



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN DERMATOLOGIA, ANATOMIA E
CHIRURGIA PLASTICA**

Tesi di Dottorato di Ricerca

**ATTIVITA' DELL'INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR
BINDING PROTEIN 3 SULLE CELLULE DI
MELANOMA: STUDIO PRECLINICO.**

Relatore

Chiar.^{mo} Prof. Stefano Calvieri

Dottoranda

Dott.^{ssa} Valeria Devirgiliis

***Anno Accademico 2009 – 2010
XXIII Ciclo***

INDICE

INTRODUZIONE	4
IL MELANOMA: EPIDEMIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO	4
TIPI DI MELANOMA	5
LIVELLO DI CLARK E SPESSORE DI BRESLOW	8
STADIAZIONE DEL MELANOMA	10
<i>Classificazione TNM</i>	11
<i>Stadi</i>	13
DIAGNOSI E TERAPIA DEL MELANOMA	15
<i>Terapia adiuvante del melanoma</i>	19
<i>Chemioterapia del melanoma</i>	20
<i>Biochemioterapia del melanoma</i>	24
FOLLOW UP DEL PAZIENTE AFFETTO DA MELANOMA	27
BIOLOGIA E GENETICA DEL MELANOMA	28
<i>Mutazioni germinali nel melanoma</i>	31
<i>Mutazioni somatiche del melanoma</i>	33
<i>Proliferazione cellulare</i>	33
<i>Segnali di sopravvivenza</i>	37
<i>Cooperazione tra le vie RAS-RAF-MAPK e PI3K/AKT</i>	40
<i>Alterazione di geni implicati nella differenziazione del melanocita</i>	40
<i>Invasione e adesione cellulare</i>	42
<i>Attivazione dei recettori per i fattori di crescita</i>	43
IL SISTEMA DEI FATTORI DI CRESCITA INSULINO-SIMILE	45
<i>I recettori degli IGFs e le vie di segnalazione</i>	47
<i>Le IGF-binding proteins</i>	53
<i>IGFBP-3</i>	57
<i>IGFBP3: un mediatore di apoptosi</i>	60
<i>Le proteasi che agiscono sulle IGFBPs</i>	61
<i>Il complesso ternario</i>	63
GLI IGF E IL CANCRO	64
<i>Ruolo dell'IGF2R nella tumorigenesi</i>	65
IGFBP-3 E MELANOMA	67
LE METALLOPROTEASI	70
<i>Collagenasi</i>	72
<i>Gelatinasi</i>	73
<i>Stromelisine</i>	73
<i>Matrilisine</i>	73
<i>MMP membrane type</i>	74
<i>Il gruppo delle "altre MMP"</i>	74
<i>Attivazione delle MMP</i>	75
<i>Attivazione "in vitro"</i>	75
<i>Attivazione "in vivo"</i>	76
<i>TIMP</i>	76
<i>Meccanismi molecolari dell'attività delle MMP</i>	77
<i>Rimodellamento della ECM</i>	77
<i>Degradazione di molecole di superficie</i>	78
<i>Regolazione di segnali paracrini</i>	79
LE METALLOPROTEASI E IL MELANOMA	81
MATERIALI E METODI	82
<i>Western blot</i>	84
<i>Elisa</i>	85
<i>RIA</i>	86
<i>Saggio per le proteasi di IGFBP-3</i>	86

