analizzate normalizzato per le OD delle proteine totali caricate (colorate con Ponceau).

Analisi di S100A4 ed E-Caderina

I target S100A4 ed E-caderina valutati a livello di trascritto, mediante Real Time PCR, nelle nostre colture primarie sono stati analizzati anche a livello di proteina tramite Western Blot. Anche per queste due proteine l'analisi in Western Blot è stata condotta nelle frazioni nucleari e citoplasmatiche purificate dalle colture. Entrambe le proteine localizzano esclusivamente nella frazione citoplasmatica della cellula e risultano statisticamente più abbondanti nelle colture normali rispetto a quelle tumorali (Figura 13 e Figura 14). Quindi le analisi in western blot hanno confermato quanto visto a livello di trascritto.

a)



b)

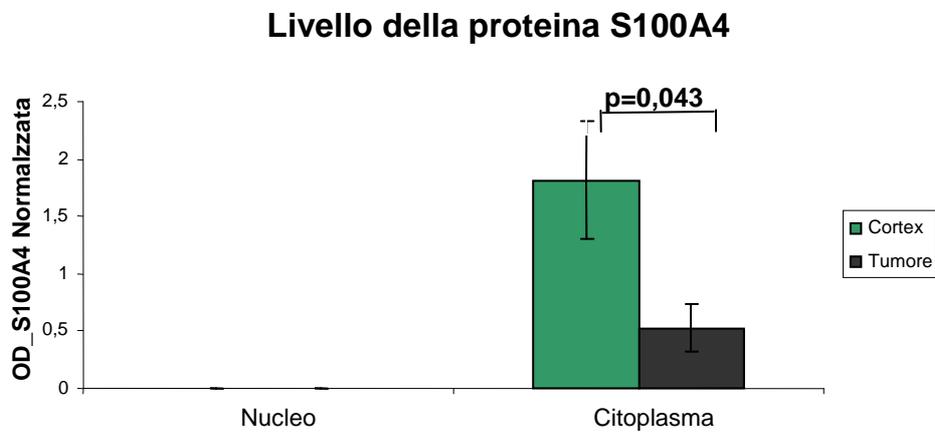
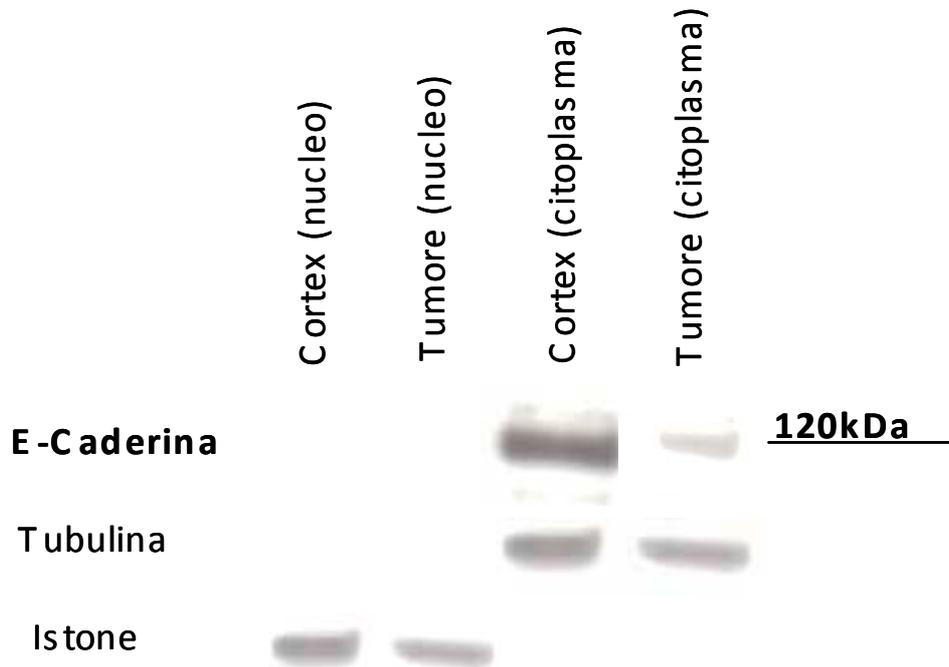


Figura 13 a) Western Blot rappresentativo dei lisati di una coppia di colture primarie normali e tumorali corrispondenti a frazione nucleare e citoplasmatica. In ogni pozzetto sono stati caricati 25 μg di proteine per ogni campione. Lo stesso filtro è stato ibridato con l'anticorpo anti-S100A4, anti-istone e anti-tubulina. **b)** L'analisi densitometrica riporta il valore medio \pm SEM (6 casi) delle OD corrispondenti alla banda proteica di S100A4 presente nei diversi lisati di tutte le coppie di colture analizzate normalizzato per le OD delle proteine totali caricate (colorate con Ponceau).

a)



b)

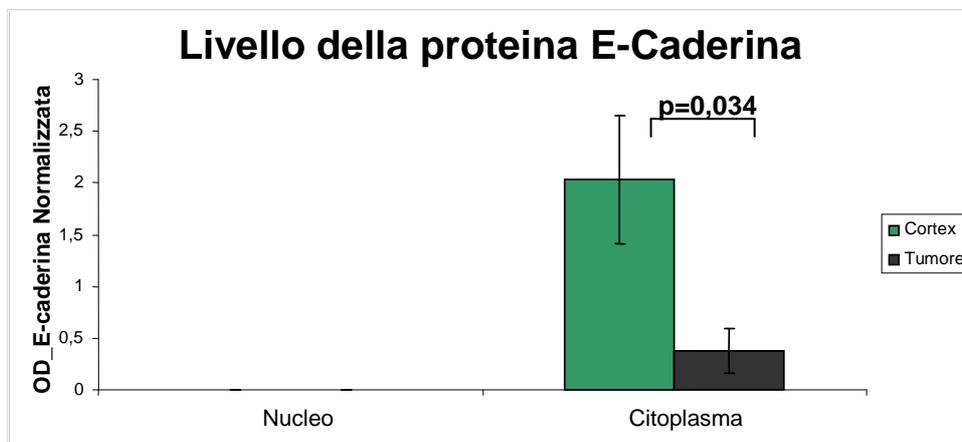


Figura 14 a) Western Blot rappresentativo dei lisati di una coppia di colture primarie normali e tumorali corrispondenti a frazione nucleare e citoplasmatica. In ogni pozzetto sono stati caricati 25 μ g di proteine per ogni campione. Lo stesso filtro è stato ibridato con l'anticorpo anti-E-caderina, anti-istone e anti-tubulina. **b)** L'analisi densitometrica riporta il valore medio \pm SEM (6 casi) delle OD corrispondenti alla banda proteica di E-caderina presente nei diversi lisati di tutte le coppie di colture analizzate normalizzato per le OD delle proteine totali caricate (colorate con Ponceau).

Analisi degli effetti molecolari e funzionali del silenziamento genico della lisil ossidasi nelle colture primarie renali normali e tumorali

Dopo aver descritto il profilo di espressione di questi tre geni nelle nostre colture renali normali e tumorali abbiamo voluto valutare l'effetto del silenziamento genico della lisil ossidasi nelle nostre colture. La lisil ossidasi risulta un target interessante di silenziamento genico in quanto, per ogni proteina pro-LOX tradotta se ne formano potenzialmente due (LOX e LOX-PP) che regolano gli stessi pathways ma con effetti opposti.

Verifica del silenziamento genico della lisil ossidasi

Il silenziamento genico della lisil ossidasi è stato ottenuto mediante trattamento per 48 ore con un pool di siRNA specifici ed il livello di silenziamento ottenuto nelle colture normali e tumorali è stato valutato a livello di trascritto, mediante real time PCR, e a livello di proteina, mediante Western Blot. I grafici della figura 15 mostrano il livello medio del trascritto di LOX dopo trattamento con siRNA specifici e con siRNA controllo nelle colture primarie normali (a) e tumorali (b).

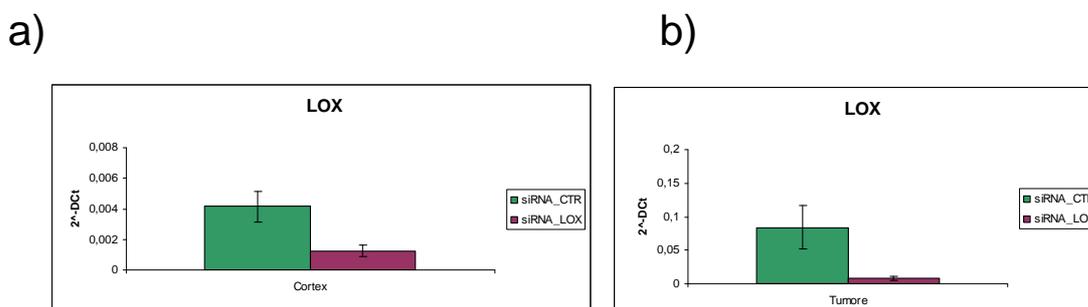


Figura 15: I grafici rappresentano il livello medio \pm SEM di espressione del trascritto della lisil ossidasi espresso come $2^{-\Delta Ct}$ nelle colture primarie di cortex (9 casi) (a) ed RCC (11 casi) (b) trattate con siRNA controllo (siRNA_CTRL) e siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX).

