



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in Biomedicina e Neuroscienze, indirizzo Oncobiologia Sperimentale

Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche

Settore Scientifico Disciplinare BIO/10

RUOLO DI ENZIMI PROTEOLITICI NELLA NEOANGIOGENESI TUMORALE. “CROSS-TALK” TRA CELLULE ENDOTELIALI, TUMORALI E MATRICE EXTRACELLULARE

IL DOTTORE
SILVIA SALADINO

IL COORDINATORE DELL'INDIRIZZO
Prof.ssa RENZA VENTO

IL TUTOR
Prof. GIULIO GHERSI

CICLO XXV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015

1. INTRODUZIONE

1.1 L'ANGIOGENESI TUMORALE

L'Angiogenesi consiste nella formazione di nuovi vasi capillari da un letto vascolare pre-esistente. È un processo fondamentale nel ciclo riproduttivo della donna, in quegli organi che fisiologicamente si accrescono, o nella riparazione tissutale. In queste condizioni la genesi di nuovi capillari è regolata accuratamente e i nuovi vasi sanguigni maturano velocemente e diventano stabili. Tuttavia se compromessa, l'angiogenesi, può rappresentare l'evento chiave di vari stati patologici: dalle infiammazioni croniche alle malattie ischemiche, dalla crescita tumorale allo sviluppo di metastasi [Folkman J et al, 1992]. Un ruolo biologico fondamentale per la sopravvivenza e proliferazione delle cellule tumorali, per l'appunto, è attribuito all'angiogenesi. Il microambiente dei tumori solidi è caratterizzato da un'eterogeneità nella distribuzione dell'ossigenazione. Cellule tumorali ad una certa distanza dai vasi sanguigni subiscono stress di tipo ipossico. Molte di esse vengono eliminate per l'attivazione di *pathway* apoptotici, ma alcuni cloni cellulari riescono a sopravvivere all'ipossia generata grazie all'attivazione di *pathways* angiogenetiche [Ziyad S et al, 2011]. La formazione di nuovi vasi all'interno del tumore fornisce da un lato l'ossigeno ed i nutrienti necessari alla sua crescita e, dall'altro, rimuove le scorie metaboliche dal sito tumorale. I vasi tumorali formati costituiscono, inoltre, la via principale per la disseminazione metastatica. Lo switch angiogenico può verificarsi in qualsiasi fase della progressione tumorale (in base al tipo di tumore); ma perlopiù è attribuibile ad uno stadio precoce, costituendo così un evento chiave nello sviluppo del fenotipo maligno [Papetti M et al, 2002]. Nel processo angiogenico si possono individuare alcune tappe essenziali, che vedono come protagoniste le cellule endoteliali (Fig. 1). Inizialmente, si verifica una destabilizzazione dei vasi pre-esistenti, dovuta ad un aumento della permeabilità vasale e perdita delle connessioni tra le cellule endoteliali. Segue una fase di migrazione e proliferazione (*sprouting*) di tali cellule verso il punto tissutale che richiede la formazione di nuovi vasi. Questa tappa richiede un complesso rimodellamento della matrice extracellulare (ECM). Successivamente, l'arresto della proliferazione delle cellule endoteliali, e la loro differenziazione, conduce alla formazione di capillari primitivi. La maturazione funzionale di quest'ultimi è caratterizzata dal reclutamento finale di cellule periendotheliali di supporto (periciti e cellule muscolari lisce) [Milkiewicz M et al, 2006]. I vasi sanguigni tumorali non presentano però l'organizzazione della normale microvascolatura. Sono costituiti da un'incompleta membrana basale, uno scarso numero di periciti, ed uno strato

assottigliato di cellule endoteliali; il tutto a determinare un'iper-permeabilità vasale favorente il passaggio di proteine plasmatiche e delle cellule tumorali metastatiche [Tonini T et al, 2003].

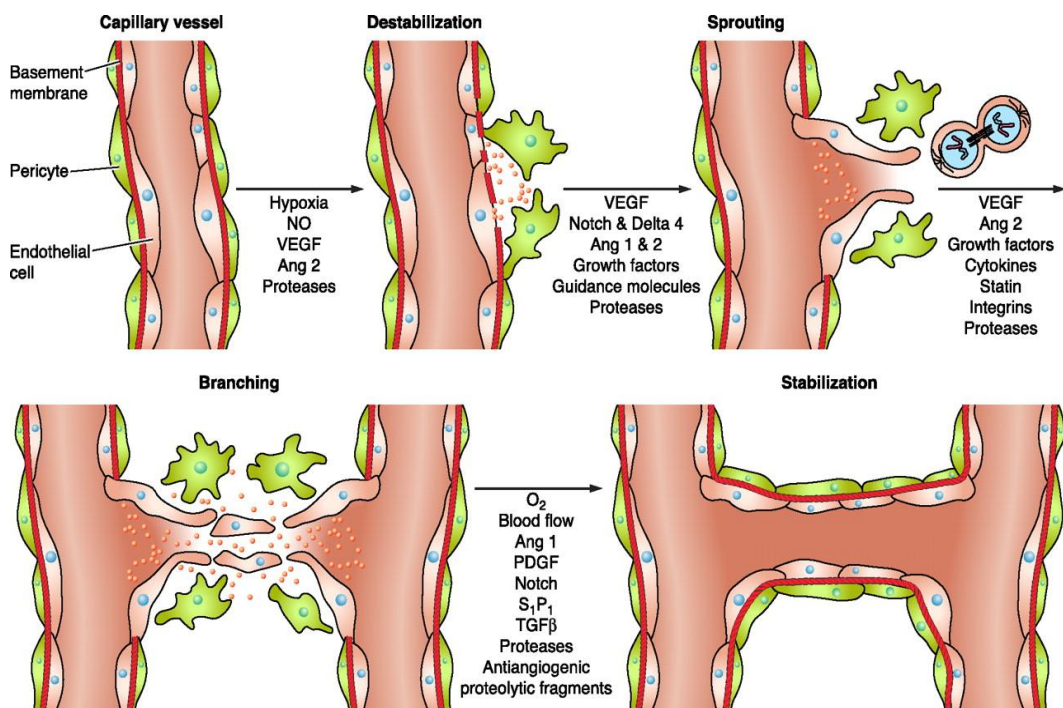


Fig 1.: Step cellulari dell'angiogenesi. (Clapp C et al, 2009)

L'angiogenesi tumorale è di fatto un processo altamente complesso poiché richiede un cross-talk tra cellule endoteliali, tumorali e stromali; frutto di uno squilibrio tra fattori promuoventi ed inibenti l'angiogenesi (Fig. 2). L'endotelio che normalmente si trova in uno stato quiescente (spento) viene "attivato" da stimoli ipossici, infiammatori o di stress meccanici, mediante l'azione autocrina-paracrina di fattori di crescita e citochine prodotti nel microambiente tumorale [Weis SM et al, 2011]. I fattori che attivano la proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali sono principalmente ligandi dei recettori tirosina chinasi, quali VEGF, FGF, EGF, HGF. Possono essere prodotti dalle cellule tumorali (caratterizzate da un'alterata espressione degli oncogeni o dei geni soppressori della crescita), e si legano ai recettori presenti sulle cellule endoteliali. In questo modo alterano, a valle, l'espressione di molecole di adesione e marcatori di superficie dell'endotelio tumorale in crescita (integrine e caderine). Le cellule endoteliali secernono anche fattori di crescita che mantengono il loro stato attivato e facilitano la proliferazione delle cellule tumorali stesse. Un'altra categoria di fattori pro-angiogenetici è rappresentata dagli enzimi proteolitici, come metalloproteasi di matrice (MMP), che orchestrano il rimodellamento dell'ECM, tappa cruciale nella

migrazione ed invasività cellulare. Le cellule endoteliali stimolate a crescere secernono proteasi in grado di digerire la membrana basale sottostante e la matrice extracellulare che si trova intorno ai vasi. La dissoluzione dell'ECM premette, inoltre, il rilascio di quei fattori di crescita che si trovano dispersi nella matrice. Altri tipi di cellule che si trovano nello stroma tumorale possono contribuire localmente allo sviluppo dell'angiogenesi, come fibroblasti e cellule infiammatorie. I fibroblasti sono i mediatori chiave nel riparo tissutale. Quelli associati al microambiente tumorale (Tumor associated Fibroblasts, TAF) secernono i fattori EGF (Epidermal growth factor), HGF (Hepatocyte growth factor), IGF-1 e 2 (Insulingrowth factor), e gli enzimi MMP (Matrix metalloproteinases), promuovendo l'invasione sia delle cellule tumorali sia endoteliali. Mediante il rilascio della citochina SDF1 (Stromal cell-derived factor 1), stimolano l'angiogenesi reclutando le cellule progenitrici endoteliali nell'ambiente tumorale. È stato riscontrato che le cellule TAF, producendo grandi quantità di proteine della matrice, causano un accumulo di ECM che incrementa la pressione dei fluidi interstiziali e dell'ipossia attorno al tumore [Orimo A et al, 2005]. Macrofagi e neutrofili hanno pure un ruolo nella progressione neoplastica. L'infiammazione spesso associata al tumore e l'ipossia reclutano queste cellule al sito tumorale, stimolando in loro l'espressione di fattori di crescita pro-angiogenici ed enzimi litici [Weis SM et al, 2011].

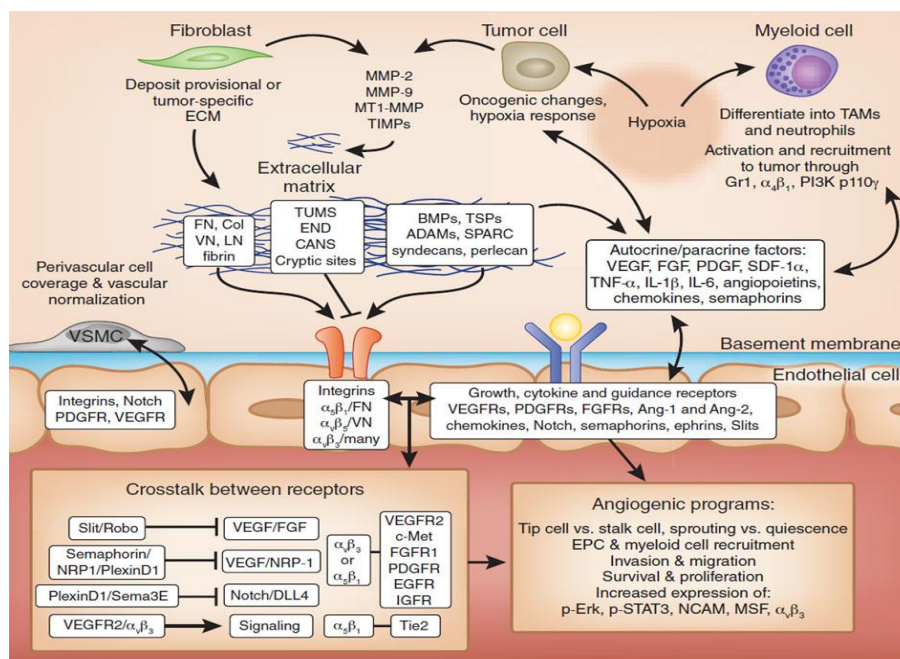


Fig 2.: Mediatori dell'attivazione endoteliale. (Weis SM et al, 2011)

1.2 REGOLATORI DELL'ANGIOGENESI

1.2.1 Fattori di crescita e molecole di adesione

L'angiogenesi è orchestrata da una varietà di attivatori e inibitori. Questi mediatori molecolari vengono secreti dalle cellule endoteliali, da quelle tumorali e dallo stroma intorno a queste. Principalmente sono fattori di crescita che agiscono in modo autocrino e paracrino; la valutazione della loro espressione nei campioni tumorali può essere utile nel determinare lo stato angiogenetico delle neoplasie. Il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) è il fattore angiogenetico più studiato da un punto di vista prognostico, a causa del potente e specifico effetto pro-angiogenico che esercita [Dvorak HF et al, 1999]. L'inattivazione di uno dei suoi alleli nel topo provoca anomalie vascolari mortali, suggerendo un importante ruolo biologico per questo fattore [Carmeliet P et al, 1996]. Diversi lavori scientifici riportano una correlazione positiva fra espressione di VEGF ed invasione vascolare, metastasi linfonodali e stadio tumorale. Questo fattore risulta iperespresso in una varietà di tumori umani, come quello al seno, colon, polmone e prostata [Ferrara N et al, 1997]. Si ritiene che l'ipossia generata nel microambiente tumorale stimoli l'espressione di VEGF sia in cellule normali che neoplastiche, attraverso un aumento della trascrizione (mediante il fattore di trascrizione HIF-1 α) e stabilità del suo mRNA. La sua espressione può essere indotta anche dal pathway di altri fattori e citochine infiammatorie quali PDGF, EGF, TNF-alfa, TGF-B e IL-1 [Tonini T et al, 2003]. Il segnale del VEGF, come quello di altri fattori di crescita, può essere regolato non solo a livello trascrizionale, ma anche per via recettoriale e processamento proteolitico. Sei membri della famiglia di VEGF sono noti. Tutti hanno capacità, in parte sovrapposte, di interagire con differenti recettori espressi principalmente sull'endotelio vascolare [Roskoski Jr, 2007]. Diverse varianti del VEGF sono in grado di interagire non solo con i recettori specifici, ma con componenti dell'ECM; il loro rilascio dalla matrice è mediato da metalloproteasi extracellulari e plasmina, che ne regolano di fatto l'attività. La forma maggiormente espressa del VEGF è VEGF-A, glicoproteina di circa 34-46 KDa che, per effetti di splicing alternativo, consta di otto isoforme. Tra quest'ultime, VEGF-165, -189, e -121 sono quelle predominanti nei tessuti e campioni tumorali [Roskoski Jr, 2007]. Esse possono legare l'eparan-solfato dell'ECM. L'azione delle metalloproteasi le può mobilitare dalla matrice, rendendole libere di agire sui recettori specifici per il VEGF, che abbondano in cellule endoteliali. Si tratta di tre

recettori tirosin-chinasici: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR -2 (Flk-1/KDR) e VEGFR-3 [Roskoski Jr, 2007]. La loro attivazione può indurre gli stessi processi cellulari che inducono molti altri recettori di fattori di crescita, come la migrazione, la sopravvivenza e proliferazione cellulare. Tuttavia, i VEGFR sembrano specifici nella trasduzione del segnale che porta all'organizzazione delle cellule endoteliali in tubuli vascolari tridimensionali, ed all'induzione della permeabilità vascolare. Le proprietà angiogeniche del VEGF, quali proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali, ed incremento di permeabilità vascolare, sono principalmente mediate dall'interazione con VEGFR-2 [Roskoski Jr, 2007]. L'espressione di questo recettore viene aumentata durante l'ipossia, ed il suo legame con VEGF-A promuove l'angiogenesi mediante i pathway delle chinasi PKC, PI3K, e FAK (Fig. 3). Questo recettore è un marcatore angiogenico overespresso sull'endotelio di diversi tumori solidi, tra cui cancro al seno, ovarico e pancreatico (Deshpande N. et al, 2011). Il ruolo critico nella formazione dei vasi sanguigni nei tumori e nelle metastasi rende il VEGF un potenziale bersaglio nella terapia di molte neoplasie umane.

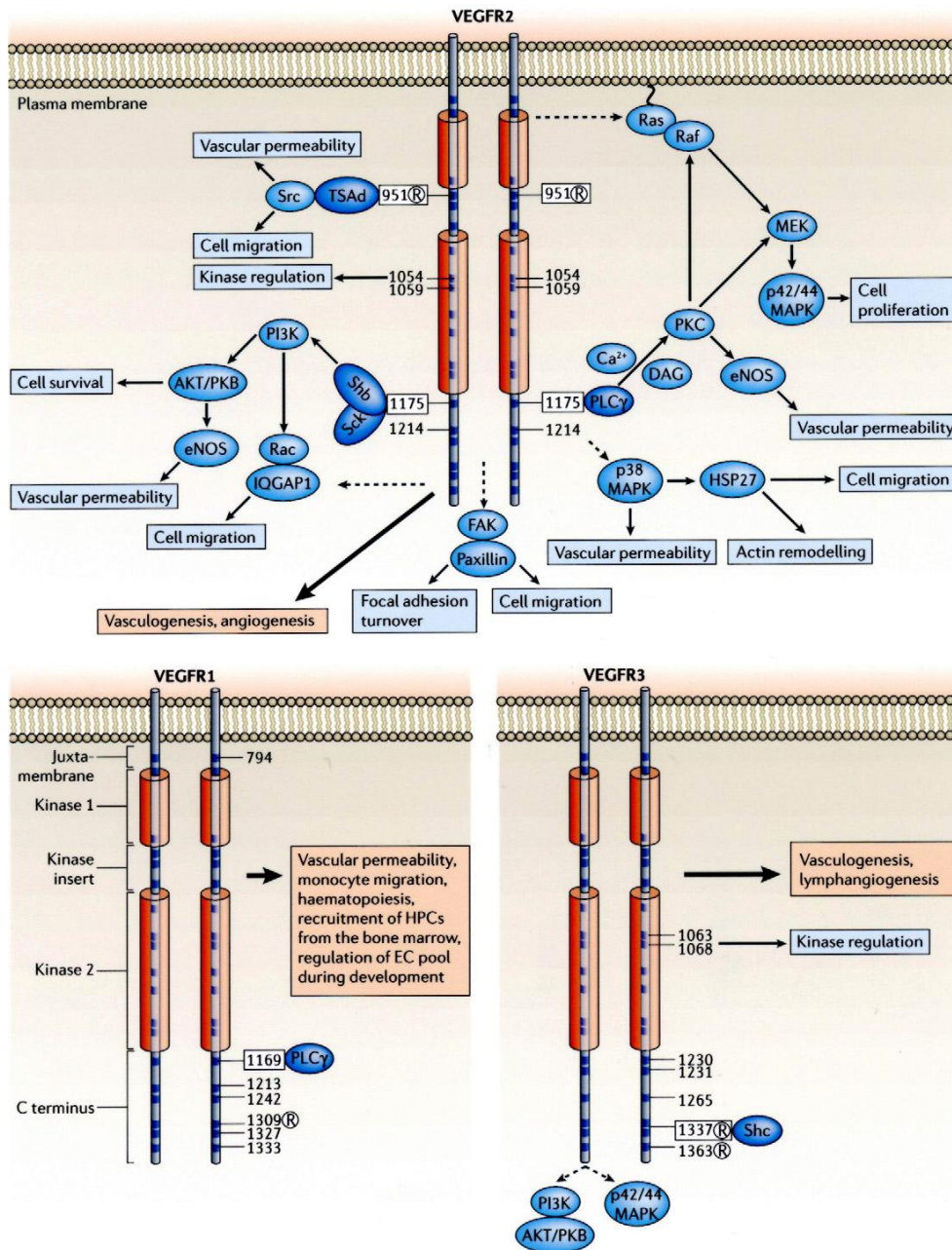


Fig 3.: Trasduzione del segnale dei recettori VEGFR. (Roskoski R et al, 2007)

Il Fibroblast growth factor (FGF), come il VEGF, stimola la proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali. Fra le diverse forme individuate, FGF-1 (acido) e FGF-2 (basico) sono stati descritti come induttori dell'angiogenesi. Questi contengono segnali peptidici che regolano la loro secrezione nell'ambiente extracellulare, dove possono legare gli "heparan-sulfate proteoglycans" (HSPG) presenti nell'ECM. Da qui, gli FGF possono agire direttamente sulle cellule bersaglio, oppure possono essere rilasciati attraverso la proteolisi delle matrici. Questi fattori di crescita esplicano la loro azione interagendo con i recettori FGFR espressi sull'endotelio tumorale che, essendo tirosin-chinasici, attivano segnali di sopravvivenza cellulare simili a quelli menzionati per i

VEGFR [Tonini T et al, 2003]. Altri fattori endogeni pro-angiogenici sono riportati in figura 4. La promozione dell'angiogenesi nel tumore può essere il risultato anche del decremento di alcuni fattori anti-angiogenici. Tumori che si trovano in uno stato di crescita inibita possono secernere fattori quali endostatina, angiostatina, trombospondina (TSP) ed inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMP) [Folkman J, 2002]. L'endostatina viene generata dal taglio di un frammento di 20 KDa del collagene XVIII, riscontrabile nella parete dei vasi e nella membrana basale. L'endostatina è in grado di legare il recettore Flk-1, interferendo con i segnali del VEGF. Inibisce la migrazione non solo delle cellule endoteliali, ma anche di quelle tumorali [Hanai J et al, 2002]. Effetti simili sono stati attribuiti all'angiostatina, frammento del plasminogeno di 38 KDa in grado di inibire l'attivazione del plasminogeno, interagendo con il suo attivatore t-PA [Stack MS et al, 1999]. Un altro fattore anti-angiogenico è il frammento di 140 KDa della trombospondina (TSP-1), generato per azione di diversi enzimi proteolitici [Taraboletti et al, 2000]. Interagendo con le molecole CD36 e CD47 espresse sulla superficie delle cellule endoteliali, attiva in queste cellule una cascata di eventi apoptotici [Sargiannidou I et al, 2001]. In diversi tipi di tumore mammario l'azione di TSP-1 risulta repressa [Watnick et al, 2003]. La trombospondina-1 è regolata da p53 normale. La perdita di funzione di p53 nelle cellule tumorali può determinare un drastico decremento del livello di questo inibitore dell'angiogenesi [Grand SW et al, 1998].