<i>Zimografia</i>	87
<i>Colture cellulari</i>	88
<i>Scratch test</i>	89
<i>Trypan blue test</i>	90
<i>Test di invasività cellulare</i>	90
<i>Immunoistochimica</i>	91
<i>Analisi statistica</i>	92
RISULTATI	93
<i>Le concentrazioni di IGFBP-3 sono risultate significativamente inferiori nei pazienti affetti da melanoma al IV stadio sia quando misurate mediante WB che mediante ELISA</i>	93
<i>Le concentrazioni di IGF-1 e ALS non sono risultate correlabili alla progressione di malattia</i>	101
<i>La ridotta biodisponibilità di IGF-1 sierico è risultata correlata alla sopravvivenza dei pazienti.</i>	103
<i>La progressione di malattia nei pazienti si accompagna a una riduzione dei livelli sierici di IGFBP-3 misurati mediante WB.</i>	107
<i>L'espressione di IGFBP-3, valutata in immunoistochimica, è maggiore nei melanomi primitivi rispetto alle metastasi sia linfonodali che dermiche.</i>	109
<i>Nel siero dei pazienti al IV stadio di malattia la riduzione dei valori di IGFBP-3 è mediata da specifici processi proteolitici assenti nel siero dei pazienti in stadio dallo 0 al III.</i>	112
<i>Nel siero dei pazienti al IV stadio sono presenti metalloproteasi 1, 2, 7 e 9.</i>	114
<i>Le linee cellulari di melanoma producono metalloproteasi che degradano IGFBP-3.</i>	116
<i>La metalloproteasi 9 è espressa dalle cellule di melanoma primitivo.</i>	119
<i>L'aggiunta di IGFBP-3 ricombinante al terreno di cellule di melanoma in coltura (Me-501) riduce la motilità cellulare</i>	121
<i>L'aggiunta di IGFBP-3 ricombinante al terreno di cellule di melanoma in coltura (Me-501) riduce la capacità migratoria di tali cellule.</i>	125
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	127
BIBLIOGRAFIA	133

INTRODUZIONE

IL MELANOMA: EPIDEMIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO

Il melanoma è un tumore maligno che origina dal melanocita, ad alta aggressività e a rapida crescita cellulare. Negli ultimi 50 anni ha mostrato un'incidenza almeno raddoppiata e uno sviluppo maggiore di qualsiasi altro tumore maligno (1). Inoltre, nonostante i numerosi sforzi nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche, i pazienti affetti da malattia in stadio avanzato presentano comunque una prognosi infausta (2).

Il melanoma è all'ottavo posto tra i tumori maligni più frequenti nell'uomo, in particolare è il più frequente in giovani adulti di età compresa tra i 25 e i 29 anni. Questa neoplasia rappresenta il 2-3% dei tumori maligni nel Nord dell'Europa e negli Usa. Sebbene colpisca soggetti d'ogni età e sesso, il picco di incidenza è compreso tra i 35 ed i 50 anni. E' maggiore l'incidenza nelle donne e diversa è la sede primitiva di origine del tumore tra i due sessi: nelle donne, infatti, è rappresentata dagli arti inferiori, negli uomini dal tronco.

Secondo molti Autori, l'insorgenza del melanoma potrebbe essere messa in relazione al danno ossidativo indotto dall'esposizione ai raggi ultravioletti, in particolare se intensa ed intermittente e, soprattutto, alla sovraesposizione in età pediatrica, mentre l'esposizione cronica al sole sembra favorire l'insorgenza di carcinomi cutanei. Altri importanti fattori di rischio sono rappresentati dalle caratteristiche fenotipiche (carnagione chiara e capelli biondi o rossi, facilità alle

scottature solari e difficoltà ad abbronzarsi), le lentiggini solari, il numero ed il tipo di nevi (ricordiamo, ad esempio, che i nevi congeniti giganti e i nevi displastici comportano un rischio aumentato di sviluppare questa neoplasia), la storia familiare o personale di melanoma (3-5). La frequenza del melanoma familiare varia dal 5 al 10%.

TIPI DI MELANOMA

Il melanoma può insorgere da un nevo preesistente o da cute sana. Origina dai melanociti dello strato basale dell'epidermide e si sviluppa secondo due diverse modalità di crescita: radiale (od orizzontale) e verticale. Nella crescita radiale il tumore mostra una diffusione laterale, con minima penetrazione nel derma. La crescita verticale si può verificare primitivamente o può manifestarsi come un momento successivo ed evolutivo della forma radiale; questa seconda evenienza implica la progressione del tumore e la selezione di un clone nuovo, più aggressivo con diffusione nel derma e negli strati sottostanti. Questi due modelli non solo hanno conseguenze cliniche molto diverse, ma presuppongono l'esistenza di melanociti differenti sul piano biologico.