In tutti i casi le percentuali di silenziamento ottenute sono maggiori del 75%. I dati di western blot, come mostrato di seguito per i singoli esperimenti, confermano l'avvenuto silenziamento della LOX anche a livello proteico.

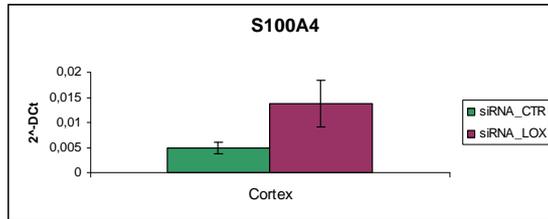
Effetto molecolare del silenziamento genico di LOX nelle colture primarie renali normali e tumorali

L'enzima LOX, come ben documentato in letteratura, modula l'assemblaggio delle proteine della matrice e regola i pathways biologici che controllano l'adesione e la motilità cellulare.

Dato che anche l'S100A4 e l'E-Caderina sono descritte come coinvolte nella regolazione della motilità cellulare tipica dell'acquisizione del fenotipo dell'EMT, abbiamo voluto rivalutare la loro espressione nelle cellule normali e tumorali dopo 48 ore di silenziamento genico con siRNA specifici per la lisil ossidasi, per verificare un'eventuale effetto modulatore della proteina LOX su queste due molecole. La figura 16a mostra che il silenziamento genico della LOX determina nelle colture di cortex una maggiore espressione del trascritto di S100A4 rispetto alle altre trattate con siRNA controllo. L'incremento osservato a livello trascrizionale di S100A4 si ripete anche a livello di proteina, come mostrato, a titolo esemplificativo, dal western blot della figura 16b.

Poiché il gene S100A4 è un target trascrizionale della β -catenina, come dimostrato da Stain et al (2006) in linee cellulari derivate da cancro al colon, abbiamo verificato se l'incremento di S100A4 indotto dal silenziamento della lisil ossidasi potesse essere in qualche modo mediato da β -catenina. In effetti l'analisi mediante western blot mostra che il silenziamento della lisil ossidasi nelle colture di cortex determina un aumento del livello di β -catenina (Figura 16b).

a)



b)

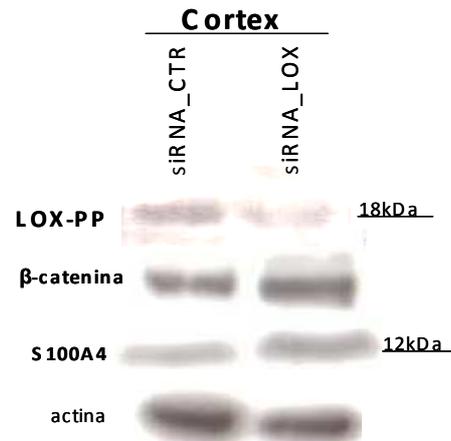
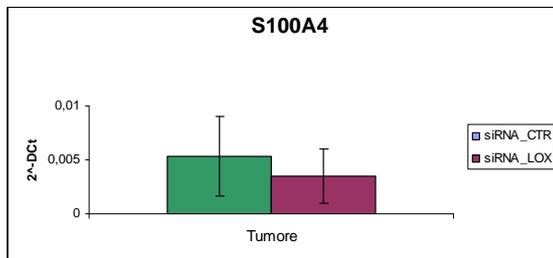


Figura 16: I grafici rappresentano il livello medio \pm SEM di espressione del trascritto di S100A4 espresso come $2^{-\Delta Ct}$ nelle colture primarie di cortex (7 casi) trattate con siRNA controllo (siRNA_CTR) e siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX). b) Western blot rappresentativo di omogenato totale ottenuto da colture primarie normali trattate per 48 ore con siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX) e siRNA controllo (siRNA_CTR).

Nelle colture renali tumorali invece il silenziamento genico della lisil ossidasi determina una downespressione, sia a livello di trascritto che di proteina, di S100A4 già poco espressa nelle cellule tumorali non silenziate (Figura 17). Anche nel caso delle colture primarie tumorali silenziate, abbiamo voluto verificare, come per le colture primarie normali silenziate, un'eventuale variazione del livello di espressione della β -catenina (Figura 17b). In effetti, al contrario di quello che succede nelle colture primarie normali silenziate, nella cellula tumorale osserviamo un decremento dell'espressione della β -catenina che potrebbe rendere ragione della down espressione di S100A4. Abbiamo voluto valutare anche l'effetto del silenziamento di LOX sul livello di E-Caderina. Come nel caso di S100A4 il silenziamento della lisil ossidasi induce nelle colture di cortex un aumento dell'espressione di E-Caderina sia a livello di trascritto che di proteina (Figura 18). Nelle colture tumorali invece il silenziamento di LOX induce una down regolazione di E-Caderina sia a livello di trascritto che di proteina (Figura 19). Questo dato è in contrasto con i dati della letteratura dove si mostra che in linee cellulari derivate da carcinoma renale le proteine LOX e LOX-2, interagendo con il repressore trascrizionale di E-Caderina Snail, ne potenziano l'attività di repressore trascrizionale (Schietke e colleghi, 2010).

a)



b)

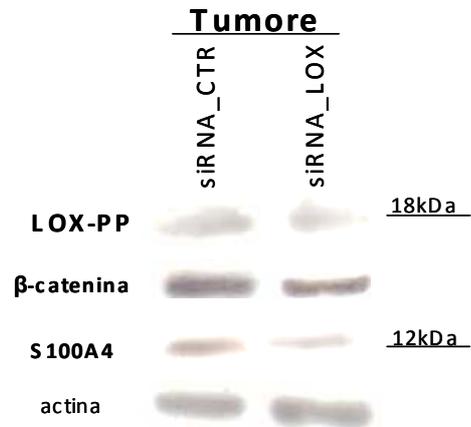
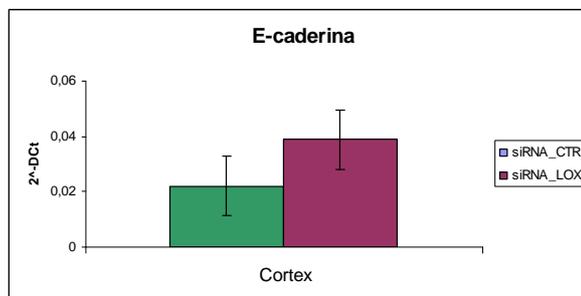


Figura 17: Il grafico rappresenta il livello medio \pm SEM di espressione del trascritto di S100A4 espresso come $2^{-\Delta Ct}$ nelle colture primarie di RCC (8 casi) trattate con siRNA controllo (siRNA_CTRL) e siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX). **b)** Western blot rappresentativo di omogenato totale ottenuto da colture primarie di RCC trattate per 48 ore con siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX) e siRNA controllo (siRNA_CTRL).

a)



b)

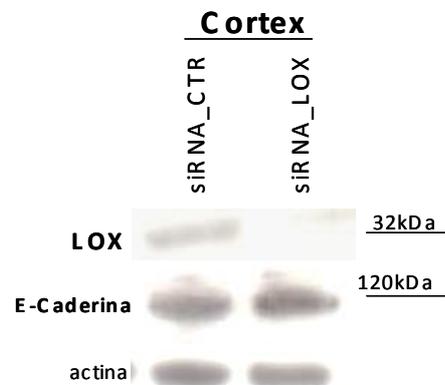


Figura 18: Il grafico rappresenta il livello medio \pm SEM di espressione del trascritto di E-Caderina espresso come $2^{-\Delta Ct}$ nelle colture primarie di cortex (5 casi) trattate con siRNA controllo (siRNA_CTRL) e siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX). **b)** Western blot rappresentativo di omogenato totale ottenuto da colture primarie di cortex trattate per 48 ore con siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX) e siRNA controllo (siRNA_CTRL).