PRO-ANGIOGENICI	ANTI-ANGIOGENICI
Angiogenina	Angioarrestina
Angiopoietina- 1	Angiotensina
a-FGF	Tumstatina
b-FGF	Interferoni
Eritropoietina	Angiostatina
TNF- α (bassi livelli)	TNF- α (alti livelli)
Interleuchina-8	Interleuchina-12
VEGF	Inibitori tissutali delle metalloproteasi
PIGF	Vasculostatina
PDGF	Trombospondina
Prostaglandine E ₁ , E ₂	Endostatina
TGF- α e TGF- β	Inibitori dell'attivatore del plasminogeno

Fig 4.: I fattori endogeni pro e anti-angiogenici più comuni

Durante e dopo la fase di replicazione e migrazione, le cellule endoteliali non necessitano solo dell'azione dei fattori di crescita e dei loro recettori, ma dipendono strettamente dalla presenza di cosiddette molecole d'adesione [Liekens et al, 2001]. Le principali famiglie in cui si raggruppano quest'ultime sono quattro: selectine, caderine, superfamiglia delle immunoglobuline, integrine. I Membri di ognuna di queste famiglie prendono parte al processo di neovascolarizzazione [Liekens S et al, 2001]. Le integrine rappresentano una classe di molecole d'adesione importante sia nella fase di moltiplicazione e migrazione delle cellule endoteliali, sia in quella terminale del processo neoangiogenico (formazione vera e propria della struttura vasale). Le cellule endoteliali sono in grado di esprimere molteplici combinazioni eterodimeriche delle subunità α e β integriniche; queste combinazioni determinano la specificità dell'adesione con i componenti della matrice extracellulare. Ruolo predominante nell'angiogenesi sembra quello dell'integrina $\alpha\beta3$ [Brooks PC et al, 1995b]. Questa molecola d'adesione non è rilevabile nell'endotelio quiescente, ma è abbondantemente espressa in seguito alla liberazione di citochine nell'ambito della neoangiogenesi tumorale. Costituisce un recettore in grado di legare numerose proteine dell'ECM, tra cui: fibronectina, vitronectina, e laminina. Questa integrina può co-localizzare con la forma proteolitica attiva di MMP-2 sulla superficie dell'endotelio in crescita, guidando nelle cellule endoteliali i fenomeni degradativi dell'ECM [Brooks PC et al, 1996]. Un'ulteriore integrina coinvolta nell'angiogenesi tumorale è l'eterodimero $\alpha\beta5$. Le integrine possono interagire sulla membrana cellulare con i recettori per specifici fattori di crescita iperespressi dal tumore, attivandone il segnale a valle. Per esempio, l'interazione tra l'integrina $\alpha\beta3$ ed il recettore per FGF attiva la risposta angiogenica di questo fattore di crescita; mentre $\alpha\beta5$ coopera con il segnale del VEGF interagendo con il suo recettore specifico [Friedlander M et al, 1995]. Un'altra classe di molecole d'adesione coinvolte nell'angiogenesi fa capo alle caderine dell'endotelio vascolare (VE-caderine). Queste regolano le interazioni intercellulari calcio-mediate; ed una loro deficienza induce apoptosi endoteliale ed inibisce la trasmissione del segnale di sopravvivenza mediato dal VEGF [Esser S et al, 1998]. Molecole d'adesione delle cellule vascolari-1 (VCAM-1), appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline, sono normalmente espresse dall'endotelio quiescente ma risultano notevolmente aumentate in seguito a stimolazione di citochine pro-angiogenetiche. Anche le E-selectine, fondamentali nel reclutamento dei leucociti circolanti, inducono migrazione endoteliale *in vitro* e promuovono fenomeni angiogenetici *in vivo* [Liekens et al, 2001].

1.2.2 Enzimi proteolitici

Per iniziare la formazione dei nuovi capillari, le cellule endoteliali dei vasi sanguigni esistenti devono degradare la membrana basale e invadere lo stroma del tessuto adiacente. Il rimodellamento dell'ECM che ne deriva richiede l'intervento di proteinasi, la cui azione spesso è correlata a quella dei fattori di crescita pro-angiogenici. I principali gruppi di enzimi degradanti l'ECM sono metalloproteasi di matrice (MMP), serino-proteasi, cistein- e aspartic-proteasi; suddivise in sottogruppi a seconda delle caratteristiche biochimiche del loro sito attivo [Twining SS et al, 1994; Pepper, M.S. 2001, Jackson C. 2002, Luttun, A, et al 2000]. La famiglia delle MMP nell'uomo comprende diverse endopeptidasi, caratterizzate da una struttura multidominio, un sito attivo che coordina lo zinco, e la richiesta di un taglio proteolitico per attivare la forma zimogena. Gli enzimi appartenenti alla famiglia delle MMPs sono in grado di degradare principalmente componenti della matrice extracellulare, e perciò vengono implicati nei processi di migrazione cellulare e rimodellamento tissutale associati con il cancro, e con diversi stadi della cancerogenesi [Egablád M et al, 2002]. La correlazione tra la loro overespressione e la progressione tumorale è supportata da esperimenti di silenziamento genico in modelli tumorali murini [Egablád M et al, 2002; Bergers G et al, 2000a]. Le MMP, degradando la membrana basale e la matrice extracellulare, possono facilitare la migrazione ed invasione sia delle cellule tumorali sia endoteliali, promuovendo le metastasi e l'angiogenesi [Liotta L et al, 1980; Nagase H et al, 1999]. Il ruolo di MMP nella formazione di nuovi vasi risulta oggi molto complesso. Questa complessità nasce dalla scoperta che diverse MMP possono esibire un'attività pro- o anti-angiogenica sulla base del tipo di neoplasia o del particolare stadio di sviluppo tumorale [Martin MD et al, 2007]. Inoltre, queste proteasi possono agire sia direttamente che indirettamente nel rimodellamento dell'ECM, riuscendo così a controllare diverse vie di segnalazione cellulare. Le MMP solubili, per via diretta, sono in grado di degradare *in vitro* essenzialmente tutti i componenti dell'ECM, comprendendo collagenasi, gelatinasi e stromelisine. Lo stesso vale per quelle ancorate alla membrana, le MT-MMP (Fig. 5). Indirettamente, le MMPs esplicano la loro azione attivandosi tra loro a cascata, e processando altri substrati quali fattori di crescita e chemochine che hanno un ruolo nella neoangiogenesi. Per esempio, il fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF), la proteina che lega il fattore di crescita insulinico (IGF-BP), e la chemochina SDF-1 possono essere tagliati ed inattivati dalle metalloproteasi [McQuibban GA et al, 2001; Fowkels JL et al, 1995]. Due inibitori angiogenetici, angiostatina ed endostatina, sono

prodotti per azione di diverse MMPs. Il primo è generato *in vitro* per intervento di MMP2-7-9-12 sul plasminogeno [O'Reilly MS et al, 1994; Nyberg P et al, 2005]. Il secondo, per azione di MMP3-7-9-12-20 sul collagene XVIII [O'Reilly MS et al, 1997; Handsley MM et al, 2005]. Le MMPs possono funzionare anche liberando VEGF e bFGF dall'ECM, che possono così agire sui propri recettori attivando pathway angiogenetici.

ENZIMA	SUBSTRATO	ATTIVATO DA	ATTIVATORE DI
<i>Collagenases</i>			
Collagenase-1 (MMP-1)	Collagen I, II, II (III>I), VII, VIII, X, gelatin, L-selectin, tenascin, serpins, α 2-macroglobulin, TNF precursor	MMP-3,-10, plasmin, kallikrein	MMP-2
Collagenase-2 (MMP-8)	Collagen I, II, III, (I>III), VII, VIII, X, gelatin, fibronectin, serpins, α 2-macroglobulin	MMP-3, -10, plasmin	ND
Collagenase-3 (MMP-13)	Collagen I, II, III (II>I o III), IV, IX, X, XIV, gelatin, fibronectin, laminin, serpins, PAI	MMP-2, -3, -10, -14, -15, plasmin	MMP-2,-9
<i>Gelatinases</i>			
Gelatinase A (MMP-2)	Gelatin, collagen I,IV,V,VII, X, XI, XIV, fibronectin, laminin, tenascin, vitronectin, α 2-macroglobulin, TNF precursor, angiostatin	MMP-1, -7, -13, -14, -15, -16, -24	MMP-9, -13
Gelatinase B (MMP-9)	Gelatin, collagen IV,V,VII,X,XIV, elastin, vitronectin, α 1-antitrypsin, α 2-macroglobulin, TNF precursor, angiostatin	MMP-2, -3, -13, plasmin	ND
<i>Stromelysins</i>			
Stromelysin-1 (MMP-3)	Collagen III, IV,V, IX, X, gelatin, fibronectin, laminin, tenascin	Plasmin, kallikrein, elastase	MMP-1, -8, -9, -13
Stromelysin-2 (MMP-10)	Collagen III, IV,V, gelatin, fibronectin, elastin	Plasmin, kallikrein, elastase	MMP-1, -7, -8,-9,-13
Stromelysin-3 (MMP-11)	α 1-proteinase inhibitor, fibronectin, laminin	Furin	ND
Matrilysin (MMP-7)	Collagen IV, gelatin, fibronectin, laminin, tenascin, elastina, vitronectin, angiostatin	MMP-3, plasmin	MMP-2
Metalloelastase (MMP-12)	Collagen IV, gelatin, fibronectin, laminin, elastin, vitronectin, α 1-antitrypsin, TNF precursor, angiostatin	ND	ND
<i>Membrane-type MMPs</i>			
MT-1MMP	Collagen I, II, II, gelatin, fibronectin, laminin, tenascin, vitronectin	Plasmin, furin	MMP-2, -13
MT2-MMP	Fibronectin, laminin, tenascin	ND	MMP-2,-13
MT3-MMP	Gelatin, casein	ND	MMP-2
MT4-MMP	Gelatin, TNF precursor	ND	MMP-2
MT5-MMP	ND	ND	MMP-2

Fig 5.: Classificazione delle metalloproteasi (MMP)

Nella tumorigenesi, lo sviluppo di una rete capillare richiede il supporto di MMP proangiogeniche. Le cellule endoteliali in stato quiescente non esprimono livelli significativi di MMP. Invece, durante le fasi di "sprouting" e formazione di tubuli, cellule endoteliali attivate over-esprimono MMP-1, -9 e -14 [Deryugina EI, 2010]. MMP14 è uno dei più potenti rimodellatori del microambiente pericellulare [Itoh Y et

al, 2006]; la sua espressione vascolare è confinata nella regione di germinazione capillare, in modo che proliferazione e degradazione del collagene risultino coordinati nelle cellule endoteliali in crescita [Yana I et al, 2007]. MMP14, vicino a tali aree ben precise della superficie cellulare, compartimentalizza l'attività di metalloproteasi solubili, come pro-MMP2 [Itoh Y et al, 2006]. MMP14, coinvolta nella maturazione della subunità α v β 3, può influenzare l'angiogenesi tumorale modulando anche l'integrina angiogenica α v β 3 [Ratnikov BI et al, 2002]. Esperimenti di silenziamento genico *in vivo* dimostrano che MMP14 è implicata nella risposta angiogenetica mediata da FGF-2 [Zhou Z et al, 2000]. Questo enzima sembra coinvolto anche nell'“up-regulation” del VEGF che stimola la crescita e l'angiogenesi del tumore glioma [Deryugina RI et al, 2002]. Dati recenti dimostrano che MMP14 è responsabile del processamento proteolitico e rilascio dalle cellule tumorali della Semaforina 4D, un induttore della vascolarizzazione [Basile JR et al, 2007].

La più potente metalloproteasi pro-angiogenetica resta MMP9. Questa gelatinasi interviene nell'innesco dello switching angiogenico, come dimostrato da un modello di carcinogenesi pancreatica in topi transgenici [Bergers et al, 2000]. La over-espressione di VEGF è stata rilevata anche in modelli di tumore ovarico [Huang S te al, 2002], colonrettale [Yang L et al, 2004] e mammario [Ahn Go et al, 2008]. MMP9 può agire mobilitando il VEGF e FGF-2 sequestrati dalla matrice extracellulare [Bergers et al, 2000b, Ardi VC et al, 2009]. Questo ruolo è stato attribuito particolarmente a MMP9 rilasciata nel tessuto tumorale da macrofagi e neutrofili infiltranti [Huang S et al, 2002]. I neutrofili infiammatori potrebbero servire, infatti, come risorsa immediata di MMP9 in tessuti pre-angiogenici [Tazzyman S et al, 2009]. MMP9, durante la degradazione dei componenti dell'ECM, può inoltre smascherare alcuni epitopi dal collagene I e IV che sono capaci di modulare l'attacco delle cellule endoteliali diversamente; facilitando formazione di nuovi vasi. MMP9 sembra essere coinvolta pure nella mobilitazione di cellule precursori HPC e EPC al tumore primario, in risposta a chemochine e fattori di crescita [Papaspnyridonos M et al, 2008]. Da queste cellule progenitrici, di origine midollare, può dipendere anche la neovascolarizzazione [Asahara T et al, 1999; Grunewald M et al, 2006]. Capacità pro-angiogenetica è attribuibile anche all'altra gelatinasi nota, la MMP2 [Itoh T et al, 1998]. Quest'ultima viene over-espressa in parecchi tumori solidi; ed è noto il suo coinvolgimento nel rilascio di FGF-2 dalla matrice extracellulare [Tholozan FM et al, 2007]. MMP2 non appare direttamente coinvolta nella promozione dell'angiogenesi tumorale *in vivo*, rivestendo un ruolo più marginale rispetto a MMP9. L'espressione di MMP2 risulta molto determinante nella

promozione di altri aspetti della crescita tumorale, come la formazione di metastasi [Gupta GP et al, 2007; Deryugina EI et al, 2010]. MMP1 è un'altra metalloproteasi implicata nella promozione dell'angiogenesi. Questo enzima, una volta rilasciato dalle cellule tumorali, può attivare proteoliticamente il recettore PAR-1, espresso ad alti livelli sulle cellule endoteliali. In questo modo, mediante trasduzione del segnale delle MAP-chinasi, viene promossa l'attivazione dell'endotelio [George T et al, 2006]. Inoltre, l'espressione di MMP1 nel carcinoma mammario sembra favorire permeabilità vascolare ed extravasazione delle cellule tumorali nei capillari polmonari (metastasi) [Gupta GP et al, 2007; Minn AJ et al, 2005]. Un altro metalloenzima prodotto da una varietà di cellule cancerose, e promotore angiogenesi, è MMP7. Questo è in grado di stimolare direttamente la proliferazione delle cellule endoteliali nel tumore al colon-retto [Nishizuka I et al, 2001]. Un ruolo pleiotropico nell'angiogenesi, come per MMP2, è attribuibile a MMP3. Alcune metalloproteasi sono correlate, invece, ai fenomeni angiogenetici con base principalmente infiammatoria. È il caso di MMP8 [Deryugina EI et al, 2010]. Altri enzimi appartenenti a questa famiglia di proteasi mostrano un ruolo perlopiù anti-angiogenico. Ne è esempio MMP12, che principalmente genera angiostatina dal plasminogeno [Dong Z et al, 1997]. Dalle cellule vengono secrete anche proteine che controllano l'attività proteolitica delle metalloproteasi di matrice. Si tratta dei TIMP, enzimi endogeni inibitori delle MMP, e quindi ritenuti in grado di bloccare la crescita e l'angiogenesi tumorale. Quattro membri sono stati identificati per questa famiglia di proteine: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 [Visse R et al, 2003]. I TIMP possono influenzare tutti i processi MMP-mediati. In particolare, TIMP-2 è capace di inibire tutte le metalloproteasi. Dati sperimentali associano TIMP-2 con l'inibizione della progressione cancerosa, nonché dell'angiogenesi e delle metastasi [Khokha R et al, 1992]. I suoi livelli di espressione risultano scarsi o assenti in vari tumori umani a carattere invasivo, come quello alla prostata, testa e collo; a causa di modifiche epigenetiche nel suo gene [Galm O et al, 2005; Sanderson N et al, 1995]. TIMP-2 è il solo membro TIMP capace di interagire sulla membrana cellulare sia con MT1-MMP sia con pro-MMP2. Per MMP-2 è un attivatore se presente a basse concentrazioni, ma è un inibitore ad alte concentrazioni [Nagase H et al, 2006]. Studi recenti hanno riconosciuto a TIMP-2, come ad altri inibitori, importanti funzioni biologiche non direttamente correlabili all'inibizione delle MMP. Ad esempio, TIMP-2 può esplicare un'azione anti-angiogenica mediante interazione con l'integrina $\alpha 3\beta 1$ presente sulle cellule endoteliali [Seo DW et al, 2003]; oppure legando direttamente sull'endotelio il recettore IGF-1R [Fernandez CA et al, 2010]. Un altro inibitore di MMP

noto per esercitare attività antiangiogeniche sia *in vitro* che *in vivo*, è TIMP-1 [Johnson MD et al, 1994; Martin DC et al, 1999]. Si tratta di una proteina multifunzionale. Infatti, è stato dimostrato che TIMP-1 può inibire l'invasività ed il potere metastatico di varie linee di cellule cancerose [Schultz RM et al, 1988; Tsuchiya Y et al, 1993; Khokha R]; come può promuoverne la progressione, in base al tipo di tumore [Ikenaka Y et al, 2003].

Il rimodellamento della matrice extracellulare associato all'angiogenesi tumorale prevede il coinvolgimento di differenti sistemi proteolitici, tra cui anche quello del plasminogeno. Questo appartiene ad una famiglia di serin-proteasi, e può agire direttamente o meno attivando le MMPs, e/o liberando anch'esso fattori di crescita e citochine sequestrate nell'ECM (Fig. 6). Il sistema è composto da più membri: il plasminogeno, (pro-enzima inattivo); gli attivatori del plasminogeno in plasmina (uPA e tPA); il recettore di membrana per uPA (uPAR); due inibitori dell'attivazione del plasminogeno, (PAI-1 e 2). Si ritiene che uPA, associato alla superficie cellulare, inizi una cascata proteolitica che vede l'attivazione della plasmina e culmina con la degradazione di laminina e fibronectina circostanti; il rilascio di TGF- β , VEGF e b-FGF dalla matrice; l'attivazione di MMP1, -3 e -9 [Rakic JM et al, 2003]. Le cellule endoteliali quiescenti esprimono costitutivamente l'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA), ma la proteolisi pericellulare resta trattenuta per via della concomitante espressione dell'inibitore PAI-1 [Carmeliet P et al, 2000; Simpson AJ et al, 1991]. Le stesse cellule, invece, acquisiscono capacità migratoria quando uPA, uPAR e PAI-1 sono sovraregolate [Pepper MS et al, 1992-1993]. Studi *in vivo* dimostrano come la crescita tumorale sia dipendente dalla generazione di plasmina mediata da uPA [Sabapathy KT et al, 1997]. Durante l'angiogenesi, la proteolisi della plasmina necessita dell'azione anche di PAI-1 nelle fasi di stabilizzazione e assemblaggio delle cellule endoteliali in tubuli. E' noto che l'ipossia, forte stimolo angiogenetico, incrementa l'espressione di uPA e PAI-1 in cellule endoteliali [Uchiyama T et al, 2000]. Una varietà di fattori pro-angiogenici controlla l'espressione del sistema del plasminogeno. VEGF e b-FGF possono indurre sinergicamente l'espressione di uPA, tPA, uPAR e PAI-1 [Carmeliet P et al, 2000]. L'importanza dell'interazione uPA-uPAR nell'angiogenesi è sostenuta da diversi studi *in vivo* [Mazar AP, 2001]. Alti livelli di uPA e uPAR correlano con scarsa prognosi in pazienti colpiti da diversi tipi di cancro [Sugiura Y et al, 1999; Stephens RW et al, 1998; Pedersen H et al, 1994]. Anche l'angiostatina, regolatore negativo dell'angiogenesi, può essere generata per proteolisi del plasminogeno da parte di plasmina, uPA, tPA e/o MMPs [Gately S et al, 1997]; suggerendo ruoli biologici

multipli per tutte queste classi enzimatiche.