Vengono riconosciute 4 varianti anatomo-cliniche più frequenti di melanoma:

- 1) lentigo maligna melanoma; (Figura 1)
- 2) superficial spreading melanoma; (Figura 2)
- 3) melanoma acrale lentiginoso; (Figura 3)
- 4) melanoma nodulare. (Figura 4)

Figura 1: lentigo maligna melanoma



Figura 2: melanoma a diffusione superficiale



Figura 3: melanoma acrale lentiginoso



Figura 4: melanoma nodulare



LIVELLO DI CLARK E SPESSORE DI BRESLOW

Tra i parametri morfologici utili da un punto di vista prognostico ricordiamo il livello di Clark e lo spessore di Breslow. Al momento attuale il parametro prognostico maggiormente considerato e validato statisticamente è lo spessore di Breslow, cioè la profondità di invasione del melanoma misurato in millimetri. Successivamente, a questo indice è stato aggiunto il parametro dell'ulcerazione, anch'esso valutato istologicamente e inserito nella stadiazione del melanoma del 2002; infine, nell'ultima revisione della stadiazione da parte dell'AJCC del 2009 è stato introdotto un nuovo parametro istologico di grande rilievo quale il numero di mitosi, che verrà meglio chiarito successivamente.

Il livello di Clark comprende 5 sottogruppi:

- I livello: melanoma confinato all'epidermide sopra la membrana basale;
- II livello: melanoma che invade la parte superiore del derma papillare;
- III livello: melanoma che si estende a tutto il derma papillare;
- IV livello: melanoma che interessa il derma reticolare;
- V livello: melanoma che si espande oltre il derma reticolare interessando il tessuto sottocutaneo.

Lo spessore del melanoma viene valutato sulla base dei seguenti valori numerici:

- ≤ 1 mm
- tra 1,01 mm e 2 mm

- tra 2,01 mm e 4,00 mm
- ≥ 4 mm

Lo spessore si misura a partire dallo strato granuloso dell'epidermide, fino alla maggiore profondità d'invasione del tumore, come originariamente descritto da Breslow (6).

STADIAZIONE DEL MELANOMA

L'osservazione di casi con spessore di Breslow basso ma progressione di malattia fino all'exitus ha indotto una serie di revisioni degli indici prognostici al fine di individuare, ove possibile, parametri sempre più attendibili. In particolare, è stata sottolineata l'importanza del parametro ulcerazione istologicamente evidente nella lesione primitiva cutanea.

E' stato formalmente approvato dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC) un nuovo sistema di stadiazione del melanoma (2009). (7)

La corrente stadiazione non si discosta in modo sostanziale dalla precedente del 2002, introducendo come unica novità, la valutazione del numero di mitosi per definire la categoria T.

Pertanto i parametri considerati sono:

- 1) lo spessore del melanoma, la presenza di ulcerazione ed il numero di mitosi per mm^2 per definire la categoria T
- 2) il numero di linfonodi metastatici e la distinzione tra micrometastasi e macrometastasi per definire la categoria N
- 3) la sede delle metastasi a distanza e la presenza di elevati livelli sierici di lattico deidrogenasi (LDH) per definire la categoria M.

Classificazione TNM

T1	< 1 mm	A: senza ulcerazione B: ulcerato o con n° di mitosi per mm ² > 1
T2	1,01-2 mm	A: senza ulcerazione B: con ulcerazione
T3	2,01-4 mm	A: senza ulcerazione B: con ulcerazione
T4	> 4 mm	A: senza ulcerazione B: con ulcerazione
N1	1 linfonodo	A: con micrometastasi B: con macrometastasi
N2	2-3 linfonodi	A: con micrometastasi B: con macrometastasi C: con metastasi in transito/satelliti senza metastasi ai linfonodi
N3		4 o più linfonodi metastatici, linfonodi conglobati, o con metastasi in transito/satelliti con metastasi linfonodali
M1a		metastasi a distanza a livello di cute,

	tessuto sottocutaneo o linfonodi
	normali livelli sierici di LDH
M1b	metastasi polmonari
	normali livelli sierici di LDH
M1c	ogni altra sede di metastasi viscerale
	normali livelli sierici di LDH
	qualunque sede di metastasi a distanza
	elevati livelli sierici di LDH

Stadi

IA melanoma localizzato, di spessore inferiore ad 1 mm, senza ulcerazione né mitosi (T1a N0 M0)

IB melanoma localizzato, di spessore inferiore ad 1 mm, con ulcerazione o con numero di mitosi >1 per mm^2 (T1b N0 M0) oppure con spessore compreso tra 1.01-2.0 mm senza ulcerazione (T2a N0 M0)