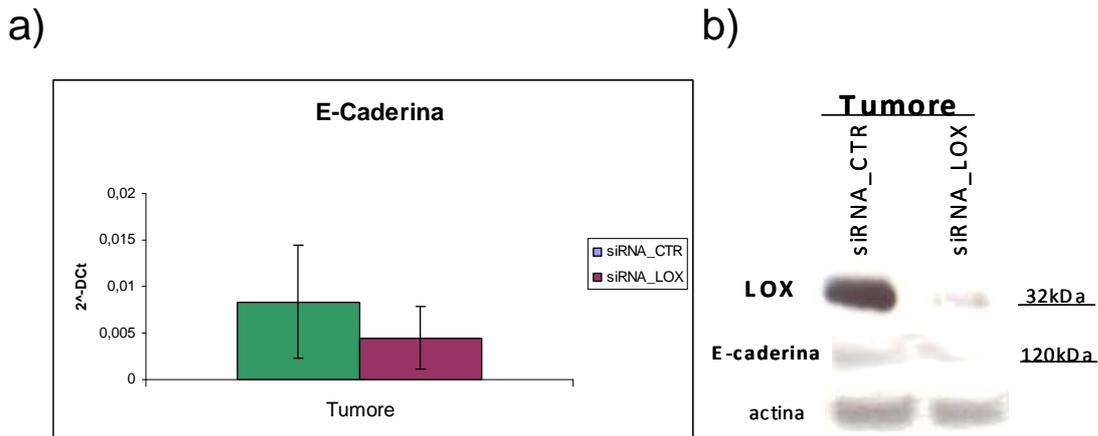


Figura 19: Il grafico rappresenta il livello medio \pm SEM di espressione del trascritto di E-Caderina espresso come 2^{-DCt} nelle colture primarie di RCC (5 casi) trattate con siRNA controllo (siRNA_CTR) e siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX). **b)** Western blot rappresentativo di omogenato totale ottenuto da colture primarie di RCC trattate per 48 ore con siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX) e siRNA controllo (siRNA_CTR).

Sulla base di quanto descritto in letteratura sull'esistenza di un loop regolatorio tra la proteina LOX e il fattore di trascrizione HIF-1 α , testimoniata dalla capacit  della proteina LOX di influenzare la sintesi della proteina HIF-1 α (Pez et al, 2011), abbiamo pensato di valutare l'effetto del silenziamento di LOX sul livello di espressione della proteina HIF-1 α . La figura 20 mostra l'analisi mediante western blot di un campione di colture tumorali HIF-1 α positive in cui   stata silenziata la lisil ossidasi. Osservando l'immagine si nota un lieve decremento del livello di espressione di HIF-1 α nelle cellule in cui   stata silenziata LOX rispetto alle cellule controllo. Successivamente abbiamo valutato il livello di espressione di alcuni trascritti descritti in letteratura come target dell'attivit  transattivante di HIF-1 quali Snail, Zeb-2 e TGF- β 3. Nella figura 21   riportata l'espressione dei tre trascritti, valutata mediante Real time PCR, nelle diverse colture tumorali HIF-1 α positive sottoposte al silenziamento della LOX. In tutti e tre i casi, dopo silenziamento della LOX, si osserva un lieve decremento dell'espressione dei target di HIF-1 che non   ancora statisticamente significativo probabilmente per il ridotto numero di casi analizzati.

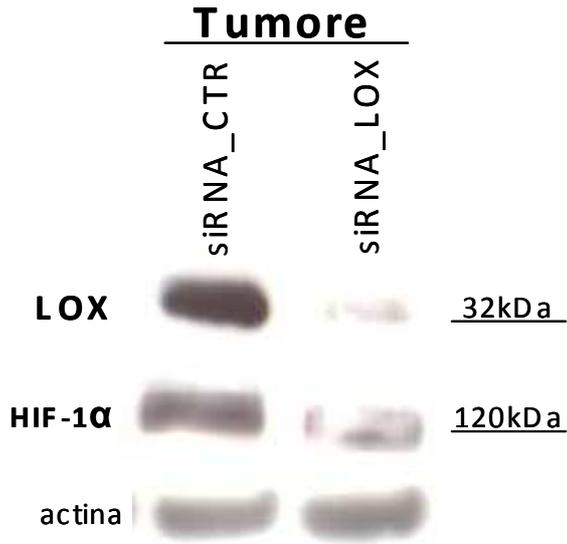


Figura 20: Western blot rappresentativo di un lisato di omogenato totale ottenuto da colture primarie di RCC trattate per 48 ore con siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX) e siRNA controllo (siRNA_CTRL). In ogni lane sono stati caricati 25 μ g di proteine. Lo stesso filtro è stato ibridato con l'anticorpo anti-LOX, anti-HIF1 α e anti-actina usata come normalizzatore.

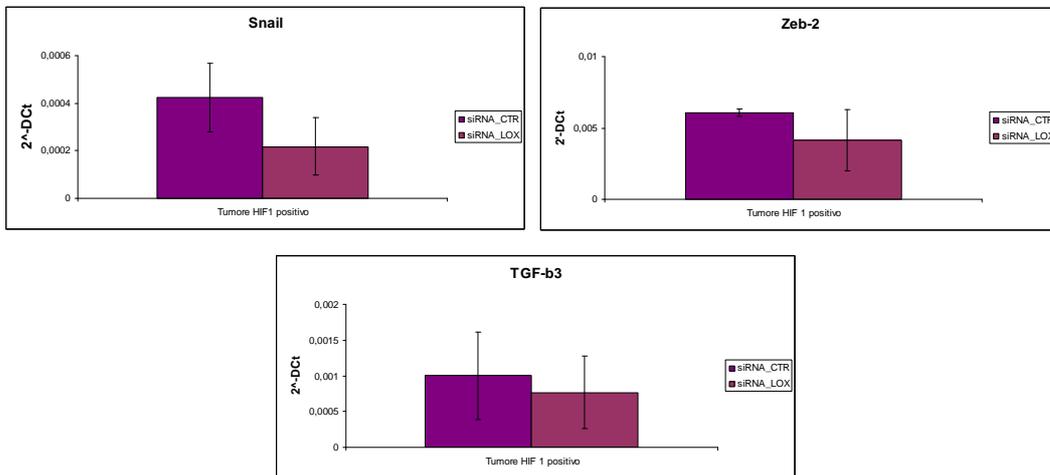


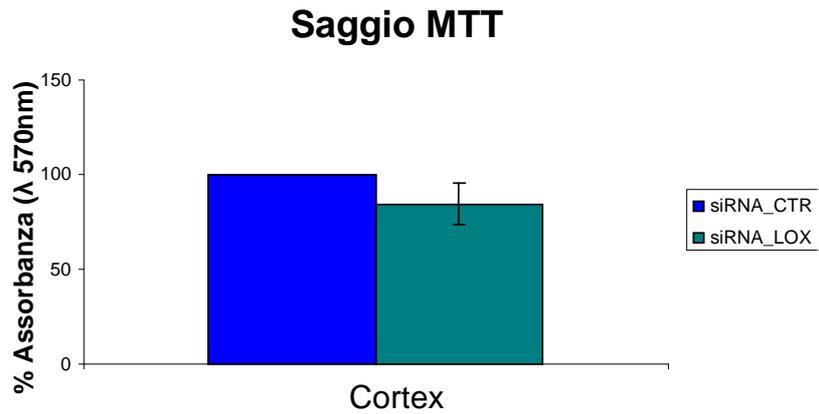
Figura 21: I grafici rappresentano il livello medio \pm SEM di espressione di tre trascritti target di HIF-1, Snail, Zeb-2 e TGF- β 3, espressi come $2^{-\Delta\Delta Ct}$, nelle colture primarie di RCC (3 casi) trattate con siRNA controllo (siRNA_CTRL) e siRNA specifici per LOX (siRNA_LOX).

Effetto del silenziamento genico della lisil ossidasi sulla vitalità cellulare nelle colture primarie normali e tumorali

Dopo aver valutato l'effetto del silenziamento genico della lisil ossidasi sul livello di espressione di specifici target molecolari nelle colture normali e tumorali, siamo passati all'analisi degli effetti funzionali prodotti da questo silenziamento. Per prima cosa abbiamo valutato l'effetto del silenziamento sulla vitalità cellulare, misurata tramite saggio dell'MTT, nelle colture primarie normali e tumorali.