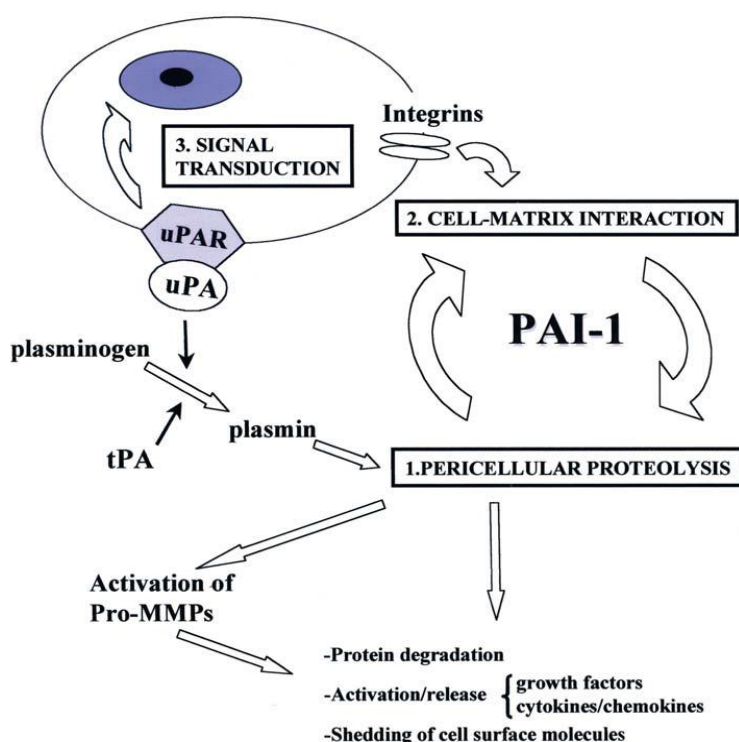


Fig 6.: Sistema del Plasminogeno/Plasmina

Altre serin-proteasi menzionate da alcuni modelli angiogenetici sono quelle transmembrana di tipo II (TTSP) [Netzel-Arnett S et al, 2003]. A questa categoria appartengono la dipeptidil peptidasi IV (DPP4/CD26) e la seprase (Fibroblast Activation Protein, FAP). Entrambe sono glicoproteine di membrana capaci di riconoscere e processare sequenze proteiche con prolina o alanina in penultima posizione, liberando dipeptidi Xaa-Pro o Xaa-Ala. Sequenze Gly-Pro, comuni nei collagene, costituiscono loro bersagli. DPP4, espressa a livelli basali su cellule epiteliali ed endoteliali, è in grado di interagire infatti con il collagene nativo e denaturato (gelatina). L'inibizione del legame di DPP4 alla gelatina, mediante anticorpo specifico, blocca in vitro la migrazione di fibroblasti in matrici collagenitiche [Bauvois B, 1988; Loster K et al, 1995; Gherzi G et al, 2002]. Essendo espressa sulla superficie dei vasi sanguigni, DPP4 può entrare in contatto con ormoni e chemochine circolanti; alcuni dei quali ricchi in prolina in penultima posizione nella regione N-terminale. Il processamento di queste molecole da parte di DPP4 può avere diverse funzioni

biologiche [Mentlein R, 2004; Chen WT et al, 2003]. Per esempio, dall'azione di DPP4 sul neuropeptide Y (NPY) ne deriva il prodotto NPY₃₋₃₆ capace di promuovere la migrazione nelle cellule endoteliali [Gherzi G et al, 2001]. DPP4, inoltre, può processare membri della famiglia delle chemochine CXC, come quelle pro-angiogeniche IL-8 e SDF-1, impedendone il legame al proprio recettore [Mentlein R, 1999]. Seprase, al contrario di DPP4, è assente generalmente nei tessuti differenziati normali. Può essere rilevata specificatamente in cellule LOX di melanoma metastatico e in fibroblasti stromali attivati [Goldstein LA et al, 1997; Niedermeyer J et al, 1997]. E' stata implicata nell'invasività delle cellule tumorali; e di quelle endoteliali e fibroblasti associati al tumore [O'Brien P et al, 2008; Huber MA et al, 2003]. Un incremento della sua espressione è stato associato con lo stato più maligno del cancro al colon, e con le metastasi linfonodali di altri tumori gastrici [Henry LR et al, 2007; Mori et al, 2004]. Sia DPP4 che FAP si presentano sulla superficie cellulare come omodimeri. Il 68% di omologia tra le loro strutture primarie ne consente l'eterodimerizzazione. Il complesso DPP4/FAP è stato identificato negli "invadopodia" di cellule endoteliali e fibroblasti cresciute in vitro su matrici collageniche. Il complesso sembra contribuire all'invasività delle cellule endoteliali, importante fenomeno dell'angiogenesi tumorale, insieme ad altri enzimi litici presenti sul versante migratorio della superficie cellulare [Gherzi G et al, 2002].

1.3 TERAPIA ANTI-ANGIOGENICA

L'identificazione di bersagli farmacologici per la cura del cancro non è semplice, trattandosi di una patologia multifattoriale. Le più tradizionali terapie antitumorali prevedono l'utilizzo di agenti chemioterapici volti a colpire indiscriminatamente le cellule in rapida divisione, a livello della replicazione del DNA e sintesi proteica. A causa dei molteplici effetti collaterali associati a queste pratiche cliniche, lo studio di terapie anti-angiogenetiche più recentemente ha preso campo nella ricerca oncologica [Kubota Y, 2012]. Il vantaggio della terapia anti-angiogenetica è che ha come target i vasi sanguigni neoformati, che supportano la crescita della massa tumorale, piuttosto che le cellule tumorali stesse. Inoltre, le cellule endoteliali sono geneticamente stabili e difficilmente subiscono mutazioni; cosa che non dovrebbe permetter loro di sviluppare

resistenza ai farmaci. L'effetto di farmaci anti-angiogenetici sulla massa tumorale si è mostrato perlopiù citostatico. Per queste ragioni, le attuali terapie antiangiogenetiche risultano più utili in combinazione con altri farmaci antitumorali. Insomma, lo scopo della terapia anti-angiogenica nel cancro è indurre il blocco della crescita neoplastica, creando le condizioni per un ulteriore intervento farmacologico con sostanze che agiscono direttamente sul tumore con differenti meccanismi d'azione. Il pathway del VEGF, giocando un ruolo centrale nella crescita di nuovi vasi sanguigni, è stato il bersaglio molecolare più mirato dalla terapia anti-angiogenica [Kubota Y, 2012; Roskoski R Jr, 2007]. Bavacizumab (Avastin) è un anticorpo monoclonale diretto contro il VEGF solubile; impedisce il legame di questo fattore con il suo recettore. E' stato approvato dall'FDA per il trattamento del cancro colonrettale metastatico, polmonare e renale, in combinazione ad altri chemioterapici [Shih T et al, 2006]. Inibitori ad ampio spettro di tirosin-chinasi, come Sorafenib e Sunitinib, capaci di bloccare i recettori VEGFR, sono stati approvati per il trattamento clinico del carcinoma renale ed epatocellulare [Gotink KG, 2010]. Bloccando il pathway del VEGF, però, vengono danneggiati non solo i vasi tumorali ma anche quelli sani, apportando spesso nei pazienti che fanno uso di inibitori del VEGF emorragie, proteinuria, leucopenia, linfopenia [Verheul HM et al, 2007]. Inoltre, l'inibizione di questo fattore pro-angiogenetico può stimolare nel tumore una up-regolazione di FGF e angiopoietine, per compensazione. Casi di resistenza alle terapie anti-VEGF, come questo, sono emersi [Bergers G et al, 2008]. Tra gli altri potenziali bersagli farmacologici nella cura del cancro, la classe delle proteasi rappresenta il 5-10%. Lo sviluppo di inibitori per le metalloproteasi (MMPI) è cominciato nientemeno più di venti anni fa [Overall CM et al, 2006]. Mentre la sperimentazione di MMPI sul modello murino spesso ha dato risultati promettenti; la loro validazione come farmaci anti-cancro sull'uomo non ha avuto finora lo stesso esito. Tra i risultati migliori, l'inibitore Marimastat, congiuntamente alla chemioterapia convenzionale, ha aumentato la sopravvivenza di pazienti con carcinoma gastrico non operabile al massimo di due anni [Bramhall SR et al, 2002a-2002b]. In molti altri trials clinici, la terapia con MMPI ha fallito probabilmente perchè i pazienti trattati attraversavano uno stadio della malattia già troppo avanzato. Ma anche quando usati nelle prime fasi del tumore, la concentrazione di farmaco MMPI efficace si è rivelata tossica per i pazienti, causando loro gravi danni muscoloscheletrici. Utilizzando concentrazioni subtossiche, invece, gli inibitori di MMP non mostrano efficacia [Overall CM et al, 2006]. A causa dell'avverso indice terapeutico, lo studio di nuove molecole inibenti MMP più specifiche (e non a largo

spettro) è in corso.

1.4 IL CARCINOMA MAMMARIO

Il tumore alla mammella rappresenta il 22,9% dei tumori invasivi nelle donne e il 16% di tutti i tumori femminili [WCR, 2008]. In teoria si possono formare tumori da tutti i tipi di tessuto del seno, ma i più frequenti sono di tipo epiteliale e originano nel tessuto ghiandolare, a livello della porzione dutto-lobulare. Vi sono diversi sistemi di classificazione per il tumore mammario, che raggruppano forme non invasive, come il carcinoma intra-duttale o carcinoma in situ (DCIS), e forme invasive o infiltranti. L'80% dei carcinomi invasivi è rappresentato dal carcinoma duttale infiltrante e il 10-15% dal carcinoma lobulare infiltrante. Attualmente l'approccio terapeutico per il cancro al seno prevede la chemioterapia e, in alcuni casi, l'ormonoterapia [www.airc.it]. Nessuna di queste terapie risultano ad oggi efficaci per alcuni tipi di tumore mammario particolarmente aggressivi, come il triplo negativo (TNBC). Questo sottotipo tumorale non esprime i recettori per gli estrogeni, per il progesterone e né quello per il fattore epidermico HER-2. Per tumori come questo, ad alto potenziale metastatico, si stanno ricercando terapie più efficaci. Il blocco dell'angiogenesi, in questo contesto, potrebbe rivelarsi utile, prevenendo la formazione di metastasi. Una correlazione positiva tra progressione del tumore mammario e angiogenesi è stata documentata comunque da tempo. Lesioni fibrocistiche al seno con alta densità microvascolare (MVD) sono associate con un alto rischio di sviluppare il cancro [Guinebretiere JM et al, 1994]. Diversi fattori pro-angiogenici, come HIF-1 α e VEGF₁₂₁, sono sovraespressi nel carcinoma mammario invasivo [Bos R et al, 2001; Relf M et al, 1997]. Per via di questi dati, la terapia anti-angiogenetica da diverso tempo viene studiata con lo scopo di inibire il carcinoma mammario. Molti dei classici chemioterapici usati per il trattamento del tumore al seno esplicano un'azione anti-angiogenica quando somministrati più frequentemente ed a basse dosi (terapia metronomica) [Hanahan D et al, 2000]. Le proprietà anti-angiogeniche della chemioterapia a basse dosi sono state confermate anche in modelli clinici che hanno previsto l'aggiunta di un secondo farmaco più selettivo per la crescita vascolare, come bevacizumab. Purtroppo, questo tipo di trattamento ha apportato frequentemente una serie di effetti collaterali nei pazienti [Schneider BP et al, 2005]. Pareri controversi esistono sui benefici complessivi di bevacizumab, in combinazione o meno ad altri agenti, per il trattamento del tumore

mammario metastatico. Anche inibitori dei recettori tirosin-chinasici, come Sunitinib, sono attualmente sperimentati in combinazione con altri farmaci [Fratto ME et al, 2010]. In trials clinici, inibitori di metalloproteasi sono stati somministrati in pazienti con carcinoma mammario infiltrante; dato il documentato coinvolgimento di MMP nell'angiogenesi di questo tumore [Sier CEM et al, 2008; Kargozaran H et al, 2007]. Marimastat, inibitore a largo spettro di MMP, è stato sperimentato da solo ed in combinazione con Tamoxifene. In ogni caso, gli effetti collaterali provocati nei pazienti (artralgia, artrite, danni muscolo-scheletrici) hanno avuto il sopravvento sui benefici [Miller KD et al, 2002; Sparano JA et al, 2004]. Al momento, nessun dato sperimentale inconfutabile associa una terapia angiogenetica efficace al trattamento del carcinoma mammario.

2. OBIETTIVI

La formazione di nuovi vasi all'interno del tumore da altri pre-esistenti (angiogenesi) garantisce l'apporto di ossigeno e nutrienti, come pure l'eliminazione di metaboliti, senza i quali la crescita tumorale sarebbe bilanciata dalla necrosi del tumore. I vasi tumorali formati costituiscono, inoltre, la via principale per la disseminazione di cellule metastatiche. Lo studio della capacità di un tessuto neoplastico di indurre la formazione di una nuova rete vasale è uno dei principali obiettivi della ricerca oncologica. La comprensione di questo meccanismo permetterebbe in medicina oncologica di affiancare alla chemioterapia "standard" nuove terapie, finalizzate all'inibizione della crescita tumorale ed al trattamento sia della neoplasia primaria, sia delle eventuali metastasi. Per la presenza di un'intricata moltitudine di segnali angiogenetici che originano dalle cellule tumorali, molti dei quali ancora sconosciuti, non è possibile proporre allo stato attuale l'inibizione diretta dell'angiogenesi quale approccio esclusivo alla terapia antineoplastica. Bisogna considerare, inoltre, che la risposta alle attuali terapie anti-angiogenetiche variano con il tipo tumorale, e con lo stadio di progressione della malattia. Sebbene molti studi in modelli animali, così come alcuni studi clinici, abbiano dimostrato che l'inibizione di un singolo fattore nella cascata angiogenetica può essere capace di sopprimere parzialmente l'angiogenesi, si è ancora lontani dalla comprensione dei meccanismi che potrebbero portare alla realizzazione di un'inibizione dell'angiogenesi di particolare utilità in clinica. L'obiettivo principale del mio progetto di dottorato è stato studiare il cross-talk tra tumore ed endotelio, per meglio comprendere i meccanismi molecolari che regolano il processo angiogenetico; con lo scopo di identificare nuovi bersagli terapeutici su cui agire per combattere il cancro. In particolare, ho focalizzato l'attenzione sull'analisi degli enzimi proteolitici, agenti responsabili del rimodellamento tissutale caratterizzante il fenomeno angiogenetico. Come modello sperimentale *in vitro*, ho utilizzato le cellule endoteliali di vena ombelicale ECV304 (Hughes SE et al, 1996), e le linee di tumore mammario 8701BC e MDA-MB-231. Il tumore mammario è un tipo di tumore solido fortemente influenzato dal fenomeno angiogenetico. Correlazioni clinico-patologiche confermano il ruolo centrale dell'angiogenesi nella progressione del cancro al seno. Per esempio, le lesioni fibrocistiche al seno con più alta densità vascolare sono associate ad un maggiore rischio di cancro [Schneider BP et al, 2005]. Le cellule MDA-MB-231, di morfologia epiteliale, rappresentano una linea di tumore mammario tripla negativa (TNBC)

metastatica, derivante da adenocarcinoma (ATCC[®] HTB-26[™]). Quelle 8701BC, anch'esse epiteliali, derivano da carcinoma duttale infiltrante [Minafra S et al, 1989]. Ho messo a punto *in vitro* co-culture bidimensionali (2D) e tridimensionali (3D) di cellule endoteliali e tumorali, per studiare il cross-talk tra i due citotipi. Questi sistemi sono stati realizzati per valutare gli effetti del tumore sulle cellule endoteliali, in termini di proliferazione cellulare, migrazione ed invasività. Mediante transwell, le cellule endoteliali e tumorali sono state coltivate insieme, ma senza contattarsi fisicamente. Sul filtro del transwell è stato realizzato sia un coating di collagene di tipo I (coltura 2D), sia un sottile gel dello stesso collagene (coltura 3D). Dalla coltura 2D sono stati estrapolati dati di migrazione cellulare, da quella 3D dati di invasività. In questi esperimenti, le cellule endoteliali ECV304 sono state coltivate in presenza o meno (controllo) delle cellule tumorali MDA-MB-231 e 8701BC. Colture tridimensionali sono state messe a punto anche senza l'usilio di transwell. Nello specifico, le cellule endoteliali sono state seminate su un gel 3D di collagene di tipo I e mantenute in coltura in presenza o meno (controllo) del mezzo condizionato delle cellule tumorali. Da questa coltura è stato misurato il tasso di proliferazione delle cellule endoteliali, dopo stimolo o meno del mezzo condizionato tumorale. Inoltre, nelle cellule ECV304 così coltivate, per valutare l'azione angiogenetica di possibili fattori rilasciati dal tumore sull'endotelio, è stata ricercata l'espressione di metalloproteasi e serin-proteasi, nonché di altri marcatori dell'endotelio tumorale "attivato" (integrina $\beta 3$ e VEGF-A), mediante tecniche di zimografia, cinetica enzimatica e western-blot. L'espressione di enzimi proteolitici nelle cellule endoteliali è stata meglio valutata, dopo incubazione con il mezzo tumorale, anche per real-time PCR. Con lo scopo di studiare al meglio le proprietà angiogenetiche delle linee tumorali MDA-MB-231 e 8701-BC, ed identificare pathway molecolari angiogenici specifici per il sottotipo tumorale, esperimenti *in vivo* sono stati condotti sul modello murino, seppure ancora in fase preliminare.

3. METODI

3.1 COLTURE CELLULARI

Le cellule endoteliali della linea ECV304 sono state mantenute in coltura con terreno M199 (*Sigma*), in presenza di siero fetale bovino (FBS) 10%, glutammina 1% e antibiotici (100 unità/ml penicillina e 100 µg/ml streptomina). Le cellule delle linee di tumore mammario MDA-MB-231 e 8701BC sono state coltivate inizialmente in terreno DMEM (*Sigma*) e RPMI 1640 (*Sigma*) completi, rispettivamente. Il loro terreno di coltura, gradualmente, è stato sostituito con quello M199. In questo modo, utilizzando lo stesso mezzo di crescita per tutte le linee cellulari, co-culture di cellule endoteliali e tumorali sono state realizzate in modo omogeneo. Tutte le colture sono state mantenute a 37°C in presenza di CO₂ (5%), e manipolate sterilmente.

3.2 CO-COLTURE MEDIANTE TRANSWELL

Co-culture di cellule endoteliali e tumorali sono state allestite, mediante transwell di policarbonato contenenti pori di 8 µm (*Corning*). In tal modo, è stato possibile separare fisicamente il citotipo tumorale ed endoteliale consentendo tra i due lo scambio di fattori solubili. In un primo caso, sull'inserito è stato applicato un "coating" di collagene di tipo I (*Rat Tail collagen type I, BD Bioscience*), finalizzato ad una coltura bidimensionale (2D). In un secondo caso (fig. B), lo stesso tipo di collagene è stato fatto polimerizzare all'interno del transwell, ottenendo un gel tridimensionale (3D) sottile qualche millimetro (Fig. 7).

Per il "coating" dell'inserito, 10 µg/cm² di collagene sono stati usati. Per creare gel tridimensionali, la polimerizzazione del collagene è stata ottenuta miscelando volumi uguali di collagene in soluzione (3,7 mg/ml in acido acetico 0,02 N) e terreno base M199 concentrato 2X. L'acidità della miscela è stata tamponata con NaOH 1N; e 100 µl di essa poi sono stati dispensati all'interno di ogni transwell. La polimerizzazione è avvenuta per 1 ora a 37°C.

In entrambi sistemi, 2D e 3D, cellule ECV304 sono state piastrate all'interno del transwell in terreno M199 al 2% FBS. Le cellule tumorali MDA-MB-231 e 8701BC sono state seminate invece fuori l'inserito, sul pozzetto della piastra da 24-well, in M199 al 10% FBS, in rapporto 10:1 rispetto alle cellule endoteliali. Dopo 24 h, sulla co-cultura 2D è stato eseguito un saggio di migrazione cellulare. La co-cultura 3D, invece, dopo 7 giorni è stata sottoposta ad analisi di invasività cellulare.