IIA melanoma localizzato, di spessore compreso tra 1.01-2.0 mm, con ulcerazione (T2b N0 M0) oppure di spessore compreso tra 2.01-4.0 mm senza ulcerazione (T3a N0 M0)

IIB melanoma localizzato, di spessore compreso tra 2.01-4.0 mm, con ulcerazione (T3b N0 M0) oppure di spessore superiore a 4.0 mm senza ulcerazione (T4a N0 M0)

IIC melanoma localizzato, di spessore superiore a 4.0 mm, con ulcerazione (T4b N0 M0)

IIIA melanoma di qualunque spessore, non ulcerato, con metastasi microscopiche al massimo in tre linfonodi, senza metastasi a distanza (T1-4a N1a M0 ; T1-4a N2a M0)

IIIB melanoma di qualunque spessore, ulcerato, con metastasi microscopiche al massimo in tre linfonodi, senza metastasi a distanza (T1- 4b N1a M0; T1- 4b N2a M0) oppure melanoma di qualunque spessore, non ulcerato, con metastasi macroscopiche al massimo in tre linfonodi (T1-4a N1b M0 ; T1-4a N2b M0)

oppure melanoma di qualunque spessore, non ulcerato, con metastasi in transit o satelliti, senza evidenza di metastasi ai linfonodi o a distanza (T1-4a N2c M0)

IIIC melanoma di qualunque spessore, ulcerato e non, con metastasi in quattro o più linfonodi, oppure con metastasi in transit o satelliti con metastasi linfonodali, senza metastasi a distanza (ogni T N3 M0) oppure melanoma di qualunque spessore, ulcerato, con metastasi macroscopiche al massimo in 3 linfonodi senza metastasi a distanza (T1-4b N1b/ N2b M0) oppure melanoma di qualunque spessore, ulcerato, con metastasi in transit o satelliti senza metastasi linfonodali (T1-4b N2c M0)

IV melanoma con metastasi a distanza (ogni T ogni N M1); la categoria M viene suddivisa in tre sottogruppi (M1a, M1b, M1c) in base alla sede delle metastasi e ai livelli sierici di LDH; tuttavia dal momento che le differenze di sopravvivenza tra queste tre categorie sono scarse, non esiste alcun sottogruppo nell'ambito del IV stadio (8).

DIAGNOSI E TERAPIA DEL MELANOMA

L'individuazione del melanoma deve essere quanto più possibile precoce e deve basarsi sull'esame clinico, coadiuvato dall'esame dermatoscopico.

La dermatoscopia si avvale di uno strumento di osservazione (dermatoscopio) che combina ingrandimento della lesione in esame con l'eliminazione dell'interfaccia strato corneo/aria, fornendo importanti informazioni. Tuttavia, come il semplice esame clinico, presenta dei limiti e non offre le stesse possibilità dell'istologia, poiché si tratta di una tecnica basata sull'osservazione in trasparenza di piani orizzontali sovrapposti (dove un piano pigmentato nasconde gli altri) e su un'analisi di colore piuttosto che citologica.

La dermatoscopia resta, comunque, un'indagine di grande importanza, dal momento che fornisce un numero di informazioni maggiore rispetto a quelle ottenute con la sola osservazione clinica e offre dati spesso rassicuranti rispetto alla prima impressione circa una lesione pigmentaria. Inoltre, esiste uno stretto accordo tra i criteri classificativi della dermatoscopia e quelli istologici in un gran numero di lesioni cutanee.

Numerosi criteri dermoscopici e metodi semiquantitativi sono stati valutati per discriminare tra lesioni pigmentarie benigne e maligne, con l'obiettivo di porre diagnosi di melanoma sempre più precocemente. (9-17)

Infatti il melanoma si può considerare complessivamente non chemioresponsivo né radioresponsivo. La strategia terapeutica, pertanto, prevede di base il trattamento chirurgico, il più possibile tempestivo e radicale. Si procede, quindi,

all'allargamento della precedente cicatrice chirurgica, il quale dovrà essere condotto in modo che i margini di cute indenne siano sufficientemente ampi, ovviamente in base allo spessore della neoplasia (tabella 1).