Nel caso delle colture primarie normali la downespressione per silenziamento della lisil ossidasi causa un lieve decremento (15,7%) della vitalità cellulare non significativo ($p=0,502$) (Figura 22a). La figura 22b mostra invece i risultati del test di MTT condotto su colture primarie tumorali silenziate. Considerando nel complesso tutti i casi di tumore silenziate non abbiamo evidenziato alcun effetto significativo indotto dal silenziamento di LOX. Se però i campioni tumorali vengono suddivisi in HIF-1 α positivi e HIF1 α -negativi si evidenzia come il silenziamento della lisil ossidasi abbia effetti opposti sulla vitalità delle cellule tumorali HIF-1 α positive e HIF-1 α negative (Figura 22b). Infatti nelle colture primarie tumorali HIF-1 α positive il silenziamento induce un decremento (21,3%) statisticamente significativo ($p= 0,004$) della vitalità cellulare. Nel caso delle colture primarie tumorali HIF-1 α negative il silenziamento determina invece un aumento della vitalità cellulare (19,5%) che risulta non statisticamente significativo ($p= 0,090$). Questo risultato potrebbe essere interpretato alla luce dei dati recenti di letteratura che descrivono l'esistenza di un loop regolatorio tra le proteine LOX ed HIF-1 α per cui LOX, la cui espressione anche nelle nostre colture risulta HIF-1 α correlata, influenzerebbe la sintesi di HIF-1 α e quindi potenzialmente il suo ruolo di controllo sulla vitalità cellulare.

a)



b)

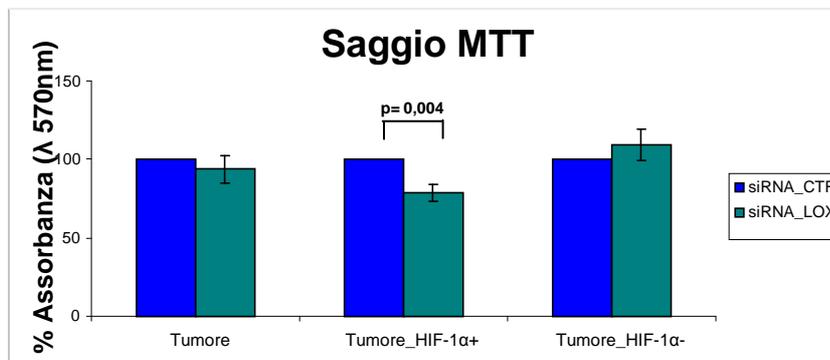


Figura 22: **a)** Il grafico rappresenta in percentuale il valore medio \pm SEM del rapporto “Assorbanza-siRNA_LOX/Assorbanza-siRNA_CTRL” nelle diverse colture primarie normali analizzate (6 casi). **b)** Il grafico rappresenta in percentuale il valore medio \pm SEM del rapporto “Assorbanza-siRNA_LOX/Assorbanza-siRNA_CTRL” nelle diverse colture primarie tumorali analizzate (8 casi totali, 5 casi HIF-1 α + e 3 casi HIF-1 α -).

Effetto del silenziamento della lisil ossidasi sull'adesione cellulare delle colture primarie normali e tumorali

Poiché la proteina lisil ossidasi, come già ampiamente descritto, promuove i pathway molecolari che inducono la migrazione della cellula abbiamo valutato l'effetto del silenziamento sui diversi processi funzionali coinvolti nella migrazione cellulare. Tra questi l'adesione delle cellule a specifici substrati, cioè a proteine della matrice extracellulare come ad esempio la fibronectina, premessa indispensabile al processo di migrazione.

Il saggio d'adesione è stato condotto su colture primarie normali e tumorali dopo silenziamento della lisil ossidasi, valutando le capacità di adesione su plastica, substrato su cui normalmente vengono fatte crescere le nostre cellule, e su fibronectina, che è la proteina più rappresentativa della matrice extracellulare nei tessuti patologici come quelli tumorali. Le colture di cortex, una volta silenziate per la lisil ossidasi, tendono ad aderire meno sia alla plastica che alla fibronectina, tuttavia, la differenza tra campione controllo e campione silenziato è statisticamente significativa solo nel caso della fibronectina (Figura 22) ($p=0,010$). La medesima analisi è stata condotta anche sulle colture primarie tumorali. Le cellule tumorali silenziate aderiscono meno rispetto alle cellule controllo, sia sulla plastica che sulla fibronectina. Nel caso delle colture primarie tumorali, il confronto tra campioni controllo e campioni silenziate dà sempre una differenza tra i due campioni statisticamente significativa (plastica $p=0,0003$) (fibronectina $p=0,026$).

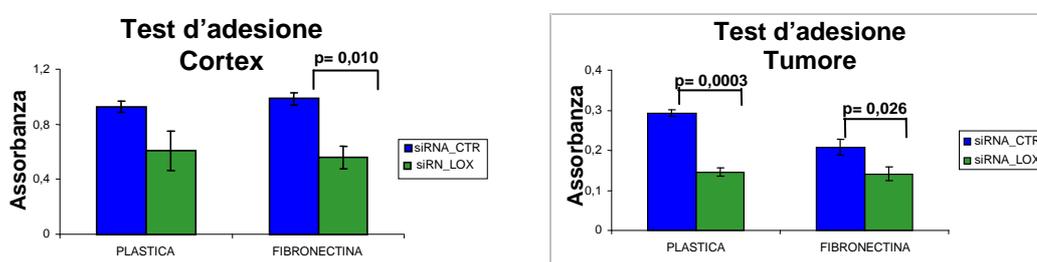


Figura 23: Analisi quantitativa della capacità di adesione delle cellule normali e tumorali, silenziate con siRNA_CTRL e siRNA_LOX espressa come valore di assorbanza (λ 550nm). Nei grafici sono riportati i valori medi \pm SEM di tre esperimenti.

Effetto del silenziamento della lisil ossidasi sulla migrazione cellulare valutata con camera di Boyden, nelle colture primarie normali e tumorali

Per valutare l'effetto del silenziamento della LOX sulle cellule delle colture primarie normali e tumorali abbiamo messo a punto un saggio di migrazione utilizzando il sistema della camera di Boyden. Le cellule trattate con siRNA_CTRL e siRNA_LOX vengono lasciate migrare per 6 ore attraverso la membrana di 8µm della camera di Boyden e il numero delle cellule migrate viene quantificato per conteggio dopo colorazione della membrana con ematossilina/eosina. Nella figura 24 sono riportate le immagini delle membrane colorate dove, anche a livello visivo, risulta evidente che le cellule migrate nelle colture silenziate, sia di cortex che di tumore, sono meno rispetto al controllo. La valutazione quantitativa, per conteggio al microscopio ottico, delle cellule che hanno oltrepassato la membrana ha confermato quanto già notato nelle immagini. Infatti nel caso delle cellule tumorali il silenziamento della LOX diminuisce in maniera statisticamente significativa ($p= 0,043$) la capacità migratoria delle cellule del 27,9% rispetto alle cellule controllo. Anche le cellule normali, dopo il silenziamento della LOX migrano meno (23,7%) rispetto al loro controllo anche se in modo non ancora statisticamente significativo.

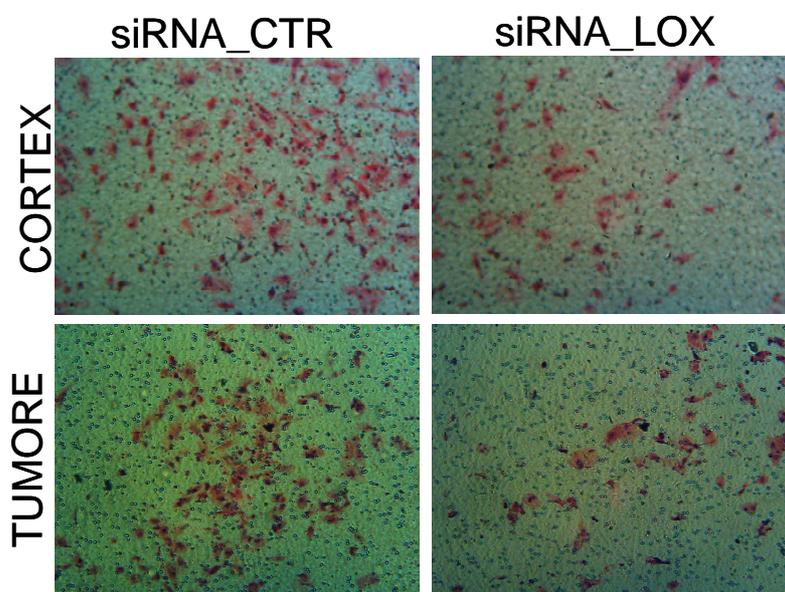


Figura 24: Immagini rappresentative di una zona della membrana della camera di Boyden attraversata dalle cellule di cortex e tumore trattate con siRNA_CTRL e siRNA_LOX dopo fissazione e colorazione con ematossilina/eosina. (20X).