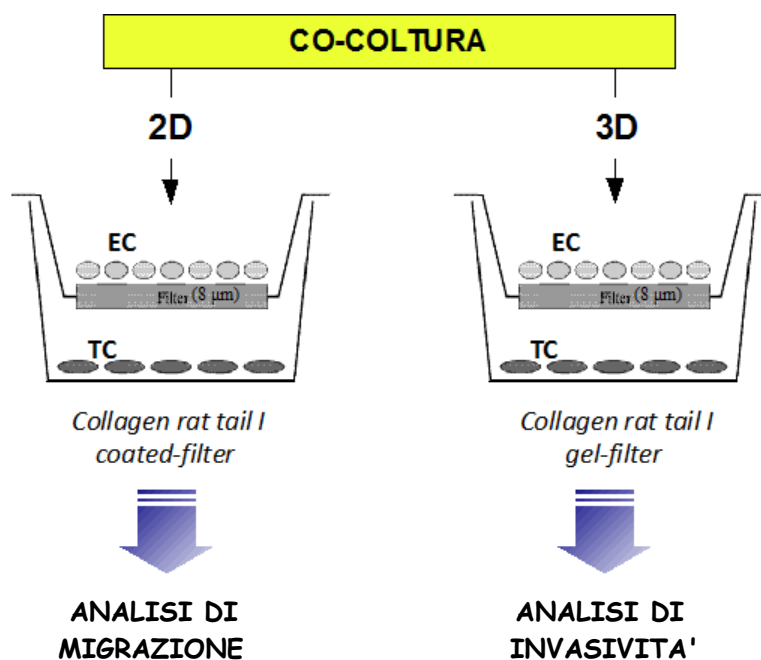


Fig 7.: Schema riassuntivo delle co-culture in vitro. EC: cellule endoteliali ECV304; TC: cellule tumorali MDA-MB-231 / 8701BC

3.2.1 Saggio di migrazione

Le cellule endoteliali sono state coltivate in presenza delle tumorali MDA-MB-231 e 8701BC tramite l'uso di transwell stratificati con collagene I (Fig 7). Come co-cultura controllo, le cellule endoteliali sono state seminate anche fuori la camera di migrazione, al posto del citotipo tumorale. Dopo 24 h, le camere di migrazione per tutti i campioni sono state svuotate, e l'inserito è stato fissato con etanolo 70% freddo, per 10 minuti a -20°C. Dopo opportuni lavaggi in PBS, le cellule ECV304 adese all'inserito sono state colorate con Blu di Toluidina 1% per 15 minuti. Dopo rimozione del colorante in eccesso, le cellule presenti sulla superficie interna della camera, che non sono migrate, sono state allontanate. Infine la camera di migrazione asciutta è stata poggiata su un vetrino porta-oggetti e le cellule visualizzate al microscopio ottico. Sono state fotografate e contate le cellule adese sulla superficie inferiore della camera, cioè quelle che sono riuscite a migrare. Le cellule contate sugli inserti relativi alla co-cultura con le cellule tumorali sono state paragonate con quelle migrate nella co-cultura controllo. I campioni, trattati e controllo, sono stati riprodotti in doppio; e l'esperimento è stato condotto 3 volte.

3.2.2 Saggio di invasività

Le cellule ECV304 sono state seminate su gel di collagene I all'interno di transwell, in rapporto 1:10 rispetto alle cellule tumorali MDA-MB-231 o 8701BC, che sono state piastrate invece all'esterno della camera di migrazione, cioè sul pozzetto di una piastra 24-well (Fig. 7). Il controllo dell'esperimento è rappresentato dalla co-coltura di sole cellule endoteliali; quindi in assenza del citotipo tumorale. Dopo una settimana di co-coltura, le cellule endoteliali nei gel di collagene, relativi alle co-culture con le due linee tumorali ed a quella controllo, sono state fissate con formaldeide 3,7% per 20 minuti. Dopo 3 lavaggi in PBS i gel, ancora presenti sull'inserito, sono stati incubati con una soluzione di Falloidina-FITC (100 μ M in PBS, *Sigma*) per 1 ora a 37°C, specifica per l'actina citoscheletrica. In seguito, l'incubazione con Etidio Bromuro (1:1000 in PBS) per 15 minuti è servita a marcare i nuclei cellulari. Dopo 3 lavaggi da 10 minuti in PBS, le cellule presenti in ogni gel di collagene sono state visualizzate al microscopio confocale (*Olympus*), in modo da poter analizzare i campioni tridimensionali su diversi piani focali. Per ogni gel sono state effettuate scansioni circa ogni 3 μ m, per un campo totale di 200 μ m. La ricostruzione delle diverse scansioni lungo i tre assi x ,y e z è stata ottenuta elaborando le immagini con il software FW10-ASW 1.6 Viewer (*Olympus*). Come indice di invasività cellulare, la distribuzione delle cellule ECV304 in ogni campione di collagene (controllo o trattato) è stata studiata osservando le proiezioni x-z e y-z di ogni gel.

3.3 PREPARAZIONE DEI MEZZI CONDIZIONATI (MC)

Cellule ECV304, MDA-MB-231 e 8701BC sono state cresciute in piastre differenti fino alla confluenza, con terreno M199 completo contenente FBS al 10%. A questo punto, ogni linea cellulare, dopo un lavaggio in PBS, è stata incubata *over night* con terreno M199 contenente FBS al 2%. Il mezzo condizionato (CM) di ogni tipo cellulare poi è stato raccolto, centrifugato 10 minuti a 2.500 rpm, ed infine aliquotato e conservato a -20°C. Complessivamente, tre mezzi condizionati sono stati ottenuti: due di origine tumorale, e uno controllo non tumorale (endoteliale).

3.4 CO-COLTURE 3D MEDIANTE MEZZI CONDIZIONATI

Il cross-talk tra le cellule endoteliali e cancerose è stato studiato anche mediante l'utilizzo dei mezzi condizionati (MC).

Gel di collagene I sono stati creati nei pozzetti di una multiwell, miscelando parti uguali della soluzione di collagene 3,7 mg/ml e terreno M199 2X, e tamponando con NaOH. Dopo 1 ora a 37°C, tempo sufficiente per la polimerizzazione del collagene, le cellule ECV304 sono state piastrate sopra il gel di ogni pozzetto, in presenza di terreno M199 contenente FBS 10%. Dopo l'attacco delle cellule alla matrice 3D, il mezzo di coltura è stato sostituito nei pozzetti con i mezzi condizionati. Alcuni pozzetti sono stati incubati con il mezzo condizionato dalle cellule tumorali 8701BC, altri con quello ottenuto dalla linea tumorale MDA-MB-231, altri ancora con il mezzo condizionato controllo (derivato dalle stesse cellule endoteliali). Dopo 7 giorni di coltura, gli effetti del tumore sul citotipo endoteliale sono stati studiati. Nello specifico, la proliferazione delle cellule ECV304, come pure l'espressione di fattori pro-angiogenici ed enzimi proteolitici, sono state determinate.

3.4.1 Saggio di proliferazione

Cellule ECV304 sono state piastrate sia sopra sia all'interno di gel 3D di collagene, nei pozzetti di una piastra 96-well. 10.000 cellule sono state piastrate sopra 100 µl di collagene precedentemente gelificati per pozzetto; mentre 30.000 cellule sono state miscelate a 100 µl di soluzione di collagene tamponata, e quest'ultima distribuita a pozzetto per polimerizzare. Per entrambi i casi, alcuni gel sono stati incubati con il mezzo condizionato della linea MDA-MB-231, altri con quello della linea 8701BC, ed altri ancora con quello controllo (non tumorale). La proliferazione delle cellule ECV304 nelle colture tridimensionali è stata analizzata misurando la loro vitalità a diversi tempi (18 ore, 3,5 e 7 giorni), mediante MTS (Cell Counting kit-8, *Sigma*). 100 µl/pozzetto di sali di tetrazolio sono stati adoperati. Dopo 90 minuti a 37°C, l'assorbanza a 450 nm è stata misurata per tutti i pozzetti. Il bianco dell'esperimento è stato fornito da un gel di collagene privo di cellule, incubato fino a 7 giorni con terreno M199 contenente FBS 2%. La vitalità media delle cellule endoteliali trattate con i mezzi tumorali è stata confrontata con quella controllo, calcolata cioè dopo trattamento con il mezzo condizionato non tumorale. I campioni sono stati riprodotti in doppio, e l'esperimento ripetuto 3 volte.

3.4.2 Preparazione dei campioni proteici

Nelle cellule ECV304, coltivate su gel di collagene in presenza dei mezzi condizionati (MC), è stata analizzata l'espressione di proteine sia transmembranarie che solubili.

Dopo 7 giorni di coltura, il surnatante di ogni pozzetto è stato prelevato e centrifugato per 5 minuti a 1000 rpm, per eliminare eventuali detriti cellulari. Da ogni pozzetto, in cui è rimasto il gel di collagene, l'estratto proteico delle cellule ECV304 seminate è stato ottenuto, mediante Triton 1% in PBS. Nello specifico, il gel di collagene, relativo ad ogni campione, è stato trasferito in eppendorf ed incubato con il tampone di lisi overnight, in agitazione a 4°C, per un'efficiente estrazione delle proteine cellulari. In seguito, dopo 20 minuti di centrifugazione a 10000 rpm, la fase contenente le proteine è stata recuperata. I surnatanti ed i lisati sono stati quantizzati per il loro contenuto proteico mediante saggio Bradford (Bradford Reagent, *Sigma*), usando come riferimento concentrazioni note di albumina sierica bovina (BSA). Il contenuto proteico, per ogni campione, è stato analizzato successivamente in zimografia, wetern-blot e cinetica enzimatica.

3.4.3 Zimografia

Mediante zimografia, nei campioni surnatanti e lisati, la presenza di enzimi ad attività gelatinasica è stata saggiata. Per campione, 2 µg di proteine non ridotte sono state caricate su gel di poliacrilammide 7,5%. Dopo SDS-PAGE, il gel è stato incubato per 10 minuti in tampone di lavaggio, per rimuovere l'SDS in eccesso; e poi in quello di attivazione delle gelatinasi (CaCl₂ 2mM) per 48 h a 37°C. Le bande di attivazione enzimatica sono state messe in evidenza per colorazione del gel con Coomassie Blu R-250. Le zimografie, una volta acquisite in formato digitale, sono state analizzate con il software Image J, per quantizzare le bande attivate. La quantità di enzima rilevata nei campioni derivati dal trattamento tumorale è stata confrontata con quella corrispondente al trattamento controllo. Per l'analisi dei surnatanti, anche i mezzi condizionati dalle linee MDA-MB-231 e 8701BC sono stati sottoposti a zimografia, poichè gli stessi sono stati usati come mezzo della coltura 3D.

3.4.4 Western-blot

Nei lisati, relativi alla coltura 3D delle cellule ECV304 con e senza i mezzi condizionati tumorali, l'espressione delle proteine VEGF-A, integrina β₃, DPP4 e FAP, è stata ricercata tramite Western-blot. 20 µg di proteine per campione sono stati sottoposti a SDS-PAGE 7,5%. Per l'analisi di tutti i bersagli, eccetto che per VEGF-A, i campioni sono stati trattati in condizioni non riducenti. Al termine della corsa elettroforetica, il gel di poliacrilammide è stato equilibrato per 15 minuti nel tampone di trasferimento; come

pure una membrana di nitrocellulosa (Hybond, Amersham). I campioni proteici sono stati trasferiti dal gel sulla membrana mediante elettroblotting a 100V e 300 mA, in presenza del tampone di trasferimento, per 90 minuti a freddo. In seguito, i siti d'interazione disponibili sulla membrana sono stati saturati incubando overnight a 4°C con latte in polvere non grasso 3% in tampone TBS-T (Blocking solution). La membrana, dopo, è stata incubata con l'anticorpo primario (IgG) specifico per la proteina target diluito in TBS-T, overnight a 4°C, in agitazione. In tabella n°1 sono descritti tutti gli anticorpi primari utilizzati. Tre successivi lavaggi da 10 minuti in TBS-T sono serviti per rimuovere l'anticorpo non legato. Poi la membrana è stata trattata, per 1 ora a temperatura ambiente, con l'anticorpo secondario anti-mouse o anti-rat coniugati con perossidasi (*Sigma*), diluiti 1:40000 in TBS-T. Successivamente, la membrana è stata sottoposta a 3 lavaggi da 5 minuti e 2 da 10 minuti con TBS-T, per rimuovere il secondario in eccesso. Per rilevare l'eventuale presenza della proteina bersaglio, il kit "SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate" (*Thermo Scientific*) è stato utilizzato. Il segnale in chemiluminescenza, indicatore della presenza o meno della proteina bersaglio, è stato rilevato sulla membrana al ChemiDoc XRS (*Biorad*). L'intensità delle bande, e quindi delle proteine analizzate, è stata quantificata con il programma Image J. L'espressione di ogni proteina bersaglio è stata normalizzata per quella di β -actina, in tutti i campioni.

anti β -Actina	anti VEGF	anti FAP	anti Int β 3	anti DPP4 (E26)	anti DPP4 (E34)
<i>Sigma</i> mouse mAb 1:3000	<i>abcam</i> mouse mAb 1:500	<i>Vitatex</i> Rat mAb 1:1000	<i>ATCC</i> mouse mAb 1:1000	<i>Vitatex</i> Rat mAb 1:1000	<i>Vitatex</i> Rat mAb 1:1000

Tabella 1.: Anticorpi primari adoperati

3.4.5 Cinetica enzimatica

L'attività enzimatica di DPP4 è stata saggiata sia nei surnatanti che nei lisati relativi alla coltura 3D delle cellule ECV304 in presenza e non dei mezzi condizionati tumorali. Il substrato fluorescente per DPP4 (1 μ M), Gly-Pro-MCA (*Peptide Institute, Inc.*), è stato incubato con 10 μ g di proteine nel pozzetto di una piastra 96-well, a campione. La fluorescenza su piastra è stata registrata alla spettrofluorimetro (Synergy HT, *Biotek*), con eccitazione a 325 nm ed emissione a 395 nm, alla temperatura costante di 37°C. La reazione è stata seguita per 5 ore, con letture della fluorescenza ogni 20 minuti.

3.4.6 Analisi dell'espressione genica

L'espressione di alcuni geni codificanti per enzimi capaci di degradare l'ECM è stata analizzata in cellule ECV304, dopo coltura su gel di collagene in presenza dei mezzi condizionati tumorali e di quello controllo. 800 µl di soluzione di collagene tamponata (1,8 mg/ml) è stata polimerizzata in ogni pozzetto di un apiastro 6-well. 250.000 cellule endoteliali sono state seminate sul gel di ogni pozzetto, e coltivate con i mezzi condizionati per 7 giorni. In seguito, mediante QIAzol (*Qiagen*), l'RNA totale di tutti i campioni è stato estratto. 1 µg di RNA per ogni campione è stato usato per sintetizzare cDNA. In tutti i campioni di cDNA è stato analizzato il livello di espressione di una serie di geni mediante real time-PCR. L'espressione dell'mRNA di GAPDH è stata utilizzata come controllo interno.

Estrazione dell'RNA

Il protocollo per l'estrazione di RNA totale da cellule in coltura tridimensionale ha previsto le fasi seguenti:

- Aspirare il surnatante dalla coltura, e lavare con PBS
- Aggiungere 700 µl di QIAzol per pozzetto e lasciare in agitazione per alcuni minuti fino a dissolvere la matrice di collagene
- risospendere più volte, per una completa dissoluzione del gel e lisi delle cellule
- Raccogliere il tutto e centrifugare per 10 minuti a 11500 rpm a 4°C
- Prelevare il sovrnatante e incubare a 15-30 °C per 5 minuti
- Aggiungere 200 µl di cloroformio, agitare energicamente per 15 secondi e incubare per 2 minuti a 15-30°C
- Centrifugare per 10 minuti a 11500 rpm a 4°C
- Prelevare la fase acquosa (contenente l'RNA)
- Aggiungere 350 µl isopropanolo, agitare energeticamente ed incubare a 15-30°C per 5 minuti
- Centrifugare per 15 minuti a 11500 rpm a 4°C
- Rimuovere il sovrnatante e aggiungere 1 ml di etanolo 70 %
- Agitare al vortex e centrifugare per 5 minuti a 9000 rpm a 4°C
- Aspirare il sovrnatante, centrifugare per pochi secondi e togliere l'etanolo residuo
- Lasciare 10 minuti a temperatura ambiente, per fare asciugare il pellet
- Risospendere con 25 µl di H₂O milli-Q

- Incubare a 60 °C per 5 minuti, per distendere eventuali strutture secondarie dell'RNA
- Leggere a 260 nm 1 µl di RNA, per quantizzare l'RNA isolato
- Aliquotare e conservare a -80°C

Trascrizione inversa

L'RNA estratto per ogni campione è stato prima trattato con l'enzima DNAsi I (*Invitrogen*), per eliminare eventuali tracce di DNA genomico, e poi retrotrascritto in modo da ottenere cDNA amplificabile in real-time PCR.

1 µg di RNA totale è stato retrotrascritto in presenza di "RT Random Primers" e "MultiScribe™ Reverse Transcriptase" (50 U/µl), in un volume di reazione pari a 20 µl, secondo le istruzioni per il kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" (*Applied Biosystems*). La reazione di retrotrascrizione ha previsto un primo step di 10 minuti a 25°C; a seguire 120 minuti a 37°C; ed infine 5 minuti a 85°C.

Real-Time PCR

Per quantificare in maniera più precisa l'espressione di alcuni geni nei campioni trattati con il mezzo condizionato tumorale rispetto a quello controllo, la PCR Real-Time è stata eseguita. La misurazione in tempo reale dei livelli di espressione è possibile grazie all'uso di fluorocromi che vengono introdotti nelle molecole di DNA nello stesso momento in cui queste vengono sintetizzate nella reazione. È stato utilizzato il kit "Power SYBER Green PCR Master Mix" (*Applied Biosystems*), per amplificare frammenti attesi della lunghezza di circa 200 bp. Per ogni campione, 50 ng di cDNA totale sono stati amplificati in presenza della DNA Polimerasi, della sonda fluorescente SYBER Green, dell'opportuno buffer, dNTP e acqua ultrapura. L'aggiunta di primers specifici (300 nM) ha permesso l'amplificazione dei geni desiderati. Un volume finale di reazione pari a 25 µl/campione è stato preparato. I campioni sono stati riprodotti in triplicato. La reazione di amplificazione è stata svolta mediante l'apposito strumento "7300 Real-time PCR System" (*Applied Biosystems*). Tutte le reazioni condotte hanno previsto una prima fase di 10 minuti a 95°C, per l'attivazione dell'enzima DNA polimerasi. A seguire, 45 cicli di amplificazione così caratterizzati: 15 secondi a 95°C (*denature*) e 1 minuto a 62°C (*anneal/extend*). Per tutti i campioni sono state acquisite le curve di melting, al fine di poter escludere amplificati aspecifici. Il gene GAPDH, espresso costitutivamente, è stato utilizzato per normalizzare l'espressione del gene

bersaglio in tutti i campioni. Inoltre, il livello di espressione genica nei campioni trattati è stato riportato in funzione del campione controllo, a cui è stato assegnato valore unitario. Le sequenze degli inneschi adottati per condurre tutte le reazioni PCR sono mostrate in tabella n°2.

GENE	PRIMER-UPPER	PRIMER-LOWER
GAPDH	GGCACCGTCAAGGCTGAGAAC	GCAGAGGGGGCAGAGATGATG
MMP1	GAGCAAACACATCTGAGGTACAGGA	TTGTCCCGATGATCTCCCCTGACA
MMP2	CATTGGCTACACACCTGATCTG	AGTCCGTCCTTACCGTCAAAG
MMP3	GATCTCTTCATTTGGCCATCTCTTC	CTCCAGTATTTGCTCTACAAGAA
MMP7	CCCCCTGCATTCAGGAA	TCCTGGCCCATCAAATGG
MMP14	CCATTGGGCATCCAGAAGAGAGC	GGATACCCAATGCCATTGGCCA
DPP4	GAGAGGATTCCAAACAACACAC	AGACCACCACAGAGCAGAGTAG

Tabella 2.: Sequenze dei primers

3.5 PLUG DI COLLAGENE IN VIVO

Il mezzo condizionato dalle cellule tumorali MDA-MB-231 e 8701BC, e dalle cellule ECV304 (mezzo controllo) sono stati concentrati mediante liofilizzazione. 50 µl di ogni mezzo condizionato 10X sono stati miscelati con soluzione di collagene di tipo I (3,8 mg/ml, *BD Biosciences*), e bicarbonato d'ammonio 1,8% (utile per tamponare l'acidità e favorire la polimerizzazione del collagene). La soluzione di 500 µl così ottenuta è stata iniettata in topi BALB/C di circa 6 settimane. Due iniezioni con lo stesso mezzo condizionato (MC) sono state praticate per topo. Dopo una settimana, gli animali sono stati sacrificati, e i *plugs* di collagene sono stati recuperati, trattati con soluzione ipotonica, e centrifugati per 6 minuti a 10.000 rpm. I surnatanti recuperati sono stati incubati poi con “Drabkin's Reagent” (*Sigma*), per 15 minuti a temperatura ambiente. 100 µl della miscela sono stati dispensati in piastra 96-well e, allo spettrofotometro, è stata misurata la loro assorbanza a 540 nm. In questo modo, il contenuto emoglobinico di ogni *plug* è stato quantizzato. Il valore registrato per i *plugs* contenenti i mezzi condizionati tumorali è stato riportato per quello del *plug* controllo (mezzo condizionato delle cellule ECV304).