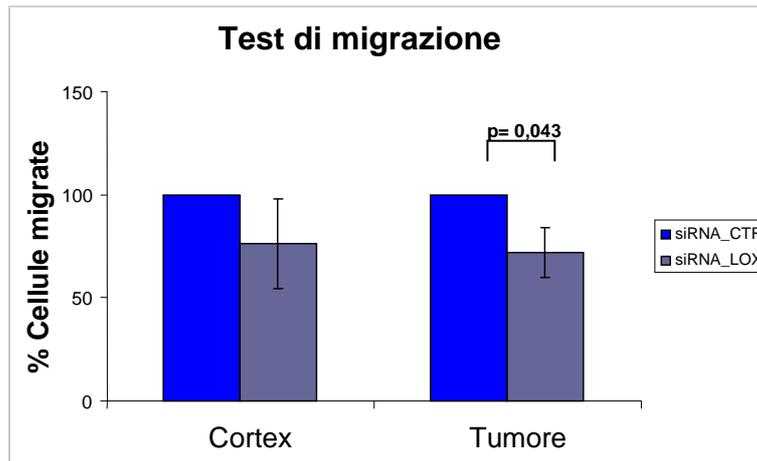


Figura 25: Analisi quantitativa delle capacità migratorie delle colture di cortex e di tumore silenziate con siRNA_CTRL e siRNA_LOX. I risultati, espressi come percentuale rispetto ai corrispettivi controlli scelti come calibratori posti pari al 100%, rappresentano i valori medi \pm SEM di 5 esperimenti nel caso della cortex e di 6 nel caso del tumore.

DISCUSSIONE

Il carcinoma renale rappresenta circa il 3% delle neoplasie dell'adulto (Klatte et al, 2007). Alla diagnosi, spesso occasionale, possono già essere presenti metastasi e ancora oggi l'intervento chirurgico, che consiste in una nefrectomia totale o parziale, costituisce l'unico valido approccio terapeutico poiché chemio/radioterapia risultano inefficaci (Clark et al, 2009). Alla luce di ciò diventa importante poter individuare potenziali nuovi target terapeutici e per fare ciò lo studio a livello molecolare dei meccanismi patogenetici che stanno alla base dell'insorgenza e della progressione del carcinoma renale diventa fondamentale. Il carcinoma renale si presenta in diversi sottotipi istologici tra i quali il più diffuso è quello a cellule chiare che rappresenta l'80% dei carcinomi renali. Il carcinoma renale a cellule chiare, che ha origine dall'epitelio del tubulo prossimale, presenta numerose anomalie molecolari, tra le quali la più diffusa, presente nell'80% delle forme sporadiche, è l'inattivazione biallelica del gene VHL (von-Hippel-Lindau) (William et al, 2008). L'inibizione funzionale della proteina VHL comporta l'attivazione costitutiva del fattore inducibile dall'ipossia (HIF) che indurrà l'espressione di molteplici geni che codificano proteine coinvolte nella proliferazione, migrazione e invasività cellulare e nel processo angiogenico e metastatico (Semenza et al, 2003). Il progetto di tesi sviluppato durante i tre anni di dottorato ha riguardato lo studio di espressione e funzionale della lisil ossidasi, uno dei target dell'attività transattivante di HIF coinvolti nella migrazione cellulare e nel processo metastatico. Il gene LOX, che mappa sul cromosoma 5, codifica per una proteina di 48kDa (prepro-LOX) che, una volta glicosilata alla sua estremità N-terminale, viene secreta dalla cellula come proteina pro-LOX (50kDa). Nella matrice extracellulare essa subisce un taglio proteolitico ad opera dell'enzima BMP-1 (bone morphogenetic protein-1) liberando così la proteina LOX-PP (18kDa) e l'enzima LOX (32kDa) (Lucero et al, 2006). La nostra attenzione si è soffermata soprattutto sull'espressione e sulle funzioni dell'enzima LOX che, come ampiamente documentato in letteratura, ha un ruolo fondamentale nella progressione tumorale ed è stato trovato overespresso in molti tipi di tessuti tumorali. Mentre a livello della matrice extracellulare l'enzima LOX ossida i residui di lisina di collagene ed

elastina, promuovendo la loro interazione e la formazione di fibre insolubili e stabili (Maki et al, 2005), a livello intracellulare, stimola l'attivazione di tirosin-chinasi che favoriscono la formazione di strutture pro-migratorie come le adesioni focali, i lamellipodi e i filopodi (Payne et al, 2005). L'enzima LOX è anche coinvolto nelle fasi più avanzate della progressione del tumore, e in particolare nell'invasività e nella formazione delle metastasi. Infatti, in uno studio clinico (Thu-Le et al, 2009) condotto su carcinoma dell'esofago viene mostrato come l'overespressione del trascritto della lisil ossidasi sia correlata in maniera statisticamente significativa con lo stadio tumorale, con la formazione delle metastasi e quindi con una minore sopravvivenza del paziente. La maggior parte dei dati descritti in letteratura sull'espressione di LOX e sul suo possibile ruolo funzionale nei tumori sono relativi a studi condotti su carcinoma mammario, polmonare e del colon, mentre estremamente scarsi sono gli studi su carcinoma renale. Inoltre, tutti gli studi presenti in letteratura, che valutano l'espressione della lisil ossidasi, sono stati condotti a livello di tessuto a differenza degli studi funzionali che sono condotti prevalentemente su linee cellulari, derivate da diversi tipi di tumori, in cui viene indotta un'overespressione o un silenziamento del target in esame. Il modello sperimentale che è stato usato invece in questo lavoro di tesi, sia per gli studi d'espressione che per quelli funzionali, è costituito da colture primarie umane ottenute da digestione meccanica ed enzimatica di campioni di tessuto renale corticale normale e tumorale. Il modello di colture primarie, ampiamente caratterizzato nel nostro laboratorio a livello fenotipico (Perego et al, 2005; Bianchi et al, 2010) e genomico (Cifola et al, 2011), presenta una composizione cellulare più omogenea rispetto al tessuto di origine e mantiene, nei primi passaggi in vitro, non solo il fenotipo ma anche il genotipo del tessuto corrispondente. Le colture primarie da noi utilizzate rappresentano quindi un buon modello sperimentale, migliore rispetto ad una linea cellulare, per studi d'espressione e funzionali. Nella prima parte di questo lavoro abbiamo voluto valutare, mediante Real time PCR, il livello del trascritto di LOX in una casistica di 18 campioni di colture primarie renali normali e tumorali. L'analisi ha evidenziato che il trascritto di LOX è overespresso anche nelle colture tumorali renali rispetto alla controparte normale e in maniera statisticamente significativa solo nei campioni HIF-1 α positivi, confermando quindi che anche nel carcinoma

renale il livello del trascritto di LOX è correlato all'espressione di HIF-1 α . L'analisi in western blot ha inoltre mostrato che anche il precursore proteico pro-LOX (50 kDa) è più espresso nel citoplasma delle cellule tumorali rispetto alla controparte normale, mentre è assente a livello nucleare e nei medium di coltura, in quest'ultimo caso probabilmente perché il taglio proteolitico, da parte della proteina BMP-1, avviene subito dopo la sua secrezione. Ad oggi comunque non è stata descritta alcuna funzione biologica del precursore proteico pro-LOX. Anche la proteina attiva LOX (32 kDa), ottenuta dal taglio proteolitico della proteina pro-LOX, è più espressa nel citoplasma e nel nucleo della cellula tumorale rispetto alla controparte normale. Attualmente solo Saad et al (2010) accennano ad una localizzazione anche nucleare della proteina attiva LOX che probabilmente influenza la proliferazione cellulare regolando l'organizzazione della struttura nucleare. Quest'ultima è anche presente nel medium di coltura delle cellule tumorali che, in vitro, rappresenta l'ambiente extracellulare. La proteina attiva LOX potrebbe quindi rappresentare un potenziale target terapeutico e/o marcatore prognostico dell'RCC. La proteina LOX-PP che, come ampiamente documentato in letteratura per altri tipi tumorali, funge da oncosoppressore con effetti molecolari spesso antiteci a quelli dell'enzima LOX, è invece statisticamente più espressa nella frazione nucleare delle colture normali. La proteina LOX-PP inibisce i processi molecolari che, portando alla formazione delle strutture pro-migratorie come le adesioni focali, i lamellipodi, i filopodi, promuovono la migrazione cellulare (Zhao et al, 2009). Essa ha anche un ruolo nel mantenere la proteina β -catenina nel citoplasma cellulare (Giampuzzi et al, 2001), in particolare nei punti di contatto cellula-cellula impedendo la sua traslocazione nel nucleo e quindi la trascrizione dei suoi geni target. La LOX-PP non è stata trovata nei medium di coltura delle nostre cellule, né normali né tumorali, del resto la letteratura scientifica non dimostra chiaramente alcuna funzione biologica extracellulare della propeptide, quindi è molto probabile che subito dopo il taglio proteolitico traslochi dentro la cellula per espletare le sue funzioni biologiche. Nel caso invece della frazione citoplasmatica, dai dati ottenuti, sembrerebbe che ci sia una lieve differenza non significativa a favore delle colture tumorali. Per approfondire il ruolo molecolare e funzionale della proteina LOX nel rene e nel tumore renale sono stati messi a punto esperimenti di silenziamento genico