4. RISULTATI

4.1 Le cellule tumorali 8701BC e MDA-MB-231 stimolano la migrazione delle cellule endoteliali ECV304

L'angiogenesi tumorale è un processo multifasico che richiede un complesso cross-talk tra endotelio, tumore e stroma. Evento chiave della formazione di nuovi vasi sanguigni è “l'attivazione” delle cellule endoteliali, che consiste in un incremento delle loro capacità proliferative e migratorie, dovute a modifiche nell'espressione di molecole di adesione e marcatori di superficie dell'endotelio [Milkiewicz M et al, 2006]. Per valutare gli effetti delle linee di tumore mammario 8701BC e MDA-MB-231 sul potere migratorio delle cellule endoteliali ECV304, co-culture mediante transwell sono state allestite. Il grafico in figura 8, mostra come entrambe le linee tumorali stimolino la migrazione delle cellule endoteliali. Dopo 24 h di coltura, le cellule ECV304 che migrano in presenza delle cellule 8701BC e MDA-MB-231 sono circa il doppio rispetto al controllo (in assenza del tumore).

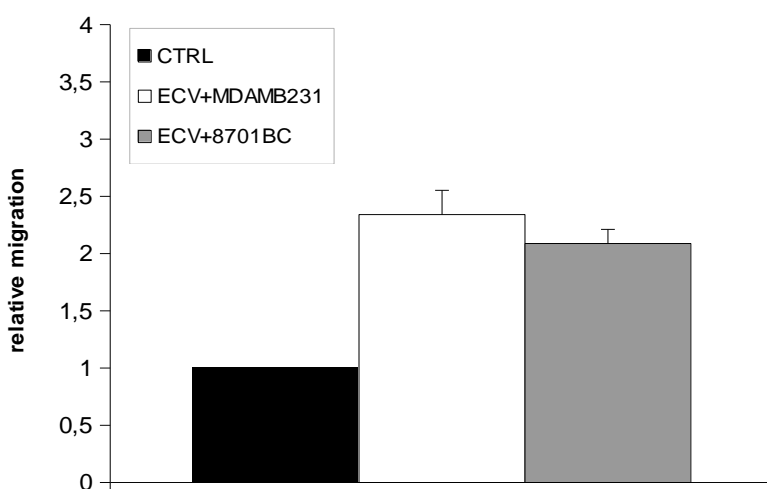
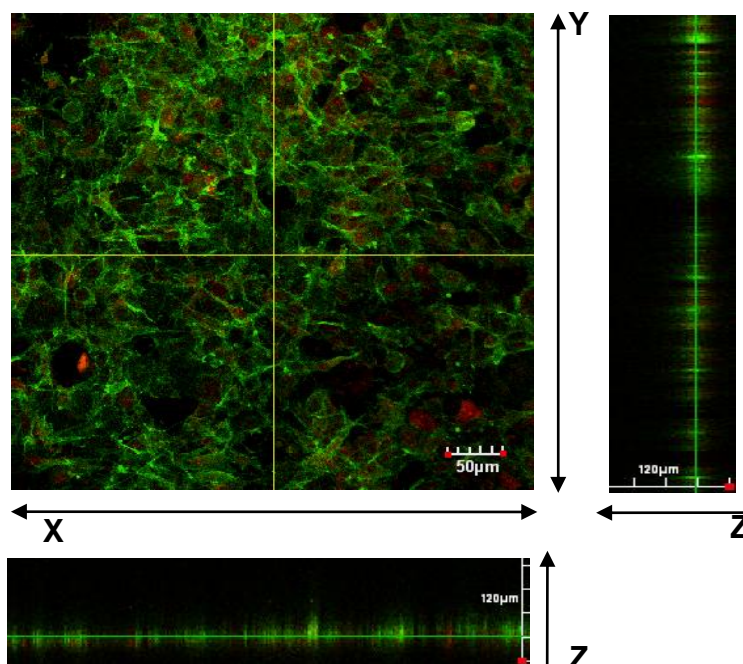


Figura 8.: Saggio di migrazione cellulare. Cellule ECV304 sono state seminate all'interno della camera di migrazione, su cui è stato stratificato collagene di tipo I. All'esterno del transwell sono state piastrate diversamente cellule MDA-MB-231, 8701BC, o le stesse ECV304 (controllo, CTRL). Dopo 24 h di co-cultura, tutte le cellule endoteliali migrate, relative ad ogni campione, sono state contate e riportate per il numero di quelle controllo (che ha valore unitario). L'esperimento è stato condotto tre volte.

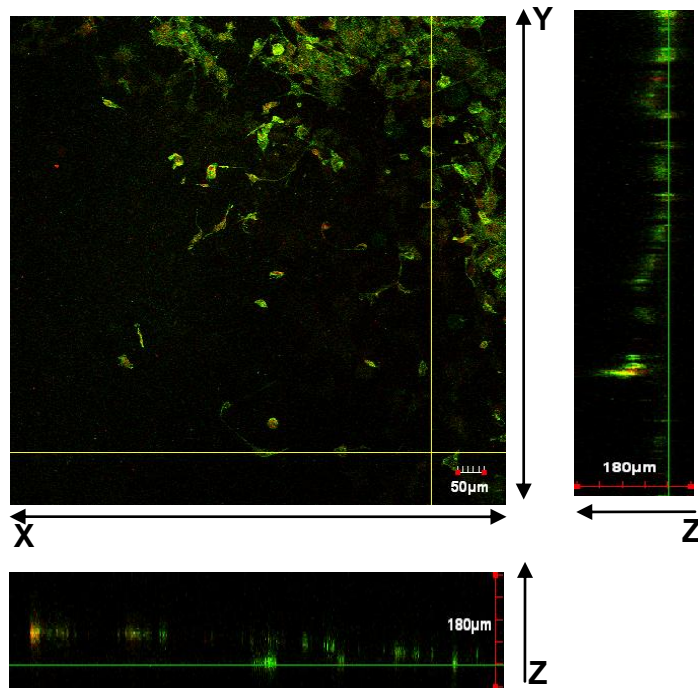
4.2 Le cellule tumorali 8701BC e MDA-MB-231 incrementano l'invasività delle cellule endoteliali in matrici 3D di collagene

L'endotelio, sotto stimolo proangiogenico, si destabilizza a tal punto che le sue cellule subiscono la cosiddetta "transizione epitelio-mesenchima". In questo modo tali cellule diventano capaci di degradare la membrana basale sub-endoteliale ed invadere la matrice extracellulare; promuovendo lo "sprouting" cellulare. Il potere invasivo delle cellule endoteliali ECV304 è stato valutato dopo co-coltura con le linee di tumore mammario MDA-MB-231 e 8701BC. La co-coltura è stata realizzata mediante transwell; ed un sottile gel tridimensionale di collagene di tipo I è stato fatto polimerizzare dentro la camera di migrazione. L'invasività delle cellule ECV304 nel gel 3D è stata analizzata per microscopia confocale. La figura 9A mostra come le cellule ECV304 coltivate per 7 giorni in assenza delle tumorali (controllo) mantengono un fenotipo epiteliale stazionario, formando sulla matrice di collagene uno monostrato cellulare piuttosto compatto (visibile lungo le proiezioni x-z e y-z, in fig. 2A). Invece, le stesse cellule endoteliali, quando coltivate in presenza delle linee tumorali MDA-MB231 e 8701BC, perdono fra loro le connessioni tipiche epiteliali, ed alcune di esse cominciano dopo 7 giorni ad entrare nel gel 3D di collagene sottostante, creando interruzioni nel monostrato di cellule endoteliali. Questo incremento di invasività, promosso da entrambe le cellule di tumore mammario, risulta evidente dalle proiezioni x-z e y-z in figura 9B-9C.

A (CTRL)



B (ECV304 + MDAMB231)



C (ECV304 + 8701BC)

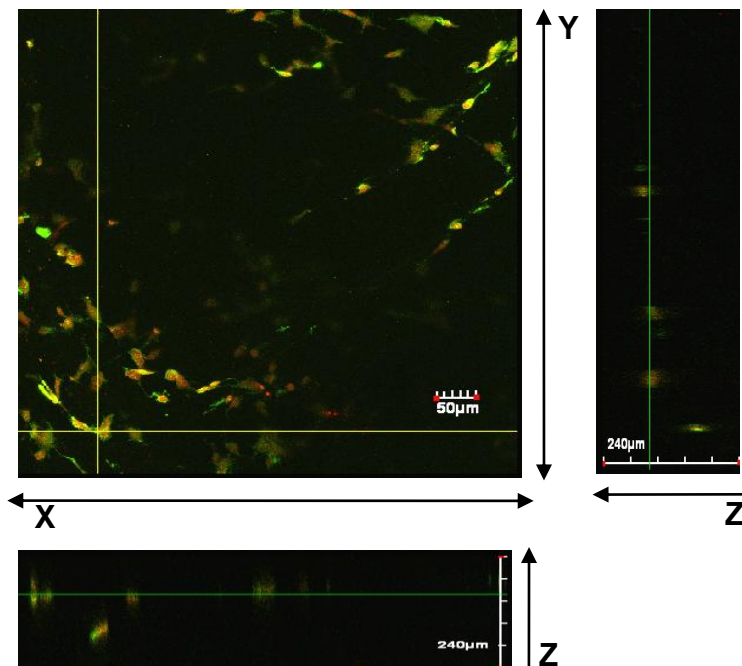


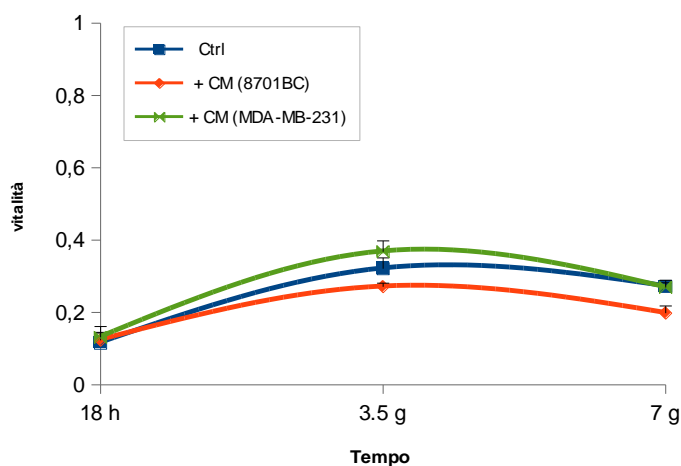
Figura 9.: Analisi di invasività cellulare. ECV304 seminate su gel di collagene sono state mantenute in co-cultura con le cellule tumorali (B-C) e non (controllo, A) per 7 giorni; poi fissate e marcate con

Falloidina/FITC ed Etidio Bromuro. I campioni sono stati osservati e scansionati al microscopio confocale. La ricostruzione dei diversi piani focali (slides) lungo gli assi x, y z e l'elaborazione mediante il software FV10-ASW 1.6 Viewer hanno permesso di osservare la distribuzione delle cellule endoteliali all'interno della matrice 3D di collagene. Per campione, sono stati ottenuti piani focali di circa 3 μ m (per un'area scansionata totale di circa 200 μ m). Per ogni campione è rappresentata una slide intermedia con le sue proiezioni bidimensionali x-z e y-z.

4.3 Le cellule tumorali 8701BC e MDA-MB-231 non influenzano la proliferazione delle cellule endoteliali in matrici 3D di collagene

L'angiogenesi coinvolge la gemmazione di nuovi vasi a partire da quelli esistenti. Durante questo processo biologico, cicli di migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali si susseguono. La proliferazione si verifica appena dietro la linea di cellule migranti, in direzione dello stimolo angiogenico. Al termine del processo la crescita dell'endotelio si arresta, per stabilizzare il nuovo vaso. Gli effetti delle cellule tumorali 8701BC e MDAMB231 sulla crescita di quelle endoteliali ECV304 sono stati investigati, in termini di proliferazione. ECV304 sono state seminate sia sopra (Fig. 10A) sia all'interno (Fig. 10B) di un gel di collagene di tipo I, ed incubate per 1 settimana con il mezzo condizionato delle cellule cancerose. Il saggio MTS ha rivelato che entrambi i mezzi condizionati tumorali non influenzano la proliferazione delle cellule endoteliali rispetto al mezzo controllo, in sistemi tridimensionali *in vitro*.

A)



B)

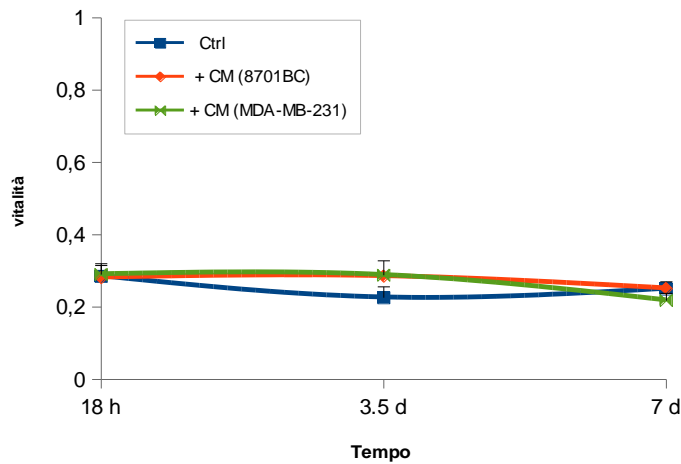


Figura 10.: Saggio MTS. Cellule ECV304 sono state piastrate sopra (A) and dentro (B) gel di collagene di tipo I, in piastra da 96 pozzetti. Le colture tridimensionali sono state incubate fino ad una settimana (7 g) con il mezzo controllo (Ctrl), rappresentato dal mezzo condizionato di cellule ECV304; o con il mezzo condizionato delle cellule tumorali 8701BC e MDAMB231. La vitalità cellulare è stata misurata nel tempo mediante MTS. I campioni sono stati riprodotti in triplicato.

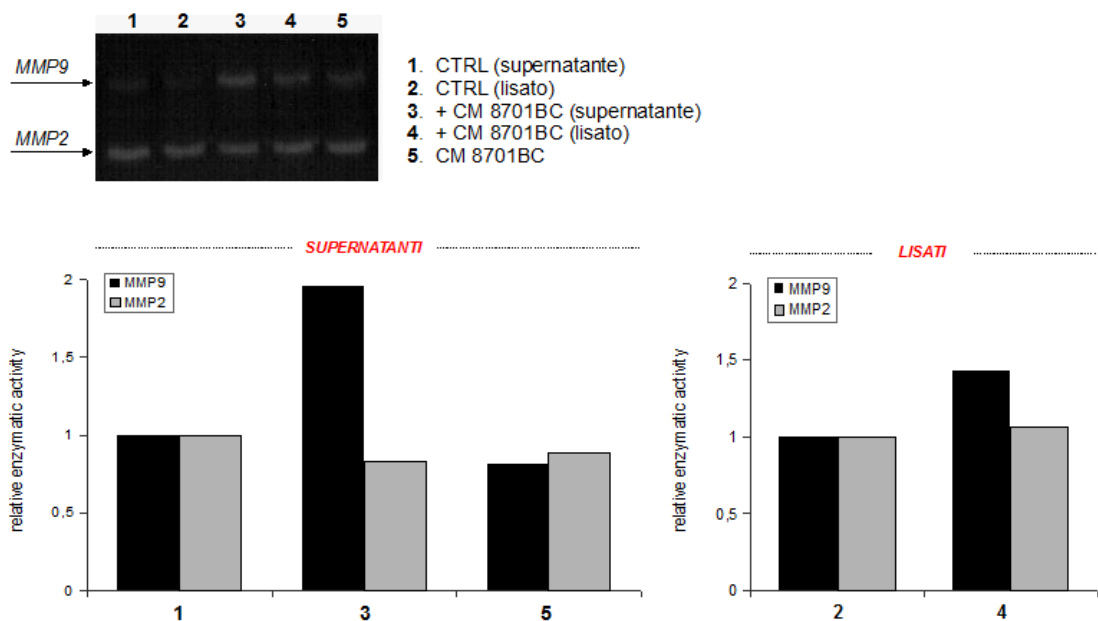
(CM: mezzo condizionato)

4.4 Le linee di tumore mammario MDA-MB-231 e 8701BC incrementano i livelli di pro-MMP9 in cellule ECV304

Il rimodellamento dell'ECM, tappa fondamentale del processo angiogenetico, richiede l'intervento di enzimi litici, tra cui le metalloproteasi di matrice. Le MMP, degradando la membrana basale e la matrice extracellulare, possono facilitare la migrazione ed invasione sia delle cellule tumorali sia endoteliali, promuovendo le metastasi e l'angiogenesi [Liotta L et al, 1980; Nagase H et al, 1999]. Dalle colture di collagene 3D, che hanno previsto la crescita delle cellule ECV304 in presenza dei mezzi condizionati tumorali e non (controllo), attività gelatinasiche sono state ricercate per zimografia. La figura 4 mostra come siano stati analizzati sia i surnatanti di queste colture sia gli estratti proteici delle cellule ECV304; in modo da poter studiare sia la frazione enzimatica espressa intracellularmente sia quella rilasciata nell'ambiente extracellulare. La figura 4 mostra le zimografie e le quantizzazioni relative alle bande. Complessivamente due bande di attivazione enzimatica sono osservabili, corrispondenti alle pro-forme di

MMP9 e MMP2. Per la prima gelatinasi, al contrario della seconda, differenze quantitative sono visibili tra i campioni trattati e controllo. Dopo 1 settimana di trattamento con il mezzo condizionato (CM) delle cellule 8701BC, le cellule ECV304 esprimono quantità di pro-MMP9 superiori rispetto a quando trattate con il mezzo controllo (condizionato dalle stesse cellule endoteliali). Quest'incremento è rilevabile significativamente dal confronto dei campioni surnatanti 1 e 3 (Fig. 11A). La quantità di enzima relativa al campione 3 è superiore non solo a quella del campione 1, ma anche del 5, contenente il profilo enzimatico della linea 8701BC. La figura 4B mostra una banda di attivazione enzimatica relativa a pro-MMP9 più intensa nel campione 4 rispetto al 2. Quindi, come si evince dall'analisi dei lisati, le cellule endoteliali sintetizzano quest'enzima maggiormente sotto stimolo della linea tumorale MDA-MB-231. Lo stesso incremento, dopo 1 settimana di coltura, non è valutabile dal confronto dei surnatanti, dato che la quantità di gelatinasi presente nel campione trattato, il 3, è quasi coincidente con quella presente nel mezzo condizionato delle sole cellule tumorali (campione 5). Questi risultati suggeriscono che entrambe le linee di carcinoma mammario usate inducono una maggiore espressione della gelatinasi B in cellule endoteliali, seppure rilevabile in compartimenti differenti. In questo modo, probabilmente, stimolano la migrazione e l'invasività delle cellule ECV304.