della LOX nelle nostre colture primarie. Visto che la proteina LOX ha un ruolo importante nella regolazione della motilità cellulare, abbiamo studiato l'effetto del suo silenziamento sulla modulazione di alcune molecole coinvolte nell'acquisizione, da parte delle cellule tumorali, di proprietà invasive. In particolare abbiamo studiato l'espressione delle proteine S100A4 ed E-Caderina. La proteina S100A4, che è descritta in letteratura come target di HIF-1 (Liao et al, 2009), è attivata nelle fasi più avanzate della progressione tumorale e anch'essa correla con la regolazione della motilità, invasione e metastatizzazione in alcuni tumori come quello mammario (Jenkinson et al, 2004). Nelle nostre colture renali il trascritto di S10A4, come la sua proteina che ha una localizzazione citoplasmatica, è risultato però overespresso in maniera statisticamente significativa nelle colture normali rispetto a quelle tumorali. Inoltre nei nostri campioni, al contrario di quanto descritto in letteratura, l'espressione di S100A4 non correla con l'espressione di HIF-1 α , quindi nel carcinoma renale sembra che la proteina S100A4 abbia un comportamento diverso rispetto agli altri tipi di tumore. Al momento infatti gli studi in letteratura sulla proteina S100A4 condotti su carcinoma renale sono pochissimi. Solo in un caso l'espressione di S100A4 è stata osservata in una metastasi polmonare di carcinoma renale dove essa appare ben espressa solo negli infiltrati infiammatori del tumore (Bandiera et al, 2009). Altri autori (Lopez et al, 2009) hanno mostrato che in linee cellulari di carcinoma renale di derivazione metastatica (LM1) S100A4 è upregolato rispetto ad una linea di carcinoma renale non metastatica. E' importante sottolineare che i campioni tumorali utilizzati per i nostri studi corrispondono a tumori primitivi di stadio piuttosto precoce ed è documentato che l'espressione di S100A4 incrementa nelle fasi più avanzate del tumore, durante la formazione delle metastasi. Il silenziamento della LOX mediante siRNA specifici ha dato una buona percentuale di silenziamento genico a livello di trascritto e di proteina. Nelle cellule renali normali il silenziamento genico della LOX determina un incremento dell'espressione di S100A4 sia come trascritto che come proteina, amplificando in questo modo il livello d'espressione già osservato per S100A4 nelle colture normali non silenziate. Dati in letteratura hanno dimostrato che la β -catenina quando trasloca nel nucleo funge da fattore di trascrizione anche per S100A4 (Stein et al, 2006). Inoltre la downregolazione di LOX è stata mostrata in grado di

indurre l'aumento di espressione di β -catenina sia nel nucleo che nel citoplasma (Giampuzzi et al, 2001) e LOX-PP modula indirettamente l'attività di β -catenina favorendo il suo ancoraggio a livello di membrana (Morgan et al, 2011). Dato che l'analisi in western blot mostra che il silenziamento della LOX comporta nelle colture renali normali un aumento del livello della β -catenina, è possibile che l'incremento osservato dell'espressione di S100A4, in seguito al silenziamento di LOX, venga mediato dalla β -catenina. Dopo silenziamento della LOX nelle colture primarie tumorali il trascritto di S100A4 risulta downregolato anche a livello proteico. Anche in questo caso l'effetto del silenziamento di LOX sull'espressione di S100A4 potrebbe essere mediato da β -catenina che dopo silenziamento delle colture tumorali risulta, nei lisati totali, lievemente downregolata. Anche l'E-Caderina è coinvolta nell'acquisizione delle proprietà invasive delle cellule epiteliali che vanno incontro a trasformazione neoplastica. Numerosi dati in letteratura hanno dimostrato infatti che nella progressione dei carcinomi vengono espressi numerosi fattori trascrizionali che reprimono l'espressione dell'E-Caderina, (Snail) e che le proteine della famiglia LOX (LOX, LOX1, LOX2 e LOX3), interagendo con la proteina Snail, ne potenziano l'attività di repressore trascrizionale (Peinado et al, 2005). L'analisi delle nostre coppie di colture primarie di cortex e tumore ha mostrato che l'E-Caderina è downespressa, in maniera statisticamente significativa, sia come trascritto che come proteina, nei campioni tumorali rispetto alle controparti normali. E' importante però precisare che, per lo meno in parte, l'espressione di E-Caderina rispecchia la derivazione citologica degli RCC. Infatti l'E-Caderina, oltre ad essere un marcatore epiteliale che garantisce il mantenimento delle adesioni intercellulari e della polarità delle cellule epiteliali, è nel rene anche un marcatore specifico del tubulo distale (Baer et al, 2006). L'RCC ed in particolare il sottotipo a cellule chiare ha una derivazione di tipo tubulare prossimale e quindi già in origine negativo per l'espressione di E-Caderina. Il silenziamento genico della LOX induce una variazione di segno opposto nel livello di espressione dell'E-Caderina nelle colture primarie normali rispetto alle tumorali. Nelle cellule normali l'inibizione dell'espressione di LOX comporta un aumento dell'espressione del trascritto e della proteina E-Caderina, già molto espressa in questo tipo cellulare. In queste colture la downregolazione della LOX potrebbe ridurre ulteriormente l'attività di repressore trascrizionale di Snail con ulteriore

upregolazione dell'E-Caderina. Del resto è descritto in letteratura che Snail, come altri repressori trascrizionali di E-Caderina, tipo Zeb-2, è un target dell'attività transattivante di HIF. E' quindi ipotizzabile che nelle colture corticali, dove in normossia manca HIF, il livello d'espressione di Snail sia di per sé già basso. Ci proponiamo a breve di verificare sperimentalmente sulle nostre colture la validità di questa ipotesi. Nelle cellule tumorali silenziate per LOX invece l'espressione dell'E-Caderina subisce un decremento sia a livello di trascritto che di proteina. In questo caso sulla base dei dati di letteratura che dimostrano l'esistenza di un loop regolatorio tra LOX ed HIF-1 α (Pez et al, 2011) abbiamo valutato l'effetto del silenziamento di LOX sul livello di HIF-1 α e di alcuni suoi target trascrizionali, tra cui Snail Zeb-2 e TGF- β 3, evidenziando un effetto lieve di downregolazione sia a livello della proteina HIF-1 α che dei target trascrizionali. La downregolazione di Snail tuttavia non concorda con quanto osservato, nelle cellule tumorali silenziate, sulla variazione d'espressione dell'E-Caderina. Questo fa ipotizzare che, nel caso delle cellule tumorali renali, altri componenti della famiglia LOX, come ad esempio LOX-2, abbiano il compito di regolare l'espressione della E-Caderina (Schiekte et al, 2010). Quando siamo passati a valutare gli effetti funzionali del silenziamento di LOX nelle nostre colture, abbiamo osservato che l'attività migratoria viene inibita dopo silenziamento genico, sia nelle colture tumorali che normali. Inoltre i saggi d'adesione su plastica e fibronectina, condotti sulle nostre colture silenziate, hanno mostrato una riduzione delle capacità d'adesione delle cellule ai substrati che potrebbe in parte spiegare la minor motilità cellulare osservata dopo silenziamento. Questi risultati sono interpretabili alla luce del fatto che l'attività enzimatica di LOX, oltre a modulare l'organizzazione e l'assemblaggio delle proteine della matrice extracellulare, regola l'attivazione di tirosino-chinasi come FAK e Src che, una volta attivate, promuovono l'adesione della cellula alla matrice attraverso la formazione di adesioni focali e l'attivazione delle RhoGTPasi e attivazione della migrazione (Payne et al, 2005). Abbiamo inoltre voluto valutare se il silenziamento genico della LOX potesse portare ad un cambiamento della vitalità cellulare, sia normale che tumorale, utilizzando il saggio MTT. L'analisi ha messo in evidenza che, nel caso delle colture primarie normali, la mancata espressione della LOX non sembra compromettere significativamente la vitalità cellulare. La vitalità diminuisce in modo significativo

quando LOX viene silenziato nelle cellule RCC HIF-1 α positive mentre non varia in modo significativo nel sottogruppo HIF-1 α negativo. Del resto è descritto in letteratura che l'enzima LOX regola la crescita cellulare, come visto in linee cellulari di cancro al colon, tramite il pathway PI3k/Akt che induce un aumento della sintesi di HIF-1 α (Pez et al, 2011). Anche questi risultati, ottenuti mediante saggio MTT sulle colture silenziate, come quelli precedentemente descritti, in cui è stato valutato il livello proteico di HIF-1 α dopo silenziamento di LOX, sembrano evidenziare, nel nostro modello renale, un loop regolatorio tra la proteina LOX ed HIF-1 α . Il silenziamento di LOX potrebbe quindi ridurre la vitalità cellulare per effetto di una downregolazione PI3k/Akt-dipendente di HIF-1 α . L'interpretazione dei nostri dati riportati è complicata anche dal complesso processamento a cui il precursore pro-LOX va incontro per produrre i frammenti attivi LOX e LOX-PP che sono coinvolti in pathway molecolari comuni ma con effetti opposti. La delucidazione dei meccanismi che stanno alla base di questo processamento potrà spiegare perché nella cellula normale, ad una bassa espressione del trascritto di LOX corrisponde comunque un'alta espressione della proteina LOX-PP, mentre nella cellula tumorale si ha un aumento del trascritto di LOX a cui corrisponde una maggiore quantità dell'enzima LOX e una minore sintesi della proteina LOX-PP. I risultati ottenuti a livello molecolare e funzionale nelle colture tumorali per effetto del silenziamento genico di LOX potrebbero aprire la strada a studi per un utilizzo di LOX come target terapeutico e/o marcatore prognostico dell'RCCcc. Considerando l'esistenza di un loop regolatorio tra LOX ed HIF-1 α , che sembra mantenuto anche nel nostro modello di tumore renale, la soppressione dell'attività cellulare di LOX potrebbe servire anche a modulare in senso inibitorio l'attività trascrizionale di HIF-1 che regola molti processi fondamentali per la biologia della cellula tumorale.