A)



B)

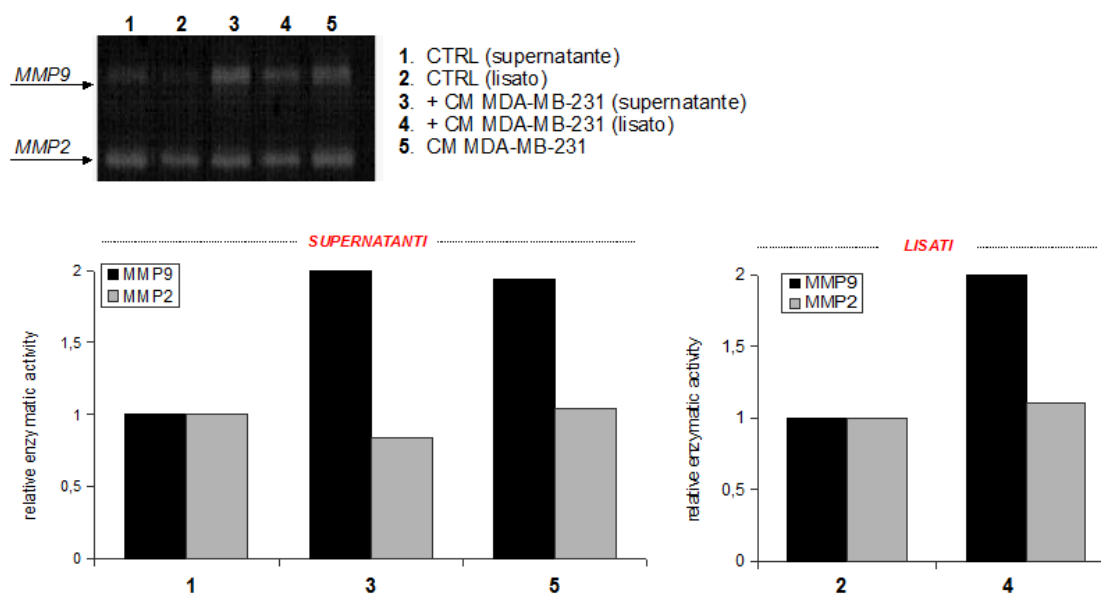


Figura 11.: Zimografia. Cellule ECV304 sono state seminate su gel di collagene in presenza del loro stesso mezzo condizionato (campione controllo, CTRL), e dei mezzi tumorali relativi alle linee 8701BC e MDA-MB-231 (campioni trattati in A e B, rispettivamente). Dopo 1 settimana, da tutte le colture sono stati prelevati i supernatanti. Di questi campioni (1 e 3), 2 ug di proteine sono stati sottoposti a zimografia, e poi confrontati insieme al campione 5 (il mezzo condizionato tumorale usato per il trattamento). Dalle colture 3D sono stati ottenuti anche i lisati delle cellule ECV304. 2 ug di proteine per il lisato controllo e trattato (campioni 2 e 4) sono stati analizzati pure in zimografia e paragonati. L'attivazione enzimatica è avvenuta in presenza di ioni calcio, a 37 °C, per 48h. Le bande di attivazione enzimatica sono state quantizzate mediante software Image J. Ai campioni controllo (1 e 2) è stato assegnato valore unitario. I campioni trattati sono riportati per i controlli.

4.5 Le linee di tumore mammario MDA-MB-231 e 8701BC inducono in cellule ECV304 un differente profilo di espressione proteica per alcuni fattori pro-angiogenici

L'angiogenesi è guidata da una varietà di attivatori e inibitori. Questi mediatori molecolari possono essere rilasciati dalle cellule endoteliali, da quelle tumorali o dallo stroma. Principalmente sono fattori di crescita che agiscono in modo autocrino e paracrino. Tra questi, il VEGF è il più noto e potente fattore studiato [Dvorak HF et al, 1999]. Questa proteina è stata ricercata nei lisati delle cellule ECV304 coltivate in 3D in presenza o meno dei mezzi condizionati tumorali. Un anticorpo specifico per il VEGF-A è stato adoperato, capace di riconoscere le isoforme da 165, 189 e 121 amminoacidi.

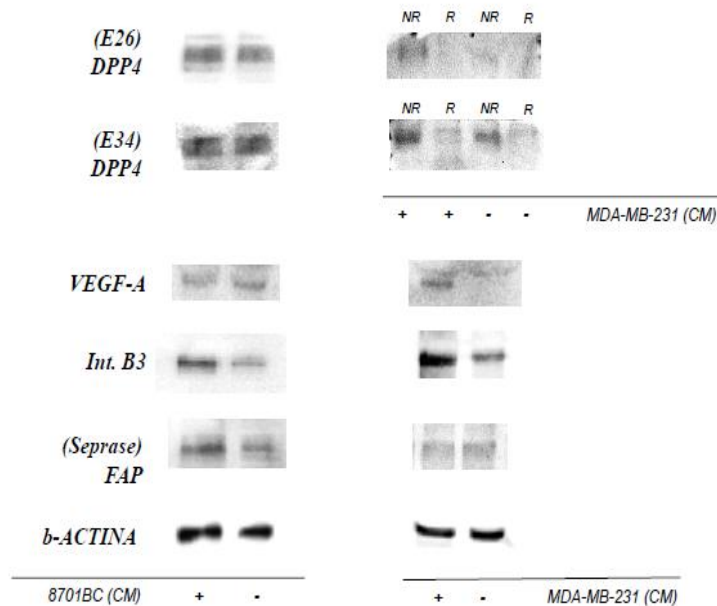
La figura 12 mostra come le cellule endoteliali esprimano maggiormente VEGF-A dopo trattamento con il mezzo condizionato della linea MDA-MB-231, rispetto al controllo. Non si apprezza alcuna differenza di espressione proteica, invece, tra il lisato controllo e quello trattato con il mezzo delle cellule 8701BC.

Le integrine rappresentano una classe di molecole d'adesione importante sia nella fase di moltiplicazione e migrazione delle cellule endoteliali, sia in quella terminale del processo neoangiogenico. L'integrina $\alpha\beta_3$, generalmente non rilevabile nell'endotelio quiescente, favorisce la migrazione cellulare sotto stimolo angiogenetico [Brooks PC et al, 1995b]. La subunità β_3 è stata ricercata negli estratti proteici delle cellule ECV304 seminate su gel di collagene (Fig. 12). Mediante blot con anticorpo specifico, in grado di riconoscere la forma non ridotta dell'integrina, una banda più intensa è emersa nei campioni relativi al trattamento con i mezzi tumorali, rispetto al controllo. Una maggiore espressione di integrina β_3 è rilevabile soprattutto nelle cellule endoteliali incubate con il mezzo condizionato della linea MDA-MB-231.

Gli enzimi degradanti i componenti dell'ECM sono altri agenti che guidano il processo angiogenetico. Oltre alle metalloproteasi, gli enzimi litici più studiati nella ricerca terapeutica anti-tumorale, anche le serino-proteasi sono coinvolte nella formazione di vasi sanguigni secondo alcuni modelli angiogenetici [Netzel-Arnett S et al, 2003]. L'espressione delle proteine DPP4 e FAP, due serino-proteasi transmembranarie, è stata studiata mediante western-blot. Le immagini in figura 12 mostrano che DPP4, normalmente espressa a livelli basali nell'endotelio, viene prodotta in cellule ECV304 in misura maggiore rispetto al controllo dopo trattamento con il solo mezzo condizionato della linea MDA-MB-231. L'anticorpo adottato contro questa proteasi è siglato come E26, specifico per gli omodimeri di DPP4 presenti sulla membrana cellulare; riconosciuti in condizioni non ridotte (NR). Un altro anticorpo (E34) usato per individuare il complesso DPP4/FAP ha rilevato un modesto incremento per questo eterodimero sempre nei campioni derivati dall'incubazione con il mezzo condizionato delle cellule MDA-MB-231. Le cellule tumorali 8701BC, invece, non sembrano influenzare l'espressione endoteliale di DPP4 e del suo complesso con FAP, nel modello riprodotto *in vitro*. Un anticorpo specifico solo per FAP è stato anche utilizzato. Nessuna differenza significativa per l'espressione di questa proteina è osservabile tra i campioni trattati e controllo. Le analisi western-blot suggeriscono complessivamente che linea tumorale MDA-MB-231, rispetto a 8701BC, è in grado maggiormente di stimolare in cellule endoteliali l'espressione del fattore pro-angiogenico VEGF-A, del marcatore di migrazione cellulare integrinico β_3 , e della serino-proteasi DPP4. Queste

proteine, probabilmente, sono effettori del potenziale invasivo che le cellule ECV304 acquisiscono dopo coltura con il tumore. I dati suggeriscono anche che diverse linee di carcinoma mammario possono stabilire un cross-talk con l'endotelio mediante differenti vie di segnale, stimolando il rilascio di diversi mediatori angiogenici.

A)



B)

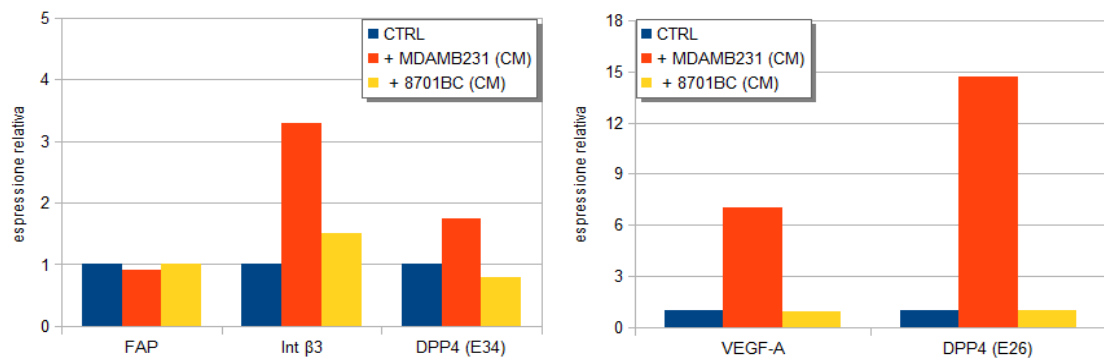


Figura 12.: Analisi Wesern Blot. Cellule ECV304 sono state coltivate per 1 settimana su collagene 3D in assenza (-) ed in presenza (+) dei mezzi tumorali relativi alle linee 8701BC e MDA-MB-231. 20 ug degli estratti proteici ottenuti da queste colture sono stati sottoposti ad analisi western-blot, mediante l'ausilio di anticorpi specifici contro le proteine FAP, integrina $\beta 3$, VEGF-A, DPP4 (A). Per l'analisi di DPP4, FAP e integrina $\beta 3$, i campioni proteici sono stati usati in condizioni non riducenti. Le bande di espressione proteica sono state quantizzate con Image J; attribuendo al controllo valore unitario, e normalizzando per il contenuto in b-actina (B).

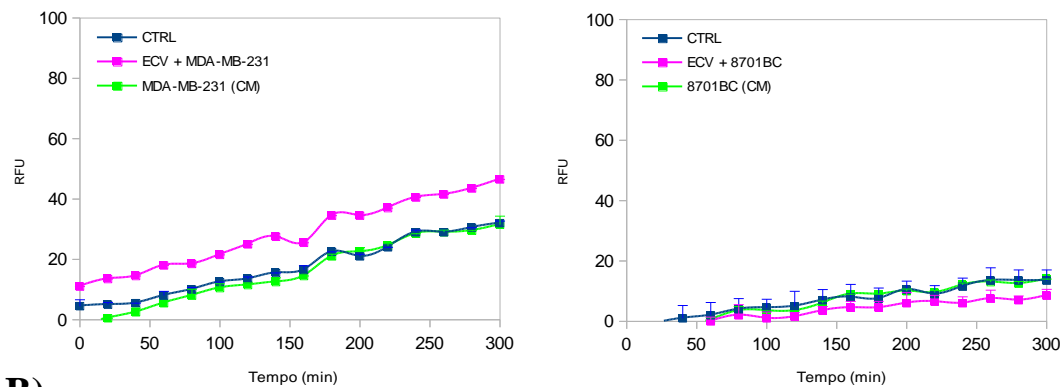
(NR): campione non ridotto. (R): campione ridotto

E26: Ab anti-DPP4/DPP4; E34: Ab anti-DPP4/FAP

4.6 Le cellule tumorali MDA-MB-231 stimolano l'attività enzimatica di DPP4 in cellule endoteliali

La serin-proteasi DPP4 è una proteina di membrana in grado di riconoscere ed interagire con il collagene nativo e denaturato, e perciò può venire coinvolto nel processo di migrazione cellulare. Oltre ad esplicare un'attività digestiva verso componenti dell'ECM, può processare ormoni e chemochine circolanti; ricoprendo quindi diversi ruoli biologici [Mentlein R, 2004; Chen WT et al, 2003]. Recentemente, i livelli sierici di DPP4 e FAP sono stati considerati come possibili "markers" prognostici nel cancro, sottolineando l'importanza anche della frazione solubile di queste proteine [Javidroozi M et al, 2012]. L'attività di DPP4 è stata saggiata in cellule ECV304 coltivate per 7 giorni su gel di collagene, in presenza o meno dei mezzi condizionati tumorali. Di queste colture, sia i surnatanti sia i lisati di ECV304 sono stati sottoposti a cinetica enzimatica, utilizzando un substrato fluorescente specifico per DPP4. La figura 13A mostra come nei surnatanti relativi ai campioni trattati con i mezzi tumorali, nessun incremento per l'attività di DPP4 sia riscontrabile. Le curve ottenute per il campione trattato, quello controllo, ed il solo mezzo condizionato tumorale sono pressochè sovrapponibili. Dall'analisi dei lisati, invece, emerge un picco di fluorescenza a circa 50 minuti per il campione derivato dal trattamento di ECV304 con il mezzo della linea MDA-MB-231. Lo stesso picco risulta assente nel lisato controllo (Fig. 13B), ed in quello relativo al trattamento con il mezzo della linea 8701BC. I dati di cinetica indicano che le cellule tumorali MDA-MB-231, e non quelle 8701BC, promuovono l'attività dipeptidil-peptidasi di DPP4 in cellule ECV304, contribuendo alla migrazione ed invasività di quest'ultime. L'incremento enzimatico registrato dopo 7 giorni di coltura, è attribuibile ad una porzione di DPP4 perlopiù associabile alla membrana delle cellule endoteliali; piuttosto che rilasciata nel surnatante.

A)



B)

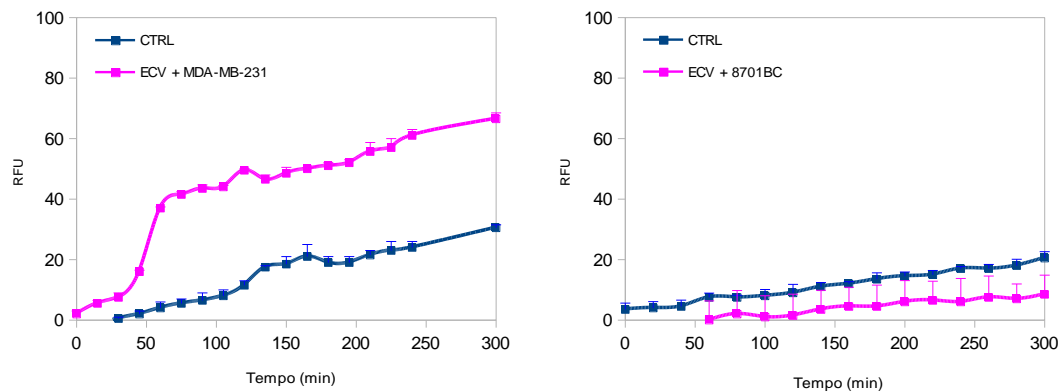


Figura 13.: Cinetica enzimatica per DPP4. Cellule ECV304 sono state coltivate per 1 settimana su collagene 3D in assenza ed in presenza dei mezzi tumorali relativi alle linee 8701BC e MDA-MB-231. 10-15 μ g di proteine relative ai surnatanti (A) ed ai lisati (B) della coltura sono stati incubati a 37°C per 5h con il substrato.....(μ M). Le unità di fluorescenza (RFU) sono state registrate ad intervalli di circa 20 minuti. L'esperimento è stato condotto in triplicato.

CTRL: surnatante e lisato della coltura controllo (ECV304 incubate con il loro stesso mezzo).

ECV + MDAMB231 / ECV + 8701BC: surnatante e lisato della coltura di ECV304 con i mezzi condizionati tumorali.

MDAMB231 (CM) / 8701BC (CM): mezzi condizionati tumorali tal quali

4.7 Le linee di tumore mammario MDA-MB-231 e 8701BC alterano in cellule ECV304 l'espressione genica di metallo- e serino-proteasi.

Gli effetti esercitati dalle linee di carcinoma mammario sulle cellule endoteliali sono stati studiati anche in termini di espressione genica. Il grafico in figura 14 mostra i livelli di serino- e metallo-proteasi espressi dalle cellule ECV304 dopo trattamento o meno con i mezzi condizionati (CM) tumorali. L'unica proteasi a serina di cui è stata analizzata l'espressione genica è DPP4, generalmente espressa a livelli basali in cellule epiteliali ed endoteliali. I dati mostrano come i livelli di mRNA per questo enzima

rimangano invariati sotto l'effetto di entrambi i mezzi tumorali adoperati, rispetto al controllo. I dati emersi sulla proteina di DPP4, nonchè sulla sua attività enzimatica, mostrano invece una up-regolazione di questo enzima in cellule ECV304 dopo trattamento con il mezzo condizionato di MDA-MB-231. Questi risultati, complessivamente, suggeriscono un probabile controllo post-trascrizionale di DPP4 in cellule endoteliali da parte delle cellule tumorali MDA-MB-231.

Nella tumorigenesi, lo sviluppo di un rete capillare richiede il supporto di MMP proangiogeniche. Le cellule endoteliali in stato quiescente non esprimono livelli significativi di MMP. Tra le metalloproteasi analizzate per real-time, MMP14 è l'unica ancorata alla membrana. Durante l'angiogenesi, la sua espressione vascolare è rilevabile nella regione di germinazione capillare, in modo che proliferazione e degradazione del collagene risultino coordinati nelle cellule endoteliali in crescita [Yana I et al, 2007]. In cellule ECV304, l'espressione di MMP14 aumenta in maniera significativa dopo incubazione con il mezzo condizionato dalla linea 8701BC e, in misura maggiore, con quello della linea MDA-MB-231 (Fig. 14).

Tra le MMP solubili nell'ambiente extracellulare, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7 sono state valutate nei campioni mediante analisi di espressione genica. Il ruolo di MMP solubili nella formazione di nuovi vasi risulta oggi molto complesso, dato che queste proteasi possono agire sia direttamente che indirettamente nel rimodellamento dell'ECM, riuscendo a controllare diverse vie di segnalazione cellulare, ed in modo autocrino e paracrino [Deryugina EI et al, 2010]. La real-time PCR ha rivelato che cellule ECV304 iper-esprimono MMP1 quando coltivate con il mezzo condizionato di entrambe le linee di carcinoma mammario adoperate. In letteratura, questo enzima degradante il collagene interstiziale viene menzionato come promotore dell'angiogenesi. Un meccanismo con cui MMP1 possa agire in senso angiogenetico prevede l'attivazione proteolitica del recettore endoteliale PAR-1 [Goerge T et al, 2006]. Un altro metalloenzima capace di degradare il collagene di tipo I è MMP2. Questa gelatinasi è stata implicata in diversi aspetti della progressione tumorale, tra cui l'induzione dello "switching" angiogenico [Egeblad M et al, 2002]. Come si evince dalla figura 14, l'espressione di MMP2 viene stimolata in modo significativo nelle cellule endoteliali solo dalla linea tumorale 8701BC. L'espressione di MMP3 è stata pure quantizzata nei campioni. Il ruolo di questa stromelisinina non è ancora ben chiaro. Questa proteasi viene ritrovata quasi esclusivamente nello stroma tumorale; qui può essere secreta da fibroblasti, cellule endoteliali e leucociti infiltranti [Deryugina EI et al, 2010]. Una sua overespressione è stata correlata con la carcinogenesi mammaria [Sternlicht MD et al,

2000]. La real-time PCR ha mostrato che la linea di tumore mammario tripla negativa MDA-MB-231 induce in cellule ECV304 la sovra-espressione di MMP3. In ultimo, l'espressione della matrilisina, MMP7, viene ipo-regolata dopo trattamento con entrambi i mezzi condizionati tumorali, rispetto al controllo. Le evidenze sperimentali su questo enzima sono spesso contrastanti. MMP7, per esempio, è in grado di stimolare direttamente la proliferazione delle cellule endoteliali nel tumore al colon-retto [Nishizuka I et al, 2001]; mentre non ha alcun effetto sullo sviluppo del tumore in un modello di carcinogenesi mammaria [Martin MD et al, 2008].

Questo studio di espressione genica ha rivelato come le due linee di cancro al seno alterino in cellule endoteliali l'espressione degli enzimi degradanti l'ECM e, in alcuni casi, anche in modo differente. Mentre i livelli trascrizionali di DPP4 non subiscono modifiche in ogni caso, l'espressione di MMP14, MMP1 e MMP7 viene influenzata dal trattamento con le due linee tumorali in maniera simile. MMP2, invece, viene up-regolata nelle cellule ECV304 solo dopo cross-talk con le cellule 8701BC. Viceversa, l'espressione di MMP3 incrementa specificamente sotto lo stimolo delle cellule MDA-MB-231.

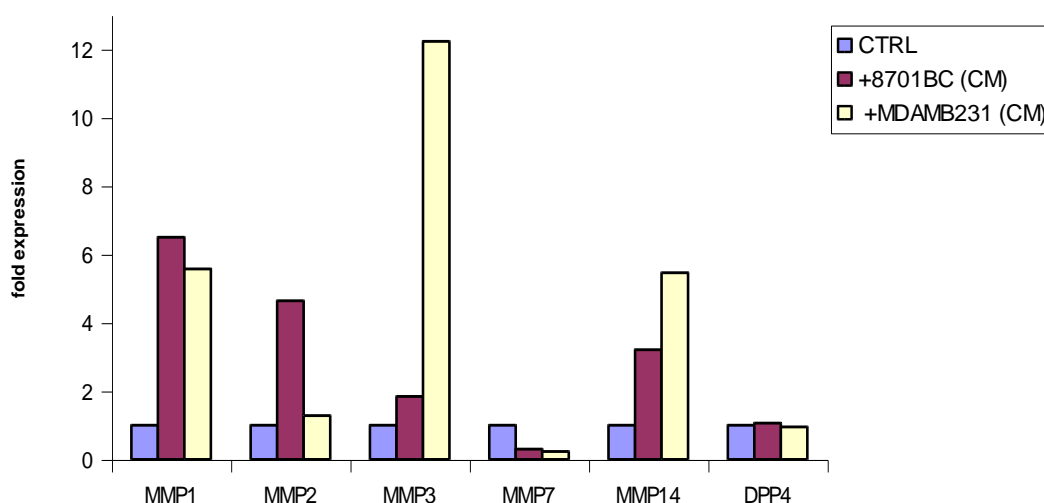


Figura 14.: Real-time PCR. Quantizzazione dell'espressione genica in cellule ECV304 cresciute per 7 giorni su collagene 3D in presenza del mezzo condizionato (CM) delle linee tumorali 8701BC e MDA-MB-231, e del mezzo controllo (non tumorale). L'espressione dei geni target nei campioni è stata riportata in relazione al controllo, che ha valore unitario. L'esperimento è stato ripetuto 2 volte.

4.8 Analisi in vivo del potere angiogenico dei mezzi condizionati tumorali.

Dalle analisi precedenti, i mezzi condizionati delle linee tumorali 8701BC e MDA-MB-231 si sono mostrati capaci di modificare *in vitro*, a diversi livelli, l'espressione di fattori, molecole di adesione ed enzimi aventi ruoli nell'angiogenesi. Con lo scopo di approfondire il cross-talk fra tumore ed endotelio, il potere angiogenico dei mezzi condizionati (CM) è stato saggiato *in vivo*, mediante la riproduzione di “plug” di collagene in topi BALB/C. Dei plugs recuperati ad 1 settimana è stato misurato il contenuto emoglobinico, per quantificarne la vascolarizzazione. Il grafico in figura 15 suggerisce che soltanto il mezzo condizionato dalle cellule MDA-MB-231 stimola una discreta vascolarizzazione *in vivo*. Gli esperimenti condotti sul modello animale sono ancora in fase preliminare.

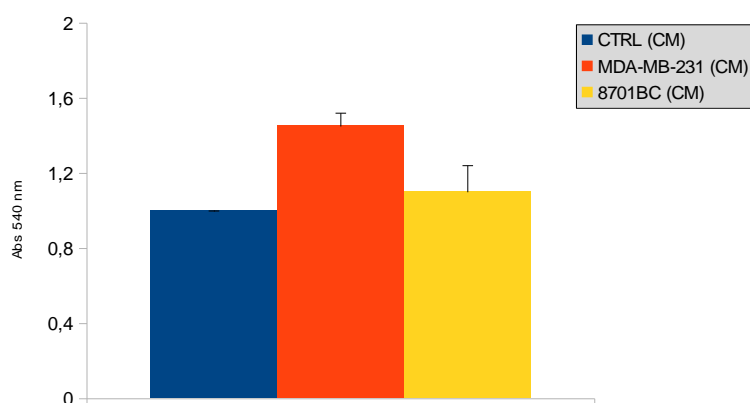


Figura 15.: Saggio per l'emoglobina. I mezzi condizionati (CM) delle linee tumorali 8701BC e MDA-MB-231, e delle cellule endoteliali ECV304 (CTRL) sono stati iniettati s.c. insieme a collagene I in topi BALB/C (500 μ l). Dopo 1 settimana, i plugs sono stati recuperati e analizzati mediante il Drabkin's kit reagent (Sigma). Il contenuto di emoglobina nei campioni è proporzionale all'assorbanza misurata a 540 nm. Al controllo è stato assegnato valore unitario. Due iniezioni sono state effettuate per topo, a campione. L'esperimento è stato ripetuto 2 volte.

5. DISCUSSIONE

L'angiogenesi tumorale è un processo di formazione di un network di vasi all'interno di un tessuto neoplastico. I tumori solidi sono strettamente dipendenti dalla formazione di nuovi vasi [Folkman J, 1990]. Per molti di essi, la densità vascolare costituisce anche un indicatore prognostico del potenziale metastatico. Il tumore mammario è un esempio di tumore solido fortemente influenzato dal fenomeno angiogenico. Correlazioni clinico-patologiche confermano il ruolo centrale dell'angiogenesi nella progressione del cancro al seno [Guinebretiere JM et al, 1994]. L'angiogenesi tumorale è un problema tuttora aperto della scienza biomedica: si sa che per crescere e sopravvivere la massa neoplastica ha bisogno di nuovi vasi sanguigni, ma il modo con cui essi si originino è scarsamente compreso, oltre che variabile con l'eterogeneità biologica delle neoplasie []. Per queste ragioni, le attuali terapie anti-angiogenetiche si mostrano più citostatiche che citotossiche nei confronti del tumore, senza apportare un significativo prolungamento della sopravvivenza nei pazienti affetti da cancro [Davis DW et al, 2003].

Con lo scopo di approfondire i meccanismi molecolari che regolano il processo angiogenetico, ed indentificare nuovi bersagli terapeutici, un modello di studio del "cross-talk" tra endotelio e tumore al seno è stato messo a punto *in vitro*. La co-coltura del citotipo endoteliale e tumorale mediante transwell ha consentito lo scambio di fattori solubili tra le cellule endoteliali ECV304 e quelle di carcinoma mammario MDA-MB-231 e 8701BC. In questo modo, senza alcun contatto fisico tra i due tipi cellulari, è stato possibile studiare specificamente gli effetti del tumore sull'endotelio, in senso angiogenico. Entrambe le linee di carcinoma mammario si sono rivelate capaci di stimolare la migrazione e l'invasività delle cellule endoteliali, su matrice di collagene di tipo-I rispettivamente bidimensionale (*coating*) e tridimensionale (*gel*). Questi risultati hanno suggerito l'esistenza di una comunicazione inter-cellulare basata sullo scambio di fattori solubili tra le cellule endoteliali e tumorali. Per questo motivo, particolare attenzione è stata focalizzata ai mezzi condizionati (MC) dalla crescita delle cellule tumorali. Colture 3D di collagene, sicuramente più adatte per lo studio dell'angiogenesi rispetto alla coltura su piastra, sono state allestite per le cellule ECV304, e quindi analizzate, in presenza dei mezzi condizionati delle linee cellulari di tumore mammario. I mezzi di crescita delle cellule MDA-MB-231 e 8701BC hanno promosso in maniera differente nelle cellule endoteliali l'espressione di marcatori angiogenici ed enzimi coinvolti nel rimodellamento tissutale. Entrambi i mezzi condizionati, inaspettatamente,

non hanno influenzato *in vitro* la “crescita” delle cellule ECV304 in senso proliferativo, come si evince dal saggio MTS. Questo risultato potrebbe essere spiegato con il fatto che la linea ECV304, essendo una linea di cellule endoteliali immortalizzate tramite infezione con il virus del sarcoma di raus, poco si adatta alla valutazione relativa agli effetti sui processi proliferativi.

L'espressione del VEGF-A, tra i più potenti fattori pro-angiogenici, viene incrementata nelle cellule ECV304 dopo trattamento con il mezzo condizionato della linea tumorale MDA-MB-231. Lo stesso fattore, invece, non risulta indotto dal mezzo di crescita delle cellule 8701BC. Tra le molecole di adesione al substrato, la subunità integrinica $\beta 3$ risulta differentemente modulata dalla presenza dei mezzi tumorali. Il suo complesso con αv rappresenta l'integrina maggiormente coinvolta nella regolazione dell'angiogenesi. Interagisce con i componenti RGD dell'ECM e, localizzando con le forme proteolitiche cellulari capaci di degradare l'ECM, guida la migrazione delle cellule endoteliali [Danhier F et al, 2012]. L'espressione proteica dell'integrina $\beta 3$ è indotta nelle cellule endoteliali particolarmente dal mezzo condizionato della linea cancerosa MDA-MB-231, piuttosto che da quello relativo alla linea 8701BC. Questo risultato è in linea con quello relativo al VEGF-A. Infatti, questo fattore, in condizioni di ipossia, è noto stimolare in cellule endoteliali l'espressione delle integrine αv , $\beta 3$ e $\beta 5$, in modo autocrino e paracrino [Suzuma K et al, 1998]. La linea tumorale MDA-MB-231, e non 8701BC, potrebbe promuovere dunque la transizione epitelio-mesenchima nelle cellule ECV304 incrementando in esse i livelli di VEGF-A e integrina $\beta 3$.

Anche l'espressione endoteliale di metalloproteasi di matrice risulta influenzata dai mezzi di crescita tumorali. Questi enzimi, noti rimodellatori dell'ECM, vengono correlati a diversi aspetti della progressione tumorale [Egeblad M et al, 2002]. Tra gli enzimi in grado di digerire il collagene interstiziale (tipo I, II e III), MMP14 e MMP1 risultano up-regolati in cellule ECV304 dopo incubazione con i mezzi condizionati di entrambi le linee di carcinoma mammario. MMP1 può agire in senso pro-angiogenetico anche attivando proteoliticamente il recettore PAR-1 espresso sulle cellule endoteliali. Tale evento, a cascata, favorisce il rilascio del fattore VWF e la mobilizzazione di $[Ca^{+2}]$ intracellulare; attivando così le cellule endoteliali in senso pro-infiammatorio [Goerge T et al, 2006]. MMP14, l'unica metalloproteasi di membrana analizzata, è di fondamentale importanza nell'angiogenesi sia fisiologica che patologica. È noto che governi la proteolisi pericellulare delle cellule endoteliali in matrici 2D e 3D *in vitro* [Deryugina EI et al, 2010]; e potrebbe contribuire all'incremento del tasso di migrazione delle cellule ECV304 cresciute con i mezzi tumorali delle linee MDA-MB231 e 8701BC. I

suoi livelli di espressione, infatti, aumentano nelle cellule endoteliali trattate con entrambi i mezzi tumorali. Tra le gelatinasi, MMP2, è in grado di digerire pure il collagene di tipo I, come le altre collagenasi [Nagase H et al, 2006]. Questo enzima non risulta attivato nei campioni, come si evince dalle zimografie. I livelli del suo trascritto però aumentano nelle cellule endoteliali sotto stimolo solo del mezzo condizionato della linea 8701BC, e non di quella MDA-MB-231. Alterazioni nell'espressione della proteina MMP2 potrebbero essere probabilmente messe in evidenza dall'analisi di colture 3D a tempi più lunghi rispetto quelli da noi analizzati (oltre 7 giorni).

L'altra gelatinasi, MMP9, invece risulta differentemente presente nei campioni. Questa è considerata la più potente metalloproteasi pro-angiogenetica. Interviene nell'innescamento dello switching angiogenico e, oltre a degradare vari costituenti dell'ECM (collageni IV, V, XI, laminina, aggregano, ecc.), processa diverse citochine e chemochine, e contribuisce al rilascio di fattori di crescita nello stroma [Nagase H et al, 2006; Deryugina EI et al, 2010]. Dopo coltura con entrambi i mezzi di crescita tumorali, le cellule ECV304 producono maggiori livelli di pro-MMP9. In particolare, a 7 giorni, la linea cancerosa MDA-MB-231 incrementa la frazione intra-cellulare di pro-MMP9; mentre la linea 8701BC sembra favorire un maggiore rilascio extracellulare dell'enzima; suggerendo un diverso controllo di MMP9 ad opera dei due mezzi di crescita tumorali. Una metalloproteasi che ha dei domini simili alle collagenasi, ma che non taglia il collagene interstiziale è la stromelisina-1 (MMP3). Questo enzima viene up-regolato nei tumori al colon-retto [Zucker S et al, 2004] ed in quelli desmoidi [Denis H et al, 2004]. Recentemente la sua overespressione, insieme a quella del fattore VEGF-A, è stata attribuita alla perdita di funzione del gene Gadd45a, un soppressore dell'angiogenesi tumorale, mediante coinvolgimento del pathway mTOR/STAT3 [Yang F et al, 2013; Shan Z et al, 2012]. MMP3 risulta sovra-espresso particolarmente nelle cellule endoteliali dopo coltura con il mezzo condizionato dalle cellule MDA-MB-231; lo stesso mezzo che induce in ECV304 un incremento anche della proteina VEGF-A. Gadd45a, alla luce di questi dati, potrebbe avere un ruolo nel cross-talk ECV304/MDA-MB-231; e perciò in futuro sarà approfondita sia la sua espressione che funzione.

La matrilisina (MMP7) è una delle più piccole metalloproteinasi note della matrice, e la sua espressione si riduce in cellule ECV304 sotto l'influenza dei mezzi di crescita di entrambe le linee tumorali. Il ruolo di questo enzima nella progressione tumorale è contrastante. Può essere secreta da una varietà di cellule; e la sua specifica espressione in cellule neoplastiche viene correlata soprattutto con la formazione di metastasi [Wilson CL et al, 1996]. In un modello di carcinogenesi alla mammella, MMP7 non ha

mostrato alcun effetto sullo sviluppo della neoplasia [Martin MD et al, 2008]. In uno studio sul tumore colon-rettale MMP7 è stata correlata direttamente con l'angiogenesi, riuscendo ad agire sulla proliferazione delle cellule endoteliali [Nishizuka I et al, 2001]. Le linee di tumore mammario MDA-MB-231 e 8701BC non sembrano promuovere questo enzima in cellule ECV304 per stimolarne la migrazione e l'invasività.

Proteasi a serina sono anche capaci di promuovere la migrazione di cellule tumorali ed endoteliali su matrici collagenolitiche *in vitro*, come DPP4 e FAP [Gherzi G et al, 2002]. L'espressione di DPP4, e non di FAP, incrementa nelle cellule ECV304 dopo trattamento con il mezzo di crescita della linea tumorale MDA-MB-231, e non della linea 8701BC. Questo incremento non riguarda i livelli d'espressione dello mRNA codificante per DPP4, bensì sembra essere correlato a fenomeni post-trascrizionali, come si evince dai dati di real-time e western blot. L'eterocomplesso DPP4/FAP sembra incrementare pure a livello endoteliale sotto stimolo della linea MDA-MB-231; ma in misura minore rispetto agli omodimeri di DPP4. Ulteriori analisi saranno necessarie per valutare meglio la presenza dell'eterocomplesso nei campioni. Recentemente, ai livelli sierici di DPP4, come di FAP, è stato attribuito un valore prognostico nel cancro, sottolineando l'importanza anche della frazione solubile di queste proteine. Nello specifico, la concentrazione plasmatica dell'enzima, a differenza della sua espressione nel tumore solido, correla inversamente con la malignità della neoplasia [Javidroozi M et al, 2012]. Le analisi di cinetica enzimatica non hanno rivelato incrementi dell'attività di DPP4 nei surnatanti delle cellule ECV304, dopo il trattamento con i mezzi condizionati tumorali. Soltanto nel compartimento intra-cellulare la concentrazione dell'enzima aumenta a seguito della coltura con il mezzo della linea MDA-MB-231, a conferma dei dati ottenuti con l'analisi tramite western blot.

Complessivamente, entrambe le cellule di tumore mammario sono in grado di stimolare la migrazione e l'invasività della linea endoteliale ECV304. I diversi eventi molecolari indotti dai mezzi delle cellule MDA-MB-231 e 8701BC sono attribuibili probabilmente ai loro differenti profili genetici. Dagli esperimenti di cinetica enzimatica e western-blot, la linea tripla-negativa MDA-MB-231 sembra possedere un potenziale angiogenico più elevato della linea di carcinoma duttale infiltrante 8701BC. Esperimenti *in vivo* si riveleranno utili per sostenere questa tesi. I dati preliminari ottenuti sul modello topo suggeriscono che il mezzo condizionato dalle cellule MDA-MB-231 riproduce dopo 7 giorni un'angiogenesi *in vivo* poco superiore al mezzo della linea 8701BC, mediante *plug* di collagene. Gli esperimenti saranno ripetuti in futuro incubando i mezzi condizionati nell'animale per tempi più lunghi (almeno 20 giorni); per poter osservare

una vascolarizzazione dei *plug* più sostenuta. Inoltre, nei mezzi condizionati delle cellule, l'aggiunta di inibitori specifici per le attività enzimatiche studiate permetterà di risalire ai pathway molecolari che vengono attivati dal sottotipo tumorale, e di individuare bersagli anti-angiogenetici più specifici.

Bibliografia

Ahn GO, Brown JM. **Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells.** *Cancer Cell*, 13(3):193-205, 2008

Ardi VC, Van den Steen PE, Opdenakker G, Schweighofer B, Deryugina EI, Quigley JP. **Neutrophil MMP-9 proenzyme, unencumbered by TIMP-1, undergoes efficient activation in vivo and catalytically induces angiogenesis via a basic fibroblast growth factor (FGF-2)/FGFR-2 pathway.** *J Biol Chem*, 284(38):25854-66, 2009

Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. **VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells.** *EMBO J*, 18(14):3964-72, 1999

Basile JR, Holmbeck K, Bugge TH, Gutkind JS. **MT1-MMP controls tumor-induced angiogenesis through the release of semaphorin 4D.** *J Biol Chem*, 282(9):6899-905, 2007.

Bauvois B. **A collagen-binding glycoprotein on the surface of mouse fibroblasts is identified as dipeptidyl peptidase IV.** *Biochem J*, 252(3):723-31, 1988.

Bergers G, Coussens LM. **Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases.** *Curr Opin Genet Dev*, 10(1):120-7, 2000a

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. **Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis.** *Nat Cell Biol*, 2(10):737-44, 2002b.

Bergers G, Hanahan D. **Modes of resistance to anti-angiogenic therapy.** *Nat Rev Cancer*, 8(8):592-603, 2008

Bramhall SR, Hallissey MT, Whiting J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, Hawkins RE, McCulloch P, Maughan T, Brown PD, Baillet M, Fielding JW. **Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial.** *Br J Cancer*, 86(12):1864-70, 2002a

Bramhall SR, Schulz J, Nemunaitis J, Brown PD, Baillet M, Buckels JAC. **A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer.** *Br J Cancer*, 87(2): 161–167, 2002b

Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers ECM, Semenza GM, Pinedo HM, Abeloff MD, Simons JW, Van Diest PJ, Wan Der Wall E. **Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis.** *J Natl Cancer Inst*, 93:309-314, 2001.

Brooks PC, Strömblad S, Klemke R, Visscher D, Sarkar FH, Cheresh DA. **Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin.** *J Clin Invest*, 96(4):1815-22, 1995.

Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, Von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler Stevenson, WG, Quigley JP, Cheresch DA. **Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3.** *Cell*, 85:683-693, 1996.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. **Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele.** *Nature*, 380(6573):435-9, 1996

Carmeliet P, Collen D. **Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease.** *J Pathol*, 190(3):387-405, 2000.

Chen WT, Kelly T, Ghersi G. **DPPIV, seprase, and related serine peptidases in multiple cellular functions.** *Curr Top Dev Biol*, 54:207-32, 2003

Danhier F, Le Breton A, Pr eat V. **RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis.** *Mol Pharm*, 9(11):2961-73, 2012.

Davis DW, McConkey DJ, Zhang W, Herbst RS. **Antiangiogenic tumor therapy.** *Biotechniques*, 34(5):1048-50, 2003

Deryugina EI, Soroceanu L, Strongin AY. **Up-regulation of vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human glioma xenograft growth and angiogenesis.** *Cancer Res*, 62(2):580-8, 2002

Deryugina EI, Quigley JP. **Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions.** *Biochim Biophys Acta*, 1803(1):103-20, 2010

Deshpande N, Ren Y, Foygel K, Rosenberg J, Willmann JK. **Tumor angiogenic marker expression levels during tumor growth: longitudinal assessment with molecularly targeted microbubbles and US imaging.** *Radiology*, 258(3):804-11, 2011

Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ. **Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma.** *Cell*, 88(6):801-10, 1997

Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. **Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis.** *Curr Top Microbiol Immunol*, 237:97-132, 1999

Egeblad M, Werb Z. **New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.** *Nat Rev Cancer*, 2(3):161-74, 2002

Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. **Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells.** *J Cell Sci*, 111 (Pt 13):1853-65, 1998.