BIBLIOGRAFIA

Bandiera A., Melloni G., Freschi M., Giovanardi M., Carretta A., Borri A., Ciriaco P., Zannini P.. "Prognostic factor and analysis of S100A4 protein in resectate pulmonary metastases from renal cell carcinoma". *World Journal of Surgery* (2009) Vol: **33**: 1414-1420.

Baer P.C., Bereiter Hahn J., Schubert R., Geiger H.. " Differentiation status of human renal proximal and distal tubular epithelial cells in vitro differential expression of characteristic marker". *Cells Tissues Organs* (2006) Vol: **184**: 16-22.

Baker A., Cox T.R., Bird D., Lang G., Murray G.I., Sun X., Southall S.M., Wilson J.R., Erler J.T.. "The Role of Lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer". *Journal National Cancer Inst* (2011) Vol: **103**: 407-424.

Bianchi C., Bombelli S., Raimondo F., Torsello B., Angeloni V., ferrero S., Di Stefano V., Chinello C., Cifola I., Invernizzi L., Brambilla P., Magni F., Pitto M., Zanetti G., Mocarelli P., Perego R.A.. "Primary cell cultures from human renal cortex and renal cell carcinoma evidence a differential expression of two spliced isoforms of annexin A3". *The American Journal of Pathology* (2010) Vol: **176**: 1660-1671.

Cifola I., Bianchi C., Mangano E., Bombelli S., Frascati F., Fasoli E., Ferrero S., Di Stefano V., Zipeto M.A., Magni F., Signorini S., Battaglia C., Perego R.A.. "Renal cell carcinoma primary cultures maintain genomic and phenotypic profile of parental tumor tissue". *BMC Cancer* (2011) Vol:11: 244-256.

Clark P.E.. "The role of VHL in clear-cell renal carcinoma and its relation to targeted therapy". *Kidney Int* (2009) Vol: **9**: 939-945.

Condeelis J., Pollard J.W.. "macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis". *Cell* (2006) Vol:**124**: 263-266.

Denko N.C.. "Hypoxia, HIF-1 and glucose metabolism in the solid tumour". *Nature Reviews Cancer* (2008) Vol: **8**: 705-713.

Erler J.T., Bennewith K.L., Cox T.R., Lang G., Bird D., Koong A., Thu-Le Q., Giaccia A.J.. "Hypoxia-Induced Lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche". *Cancer Cell* (2009): Vol:**15**: 35-44.

Erler J.T., Giaccia A.J.. "Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis". *Cancer Research* (2006) Vol: **66**: 10238-10241.

Giampuzzi M., Oleggini R., Albanese C., Pestell R., Di Donato A.. " β -catenin signaling and regulation of cyclin D1 promoter in NRK-49F cells transformed by down-regulation of the tumor suppressor lysyl oxidase". *Biochimica et Biophysica* (2005) Vol: **1745**: 370-381.

Goto Y., Uchio-Yamada K., Anan S., Yamamoto Y., Ogura A., Manabe N.. "Transforming growth factor- β 1 mediated up-regulation of lysyl oxidase in the kidneys of hereditary nephrotic mouse with chronic renal fibrosis". *Virchows Arch* (2005) Vol: **447**: 859-868.

Grimsby J.L., Lucero H.A., Trackman P.C., Ravid K., Kagan H.M.. "Role of Lysyl oxidase propeptide in secretion and enzyme activity". *Journal of Cellular Biochemistry* (2010) Vol: **111**: 1231-1243.

Grottoed I., Maelandsmo G.M., Bye K.. "Signal transduction mechanism involved in S100A4-induced activation of the transcription factor NF- κ B". *BMC Cancer* (2010) Vol: **10**: 241-254.

Hornstra I.K., Birge S., Starcher B., Bailey A. J., Mecham R.P. and Shapiro S.D. "Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice". *The Journal of Biological Chemistry* (2003), Vol **278**:14387-14393.

Jeay S., Pianetti S., Kagan H.M. and Sonenshein G.E.. "Lysyl oxidase inhibits Ras-mediated transformation by preventing activation of NF- κ B". *Molecular and Cellular Biology* (2003) Vol **23**: 2251-2263.

Jenkinson S.R., Barraclough R., West C.R., Rudland P.S.. "S100A4 regulates cell motility and invasion in an in vitro model for breast cancer metastasis". *British Journal of Cancer* (2004) Vol: **90**: 253-262.

Klatte T., Seligson D.B., Riggs S.B., Leppert J.T., Berkman M.K., Kleid M.D., Yu H., Kabinavar F.F., Pantuk A.J., Belldegrun A.S.. "Hypoxia-Inducible Factor 1 α in Clear Cell Renal Carcinoma". *Clin Cancer Res* (2007) Vol: **13**: 7388-7393.

Laczko R., Szauter K.M., Jansen M.K., Hollosi P., Muranyi M., Molnar J., Fong K.S.K., Hinek A., Csiszar K.. "Active lysyl oxidase (LOX) correlates with focal adhesion kinase (FAK)/paxillin activation and migration in invasive astrocyte". *Neuropathology and Applied Neurobiology* (2007) Vol: **33**: 631-643.

Levental K.R., Yu H., Kass L. Et al. "Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling" *Cell* (2009). Vol: **139**: 891-906.

Liao S.,H., Zhao X.Y., Han Y.H., Zhang J., Wang L.S., Xia L., Zhao K.W., Zheng Y., Guo M., Chen G.Q.. "Proteomics-based identification of two novel direct targets of hypoxia-inducible factor-1 and their potential roles in migration/invasion of cancer cells". *Proteomics* (2009) Vol: **9**: 3901-3912.

Lucero H.A., Kagan H.M.. "Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function". *Cellular and Molecular Life Sciences* (2006) Vol: **63**: 2304-2316.

Lucero H.A., Ravid K., Grimsby J.L., Rich C.B., Di Camillo S.J., Maki J.M., Myllyharju J., Kagan H.M.. "Lysyl oxidase oxidizes cell membrane proteins and enhances the chemotactic response of vascular smooth muscle cells". *The Journal of Biological Chemistry* (2008) Vol: **283**: 24103-24117.

Maki M.J., Sormunen R., Lippo S., Kaarteenaho-Wiik R., Soininen R. and Myllyharju J.. "Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissue". *American Journal of Pathology* (2005), Vol **167**: 927-936.

Min C.,Kirsch K.H., Zhao Y., Jeay S., Palamakumbura A.H., Trackman P.C., Sonenshein G.E.. "The tumor suppressor activity of the Lysyl oxidase

propeptide reverses the invasive phenotype of Her-2/neu- driven breast cancer
“. *Cancer Research* (2007) Vol **67**: 1105-11112.

Min C., Yu Z., Kirsch K.H., Zhao Y., Vora S.R., Trackman P.C. Spicer D.B.,
Rosenberg L., Palmer J.R., Sonenshein G.E.. “A loss of function polymorphism
in the propeptide domain of the lox gene and breast cancer”. *Cancer Research*
(2009) Vol: **69**: 6685-693.

Morgan N.S., Kirsch K.H., Trackman P.C., Sonenshein G.E.. “The Lysyl oxidase
propeptide interacts with the Receptor-Type protein Tyrosine phosphatase-
kappa (RPTP-k) and inhibits β -catenin transcriptional activity in lung cancer
cells”. *Molecular Cell Biology* (2011) Vol: 31: 3286-3297

Nyhan M.J., O’Sullivan G.C., McKenna S.L.. “Role of the VHL (von Hippel-
Lindau) gene in renal cancer: a multifunctional tumour suppressor”. *Biochemical
Society transactions* (2008) Vol: **36**: 472-478.

Palamakumbura A.H., Jeay S., Guo Y., Pischon N., Sommer P., Sonenshein
G.E., Trackman P.C.. “The propeptide domain of lysyl oxidase induces
phenotypic reversion of ras-transformed cells”. *The Journal of Biological
Chemistry* (2004), Vol **279**: 40593-40600.

Parker C., Lakshmi M.S., Piura B., Sherbet G.V.. “Metastasis associated mts1
gene expression correlates with p53 expression. *DNA Cell Biol* (1994) Vol **13**:
343-351

Payne S.L., Hendrix M.J.C., Kirschmann D.A.. “Lysyl oxidase regulates actin
filament formation through the p130 Cas/Crk/DOCK180 signaling complex”.
Journal of Cellular Biochemistry (2006) Vol: **98**:827-837.

Payne S.L., Fogelgren B., Hess A.R., Seftor E.A., Wiley E.L., Fong S.F.T.,
Csiszar K., Hendrix M.J.C., Kirschmann D.A.. “Lysyl oxidase regulates breast
cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated
mechanism”. *Cancer research* (2005) Vol: **65**: 11429-11436.

Pez F., Dayan F., Durivault J., Kaniewski B., Aimond G., Le Provost GS. Deux
B., Clezardin P. Sommer P., Pouyssegur J., Reynaud C.. “The HIF-1-inducible

Lysyl Oxidase activates HIF-1 via Akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth". *Cancer Res* (2011) Vol: **5**: 1647-1657.

Perego R.A., Corizzato M., Bianchi C., Eroini B., Bosari S.. "N- and C-Terminal Isoforms of Arg Quantified by Real-Time PCR Are Specifically Expressed in Human Normal and Neoplastic Cells, in Neoplastic Cell Lines, and HL-60 Cell Differentiation". *Molecular Carcinogenesis* (2005) Vol: **42**: 229-239.

Postovit L.M., Abbott D.E., Payne S.L., Wheaton W.W., Margaryan N.V., Sullivan R., Jansen M.K., Csiszar K., Hendrix M.J.C., Kirschmann D.A.. "Hypoxia/Reoxygenation: A dynamic regulator of lysyl oxidase-facilitated breast cancer migration". *Journal of Cellular Biochemistry* (2008) Vol:**103**: 1369-1378.

Saad F.A., Torres M., Wang H., Graham L.. "Intracellular lysyl oxidase: Effect of a specific inhibitor on nuclear mass in proliferating cells". *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2010) Vol: **396**: 944-949.

Sakai M., MD, Kato H., MD, PhD, Sano A., MD, Tanaka N., MD, Inose T., MD, Kimura H., MD, PhD, Sohoda M., MD, PhD, Nakajima M., MD, PhD, Kuwano H., MD, PhD. " Expression of Lysyl oxidase is correlated with Lt,ph Node Metastasis and Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cel Carcinoma". *Annals of Surgical Oncology* (2009) Vol: **16**: 2494-2501.

Schietke R., Warnecke C., Wacker I., Schodel J., Mole D.R., Campean V., Amann K., Strube M.G., Behrens J., Eckardt K.U., Wiesener M.S.. "The Lysyl oxidase LOX and LOX2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in hypoxia". *The Journal of Biological Chemistry* (2010) Vol: **285**: 6658-6669.

Semenza G.L.. "Targeting HIF-1 for cancer therapy". *Nature Reviews Cancer* (2003) Vol: **3**: 721-732.

Stein U., Arlt F., Walther W., Smith J., Waldman T., Harris E.D., Mertins S.D., Heizmann C.W., Allard D., Birchmeier W., Schlag P.M., Shoemaker R.H.. "The

metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of β -catenin/T-cell factor signalling in colon cancer". *Gastroenterology* (2006) Vol: **131**: 1486-1500.

Thu-Le Q., Harris J., Magliocco A.M., Kong C.S., Diaz R., Shin B., Cao H., Trotti A., Erler K.T., Chung C.H., Dicker A., Pajak T.F.. "Validation of lysyl oxidase as a prognostic marker for metastasis and survival in head and neck squamous cell carcinoma: radiation therapy oncology group trial 90-03". *Journal of Clinical Oncology* (2009) Vol: **27**: 4281-4286.

Wilgus M., MD, Borczuk A.C., Stoopler M., MD, Ginsburg M., MD, Gorenstein L., MD, Sonett J.R., MD, Powell C.A., MD. "Lysyl oxidase: A lung adenocarcinoma biomarker of invasion and survival". *Cancer* (2011) Vol: 117: 2186-2191.

William G., Kaelin Jr.. "The von Hippel-Lindau Tumour Suppressor Protein: O₂ sensing and cancer". *Nature Review Cancer* (2008) Vol: **8**: 865-873.

Xie R., Schlumbrecht M.P., Shipley G.L., Xie S., Bassett R.L., Broaddus R.R.. "S100A4 mediates endometrial cancer invasion and is a target of TGF- β 1 signaling". *Laboratory Investigation* (2009) Vol: **89**: 937-947.

Zhao Y., Min C., Vora S.R., Trackman P.C., Sonenshein G.E., Kirsch K.H.. "The Lysyl oxidase pro-peptide attenuates fibronectin-mediated activation of focal adhesion kinase and p130 Cas in breast cancer cells". *The Journal of Biological Chemistry* (2009) Vol: **284**: 1385-1393.

Zhong H., Chiles K., Feldser D., et al. "Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt/FRAP pathway in humane prostate cancer cells". Implications for angiogenesis and therapeutics". *Cancer Res* (2000) Vol: **60**: 1541-1550.

Ringraziamenti

Al termine di questo lavoro desidero ringraziare tutte le persone che mi hanno sostenuto durante i tre anni di dottorato e durante la stesura di questa tesi.

Il grazie principale va ai miei professori, al prof Perego e alla prof Bianchi per avermi seguita durante i tre anni di dottorato, per tutti i consigli e le correzioni che mi hanno aiutata a crescere ogni giorno di più.....

E poi GRAZIE alle mie colleghe-amiche che ormai, chi più chi meno, conosco da circa quattro anni....

Il primo grazie va a Barbara.....Un grazie speciale perché mi ha aiutata fin dal mio primo giorno di laboratorio....Eh sì!!.....Una buona parte delle cose che so le ho imparate da lei.....Beh! Ancora ora continuo a romperle le scatole e so di poterlo fare sempre....sia per il lavoro che per tutto il resto ☺

E poi c'è Marianna...la mia carissima collega ma soprattutto amica Marianna...
....Mariiii! Sto ritornando in mezzo a voi.....mancano solo pochi giorni e poi ritornerò la solita Vitalba.....Grazie per le serate trascorse insieme, per le ore passate al telefono a raccontare “le nostre cose”, “i nostri lamenti” che poi finivano sempre con qualche battuta che ci faceva ridere per circa mezz'ora.....

E poi c'è Silviaa.....la sposina.....anzi futura sposina.....Beh! grazie mille...grazie per i tuoi consigli “sulle colture” ☺.....grazie per le parole d'incoraggiamento che riesci sempre trovare e poi....ma quanto mi piaci quanto entri in laboratorio e inizi : “.....ma io non lo so.....cioè.....” Ahahahhaha...mi fai morireee!!!!

E per finire.....grazie alle due mitiche tesiste.....Serena e Stefania.....Grazie per aver dato “carattere” alle mie giornate di “stesura e correzione” tesi....grazie per aver condiviso, vabbè alla fine non potevate rifiutarvi, questo periodo di pre-tesi.....*e chi se lo scorda più!!!!!!*

E poi...grazie grazie e ancora grazie a tutti i miei amici...vicini e lontani.....grazie perché siete sempre presenti.....in qualsiasi momento, bello e brutto. Grazie perché riuscite sempre a trovare le parole giuste per me....

Un piccolo grande ringraziamento va a Pietro e Nicoletta, la mia piccola famiglia “del nord”, con cui ho condiviso tante esperienze: il trasferimento a Milano, la laurea specialistica e il dottorato.....Grazie Nico!!!! Per i due anni trascorsi insieme....Grazie per essermi stata vicina in momenti tristi e per aver sempre contato su di me.....

E poi un grazie particolare a Pietro per la pazienza che ha con me, grazie perché riesce a tralasciare tutto e chiamarmi....SUBITO ☺...

E infine alle amiche di sempre, Mariangela e Giusi.....Quanto è triste il fatto che siate lontane.....ma il nostro bene non ha limiti....grazie per i vostri sms per le “chattate”, per le vostre parole di confortoVi voglio un gran bene.....

E infine.....grazie mamma.....per tutto quello che hai fatto e continui a fare per me... Grazie a tutta la forza che riesci a trovare e a conservare anche per me.....

Grazie ai miei fratelli.....agli uomini più importanti della mia vita.....grazie per tutto quello che ogni giorno fate per me.....

Grazie a tutti