Fernandez CA, Roy R, Lee S, Yang J, Panigrahy D, Van Vliet KJ, Moses MA. **The anti-angiogenic peptide, loop 6, binds insulin-like growth factor-1 receptor.** *J Biol Chem*, 285:41886-41895, 2010

- Ferrara N, Davis-Smyth T. **The biology of vascular endothelial growth factor.** *Endocr Rev*, 18(1):4-25, 1997
- Folkman J. **What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?** *J Natl Cancer Inst*, 82(1):4-6, 1990
- Folkman J, Shing Y. **Angiogenesis.** *J Biol Chem*, 267(16):10931-4, 1992
- Folkman J. **Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis.** *Semin Oncol*, 29(6 Suppl 16):15-8, 2002.
- Fowlkes JL, Serra DM, Rosenberg CK, Thrailkill KM. **Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) functions as an IGF-reversible inhibitor of IGFBP-4 proteolysis.** *J Biol Chem*, 270(46):27481-8, 1995
- Fratto ME, Imperatori M, Vincenzi B, Tomao F, Santini D, Tonini G. **New perspectives: role of sunitinib in breast cancer.** *Clin Ter*, 161(5):475-82, 2010
- Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresch DA. **Definition of two angiogenic pathways by distinct α v integrins.** *Science*, 270: 1500–1502, 1995
- Galm O, Suzuki H, Akiyama Y, Esteller M, Brock MV, Osieka R, Baylin SB, Herman J.G. **Inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene by promoter hypermethylation in lymphoid malignancies.** *Oncogene*, 24:4799–4805, 2005
- Gately S, Twardowski P, Stack MS, Cundiff DL, Grella D, Castellino FJ, Enghild J, Kwaan KC, Kramer RA, Volpert O, Bouck N, Soff GA. **The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin.** *PNAS U S A*, 94(20): 10868–72, 1997
- Gherzi G, Chen W, Lee EW, Zukowska Z. **Critical role of dipeptidyl peptidase IV in neuropeptide Y-mediated endothelial cell migration in response to wounding.** *Peptides*, 22(3):453-8, 2001.
- Gherzi G, Dong H, Goldstein LA, Yeh Y, Hakkinen L, Larjava HS, Chen WT. **Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex.** *J Biol Chem*, 277(32):29231-41, 2002.
- Goerge T, Barg A, Schnaeker EM, Poppelmann B, Shpacovitch V, Rattenholl A, Maaser C, Luger TA, Steinhoff M, Schneider SW. **Tumor-derived matrix metalloproteinase-1 targets endothelial proteinase-activated receptor 1 promoting endothelial cell activation.** *Cancer Res*, 66(15):7766-74, 2006
- Goldstein LA, Gherzi G, Piñero-Sánchez ML, Salamone M, Yeh Y, Flessate D, Chen WT. **Molecular cloning of seprase: a serine integral membrane protease from human melanoma.** *Biochim Biophys Acta*, 1361(1):11-9, 1997
- Gotink KJ, Verheul HM. **Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action?** *Angiogenesis*, 13(1): 1–14, 2010
- Grant SW, Kyshtoobayeva AS, Kurosaki T, Jakowatz J, Fruehauf JP. **Mutant p53**

correlates with reduced expression of thrombospondin-1, increased angiogenesis, and metastatic progression in melanoma. *Cancer Detect Prev*, 22(3):185-94, 1998.

Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. **VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells.** *Cell*, 124(1):175-89, 2006

Guinebretiere JM, Le Monique G, Gavaille A, Bahi J, Contesso G. **Angiogenesis and risk of breast cancer in women with fibrocystic disease.** *J Natl Cancer Inst*, 86:635-636, 1994.

Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC, Bos PD, Kim JY, Nadal C, Gomis RR, Manova-Todorova K, Massagué J. **Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis.** *Nature* 446, 765-770, 2007

Hanahan D, Bergers G, Bergsland E. **Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice.** *J Clin Invest*, 105(8):1045-7, 2000.

Hanai J, Dhanabal M, Karumanchi SA, Albanese C, Waterman M, Chan B, Ramchandran R, Pestell R, Sukhatme VP. **Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1.** *J Biol Chem*, 277(19):16464-9, 2002

Handsley MM, Edwards DR. **Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis.** *Int J Cancer*, 115(6):849-60, 2005

Huang S, Van Arsdall M, Tedjarati S, McCarty M, Wu W, Langley R, Fidler IJ. **Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice.** *J Natl Cancer Inst*, 94(15):1134-42, 2002.

Huber MA, Kraut N, Park JE, Schubert RD, Rettig WJ, Peter RU, Garin-Chesa P. **Fibroblast activation protein: differential expression and serine protease activity in reactive stromal fibroblasts of melanocytic skin tumors.** *J Invest Dermatol*, 120(2):182-8, 2003

Hughes SE. **Functional characterization of the spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV304: use in an in vitro model of angiogenesis.** *Exp Cell Res*, 225(1):171-85, 1996.

Ikenaka Y, Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Noguchi R, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T, Imazu H, Masaki T, Fukui H. **Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the TIMP-1 transgenic mouse model.** *Int J Cancer*, 105(3):340-6, 2003

Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. **Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice.** *Cancer Res*, 58(5):1048-51, 1998

Itoh Y, Seiki M. **MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment.** *J Cell Physiol*, 206(1):1-8, 2006

Jackson C. **Matrix metalloproteinases and angiogenesis.** *Curr Opin Nephrol*

Hypertens, 11(3):295-9, 2002.

Javidroozi M, Zucker S, Chen WT. **Plasma seprase and DPP4 levels as markers of disease and prognosis in cancer.** *Dis Markers*, 32(5):309-20, 2012.

Johnson MD, Kim HR, Chesler L, Tsao-Wu G, Bouck N, Polverini PJ. **Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase.** *J Cell Physiol*, 160: 194–202, 1994

Kargozaran H, Yuan SY, Breslin JW, Watson KD, Gaudreault N, Breen A, Wu MH. **A role for endothelial-derived matrix metalloproteinase-2 in breast cancer cell transmigration across the endothelial-basement membrane barrier.** *Clin Exp Metastasis*, 24(7):495-502, 2007

Khokha R, Zimmer MJ, Graham CH, Lala PK, Waterhouse P. **Suppression of invasion by inducible expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in B16-F10 melanoma cells.** *J Natl Cancer Inst*, 84(13):1017-22, 1992

Kubota Y. **Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy.** *Keio J Med*, 61(2):47-56, 2012

Liekens S, De Clercq E, Neyts J. **Angiogenesis: regulators and clinical applications.** *Biochem Pharmacol*, 61(3):253-70, 2001

Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. **Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen.** *Nature*, 284(5751):67-8, 1980

Löster K, Zeilinger K, Schuppan D, Reutter W. **The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD 26) is the collagen-binding site.** *Biochem Biophys Res Commun*, 217(1):341-8, 1995.

Luttun A, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P. **The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies.** *Curr Atheroscler Rep*, 2(5):407-16, 2000

Martin DC, Sanchez-Sweatman OH, Ho AT, Inderdeo DS, Tsao MS, Khokha R. **Transgenic TIMP-1 inhibits simian virus 40 T antigen-induced hepatocarcinogenesis by impairment of hepatocellular proliferation and tumor angiogenesis.** *Lab Invest*, 79: 225–34, 1999

Martin MD, Matrisian LM. The other side of MMPs: **Protective roles in tumor progression.** *Cancer Metastasis Rev*, 26(3-4):717-24, 2007

Martin MD, Carter KJ, Jean-Philippe SR, Chang M, Mobashery S, Thiollay S, Lynch CC, Matrisian LM, Fingleton B. **Effect of ablation or inhibition of stromal matrix metalloproteinase-9 on lung metastasis in a breast cancer model is dependent on genetic background.** *Cancer Res*, 68(15):6251-9, 2008

Mazar AP. **The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer.** *Anticancer Drugs*, 12(5):387-400, 2001

McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, et al. **Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1.** *J. Biol. Chem*, 276(47):43503–43508, 2001

Mentlein R. **Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides.** *Regul Pept*, 85(1):9-24, 1999

Mentlein R. **Cell-surface peptidases.** *Int Rev Cytol*, 235:165-213, 2004

Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle JL, Haas TL. **Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation.** *Int J Biochem Cell Biol*, 38(3):333-57, 2006

Miller KD, Gradishar W, Schuchter L, Sparano JA, Cobleigh M, Robert N, Rasmussen H, Sledge GW. **A randomized phase II pilot trial of adjuvant marimastat in patients with early-stage breast cancer.** *Ann Oncol*, 13(8):1220-4, 2002.

Minafra S, Morello V, Glorioso F, La Fiura A, Tomasino RM, Feo S, McIntosh D, Wolley DE. **A new cell line (8701BC) from primary ductal infiltrating carcinoma of human breast.** *Br. J. Cancer*, 60: 185-192, 1989

Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massagué J. **Genes that mediate breast cancer metastasis to lung.** *Nature*, 436(7050):518-24, 2005

Mori Y, Kono K, Matsumoto Y, Fujii H, Yamane T, Mitsumata M, Chen WT. **The expression of a type II transmembrane serine protease (Seprase) in human gastric carcinoma.** *Oncology*, 67(5-6):411-9, 2004

Nagase H, Woessner JF Jr. **Matrix metalloproteinases.** *J Biol Chem*, 274(31):21491-4, 1999

Nagase H, Visse R, Murphy G. **Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.** *Cardiovasc Res*, 69(3):562-73, 2006

Netzel-Arnett S, Hooper JD, Szabo R, Madison EL, Quigley JP, Bugge TH, Antalis TM. **Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer.** *Cancer Metastasis Rev*, 22(2-3):237-58, 2003

Niedermeyer J, Scanlan MJ, Garin-Chesa P, Daiber C, Fiebig HH, Old LJ, Rettig WJ, Schnapp A. **Mouse fibroblast activation protein: molecular cloning, alternative splicing and expression in the reactive stroma of epithelial cancers.** *Int J Cancer*, 71(3):383-9, 1997.

Nishizuka I, Ichikawa Y, Ishikawa T, Kamiyama M, Hasegawa S, Momiyama N, Miyazaki K, Shimada H. **Matrilysin stimulates DNA synthesis of cultured vascular endothelial cells and induces angiogenesis in vivo.** *Cancer Lett*, 173(2):175-82, 2001

Nyberg P, Xie L, Kalluri R. **Endogenous inhibitors of angiogenesis.** *Cancer Res*, 65(10):3967-79, 2005

O'Brien P, O'Connor BF. **Seprase: an overview of an important matrix serine**

protease. *Biochim Biophys Acta*, 1784(9):1130-45, 2008.

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. **Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma.** *Cell*, 79(2):315-28, 1994

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. **Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.** *Cell*, 88(2):277-85, 1997

Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. **Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion.** *Cell*, 121(3):335-48, 2005

Overall CM, Kleinfeld O. **Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy.** *Br J Cancer*, 94(7):941-6, 2006

Papaspyridonos M, Lyden D. **The role of bone marrow-derived cells in tumor angiogenesis and metastatic progression.** *Methods Enzymol*, 444:255-69, 2008

Papetti M, Herman IM. **Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis.** *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(5):C947-70, 2002

Pedersen H, Br unner N, Francis D, Osterlind K, R nne E, Hansen HH, Dan  K, Gr ndahl-Hansen J. **Prognostic impact of urokinase, urokinase receptor, and type 1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue.** *Cancer Res*, 54(17):4671-5, 1994.

Pepper MS, Sappino AP, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. **Plasminogen activator inhibitor-1 is induced in migrating endothelial cells.** *J Cell Physiol*, 153(1):129-39, 1992.

Pepper MS, Sappino AP, St cklin R, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. **Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells.** *J Cell Biol*, 122(3):673-84, 1993

Pepper MS. **Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(7):1104-17, 2001

Rakic JM, Maillard C, Jost M, Bajou K, Masson V, Devy L, Lambert V, Foidart JM, No l A. **Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis.** *Cell Mol Life Sci*, 60(3):463-73, 2003.

Ratnikov BI, Rozanov DV, Postnova TI, Baciu PG, Zhang H, DiScipio RG, Chestukhina GG, Smith JW, Deryugina EI, Strongin AY. **An alternative processing of integrin alpha(v) subunit in tumor cells by membrane type-1 matrix metalloproteinase.** *J Biol Chem*, 277(9):7377-85, 2002

Relf M, Le Jeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moqhaddam A, Withehouse R, Bicknell R, Harris AL. **Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acid and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1,**

platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res*, 57:963-969, 1997.

Roskoski R Jr. **Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression.** *Crit Rev Oncol Hematol*, 62(3):179-213, 2007.

Sabapathy KT, Pepper MS, Kiefer F, Möhle-Steinlein U, Tacchini-Cottier F, Fetka I, Breier G, Risau W, Carmeliet P, Montesano R, Wagner EF. **Polyoma middle T-induced vascular tumor formation: the role of the plasminogen activator/plasmin system.** *J Cell Biol*, 137(4):953-63, 1997

Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. **Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 2572–6, 1995

Sargiannidou I, Zhou J, Tuszynski GP. **The role of thrombospondin-1 in tumor progression.** *Exp Biol Med*, 226(8):726-33, 2001

Schneider BP, Miller KD. **Angiogenesis of Breast Cancer.** *J Clin Oncol*, 23:1782-1790, 2005.

Schultz RM, Silberman S, Persky B, Bajkowski AS, Carmichael DF. **Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells.** *Cancer Res*, 48: 5539–45, 1988

Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R, Wei BY, Stetler-Stevenson WG. **TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism.** *Cell*, 114:171–180, 2003

Shan Z, Li G, Zhan Q, Li D. **Gadd45a inhibits cell migration and invasion by altering the global RNA expression.** *Cancer Biol Ther*, 13(11):1112-22, 2012.

Shih T, Lindley C. **Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies.** *Clin Ther*, 28(11):1779-802, 2006

Sier CF, Hawinkels LJ, Zijlmans HJ, Zuidwijk K, de Jonge-Muller ES, Ferreira V, Hanemaaijer R, Mulder-Stapel AA, Kenter GG, Verspaget HW, Gorter A. **Endothelium specific matrilysin (MMP-7) expression in human cancers.** *Matrix Biol*, 27(3):267-71, 2008.

Simpson AJ, Booth NA, Moore NR, Bennett B. **Distribution of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in tissues.** *J Clin Pathol*, 44(2): 139–143, 1991

Sparano JA, Bernardo P, Stephenson P, Gradishar WJ, Ingle JN, Zucker S, Davidson NE. **Randomized phase III trial of marimastat versus placebo in patients with metastatic breast cancer who have responding or stable disease after first-line chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology Group trial E2196.** *J Clin Oncol*, 22(23):4683-90, 2004

Stack MS, Gately S, Bafetti LM, Enghild JJ, Soff GA. **Angiostatin inhibits endothelial**

and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. *Biochem J*, 340 (Pt 1):77-84, 1999

Stephens RW, Br unner N, J nicke F, Schmitt M. **The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat*, 52(1-3):99-111, 1998.

Sternlicht MD, Bissell MJ, Werb Z. **The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter.** *Oncogene*, 19(8):1102-13, 2000

Sugiura Y, Ma L, Sun B, Shimada H, Laug WE, Seeger RC, DeClerck YA. **The plasminogen-plasminogen activator (PA) system in neuroblastoma: role of PA inhibitor-1 in metastasis.** *Cancer Res*, 59(6):1327-36, 1999.

Suzuma K, Takagi H, Otani A, Honda Y. **Hypoxia and vascular endothelial growth factor stimulate angiogenic integrin expression in bovine retinal microvascular endothelial cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39(6):1028-35, 1998

Taraboletti G, Morbidelli L, Donnini S, Parenti A, Granger HJ, Giavazzi R, Ziche M. **The heparin binding 25 kDa fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells.** *FASEB J*, 14(12):1674-6, 2000.

Tazzyman S, Lewis CE, Murdoch C. **Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis.** *Int J Exp Pathol*, 90(3):222-31, 2009

Tholozan FM1, Gribbon C, Li Z, Goldberg MW, Prescott AR, McKie N, Quinlan RA. **FGF-2 release from the lens capsule by MMP-2 maintains lens epithelial cell viability.** *Mol Biol Cell*, 18(11):4222-31, 2007

Tonini T, Rossi F, Claudio PP. **Molecular basis of angiogenesis and cancer.** *Oncogene*, 22(42):6549-56, 2003

Twining SS. **Regulation of proteolytic activity in tissues.** *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 29(5):315-83, 1994

Uchiyama T, Kurabayashi M, Ohyama Y, Utsugi T, Akuzawa N, Sato M, Tomono S, Kawazu S, Nagai R. **Hypoxia induces transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene through genistein-sensitive tyrosine kinase pathways in vascular endothelial cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(4):1155-61, 2000

Verheul HM, Pinedo HM. **Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition.** *Nat Rev Cancer*, 7(6):475-85, 2007

Visse R, Nagase H. **Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.** *Circ Res*, 92(8):827-39, 2003

Watnick RS, Cheng YN, Rangarajan A, Ince TA, Weinberg RA. **Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis.** *Cancer Cell*, 3(3):219-31, 2003

Weis SM, Cheresch DA. **Nat Med. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets.** *Nat Med*, 17(11):1359-70, 2011

World Cancer Report. *International Agency for Research on Cancer*, 2008.

www.airc.it

Yana I, Sagara H, Takaki S, Takatsu K, Nakamura K, Nakao K, Katsuki M, Taniguchi S, Aoki T, Sato H, Weiss SJ, Seiki M. **Crosstalk between neovessels and mural cells directs the site-specific expression of MT1-MMP to endothelial tip cells.** *J Cell Sci*, 120(Pt 9):1607-14, 2007

Yang F, Zhang W, Li D, Zhan Q. **Gadd45a suppresses tumor angiogenesis via inhibition of the mTOR/STAT3 protein pathway.** *J Biol Chem*, 288(9):6552-60, 2013

Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, Fingleton B, Green-Jarvis B, Shyr Y, Matrisian LM, Carbone DP, Lin PC. **Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis.** *Cancer Cell*. 2004, 6(4):409-21, 2004

Zhou Z, Apte SS, Soininen R, Cao R, Baaklini GY, Rauser RW, Wang J, Cao Y, Tryggvason K. **Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(8):4052-7, 2000

Zucker S, Vacirca J. **Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer.** *Cancer Metastasis Rev*, 23:101-17, 2004

INDICE

	<i>Pag.</i>
1. INTRODUZIONE	
1.1 L'ANGIOGENESI TUMORALE	2
1.2 REGOLATORI DELL'ANGIOGENESI	5
1.2.1 Fattori di crescita e molecole di adesione	5
1.2.2 Enzimi proteolitici	10
1.3 TERAPIA ANTI-ANGIOGENICA	16
1.4 IL CARCINOMA MAMMARIO	18
2. OBIETTIVI	20
3. METODI	
3.1 COLTURE CELLULARI	23
3.2 CO-COLTURE MEDIANTE TRANWELL	23
3.2.1 Saggio di migrazione	24
3.2.2 Saggio di invasività	25
3.3 PREPARAZIONE DEI MEZZI CONDIZIONATI (MC)	25
3.4 CO-COLTURE 3D MEDIANTE MEZZI CONDIZIONATI	25
3.4.1 Saggio di proliferazione	26
3.4.2 Preparazione dei campioni proteici	26
3.4.3 Zimografia	27
3.4.4 Western-blot	27
3.4.5 Cinetica enzimatica	28
3.4.6 Analisi dell'espressione genica	28
<u>Estrazione dell'RNA</u>	29
<u>Trascrizione inversa</u>	30
<u>Real-time PCR</u>	31

4. RISULTATI	
4.1 Le cellule tumorali 8701BC e MDA-MB-231 stimolano la migrazione delle cellule endoteliali ECV304	33
4.2 Le cellule tumorali 8701BC e MDA-MB-231 incrementano l'invasività delle cellule endoteliali in matrici 3D di collagene	34
4.3 Le cellule tumorali 8701BC e MDA-MB-231 non influenzano la proliferazione delle cellule endoteliali in matrici 3D di collagene	35
4.4 Le linee di tumore mammario MDA-MB-231 e 8701BC incrementano i livelli di pro-MMP9 in cellule ECV304	36
4.5 Le linee di tumore mammario MDA-MB-231 e 8701BC inducono in cellule ECV304 un differente profilo di espressione proteica per alcuni fattori pro-angiogenici	39
4.6 Le cellule tumorali MDA-MB-231 stimolano l'attività enzimatica di DPP4 in cellule endoteliali	42
4.7 Le linee di tumore mammario MDA-MB-231 e 8701BC alterano in cellule ECV304 l'espressione genica di metallo- e serino-proteasi	43
4.8 Analisi in vivo del potere angiogenico dei mezzi condizionati tumorali	46
5. DISCUSSIONE	47
Bibliografia	52