Per i pazienti con malattia allo stadio IA (spessore <1 mm e assenza di fattori prognostici negativi), l'escissione chirurgica sembra essere sufficiente. Per i pazienti con malattia allo stadio IB-II, oltre all'exeresi è necessario effettuare anche l'esame del linfonodo sentinella. Si definisce linfonodo sentinella (LS), il linfonodo che per primo drena la linfa di un certo territorio cutaneo. La valutazione del linfonodo sentinella consentirebbe di predire con accuratezza se il melanoma abbia metastatizzato o no in quel bacino linfonodale, in quanto la diffusione metastatica ai linfonodi non sarebbe un evento casuale ma dovrebbe procedere in modo sequenziale, interessando dapprima il/i linfonodo/i sentinella e successivamente quelli a livello più alto. L'ipotesi è che, se il LS è indenne, anche gli altri linfonodi della stessa stazione lo siano; al contrario, se nel linfonodo sentinella sono presenti cellule metastatiche, esse dovrebbero essere presenti anche negli altri linfonodi della stessa stazione (18).

Questa tecnica è stata introdotta da Morton et al. nel 1992 (19).

L'exeresi chirurgica rappresenta una scelta fondamentale anche in caso di metastasi "in transit" o metastasi a distanza (cutanee, cerebrali e polmonari), ammesso che il numero delle lesioni la renda praticabile. La linfoadenectomia, invece, costituisce il provvedimento di scelta in caso di ripetizioni ai linfonodi regionali.

Un numero significativo di pazienti, però, nonostante un corretto e puntuale trattamento chirurgico, progredisce dallo stadio iniziale di malattia verso stadi più avanzati. La metastatizzazione può avvenire: per contiguità, per via linfatica (satellitosi, metastasi in transit, metastasi ai linfonodi locoregionali) e per via ematica. I siti più comunemente colpiti dalle metastasi sono: cute, sottocute, linfonodi (42-59%), polmoni (18-36%), fegato (14-20%), encefalo (12-20%), ossa (11-17%) e apparato digerente (1-7%) (20). Nelle fasi avanzate di malattia gli indici di sopravvivenza sono particolarmente deludenti: il melanoma, infatti, allo stadio IV (AJCC 2001) (8) presenta una sopravvivenza globale a 5 anni inferiore al 10 %, con tempo medio di sopravvivenza valutato intorno a 5-7 mesi (21).

Il melanoma metastatico è malattia sistemica e come tale il suo trattamento elettivo è quello medico per via generale. Purtroppo, attualmente, le percentuali di risposta completa e parziale, dopo trattamento medico, non superano il 40-50 %, con durata di risposta valutata intorno ai 10-12 mesi. Alcuni pazienti, però, presentano risposte complete di lunga durata (“long responders”) (22, 23). Pertanto, pur con tutte le limitazioni sopraesposte, la terapia medica del melanoma nelle fasi avanzate di malattia resta un’arma terapeutica importante da conoscere ed utilizzare.

Tabella 1:marginii di resezione correlati allo spessore di Breslow

Spessore di Breslow	Margini di resezione
in situ	0,5 cm
$\leq 1 \text{ mm} - 2 \text{ mm}$	1 cm
$> 2 \text{ mm}$	2 cm

Terapia adiuvante del melanoma

Come abbiamo già detto, il melanoma, soprattutto se al IV stadio, risponde alle varie terapie mediche in maniera sporadica e spesso temporanea. D'altra parte, un certo numero di pazienti con melanoma localizzato inizialmente solo alla cute svilupperà nel tempo metastasi. Tutto ciò ha indotto numerosi gruppi di ricerca a sviluppare protocolli di terapia adiuvante. Ricordiamo che la terapia adiuvante, in campo oncologico, è il trattamento medico preventivo che si somministra al paziente dopo l'intervento chirurgico di asportazione del tumore primitivo per impedire la diffusione delle cosiddette micrometastasi e la successiva comparsa di macrometastasi a distanza.

La terapia adiuvante del melanoma viene di regola utilizzata nei pazienti in stadio III di malattia (AJCC 2001) (8) con presenza di metastasi ai linfonodi locoregionali. Questi pazienti, anche dopo linfadenectomia locoregionale radicale, hanno, infatti, un alto rischio di ripresa di malattia, valutato >50 % entro i 3 anni. (21) Tra i trattamenti riportati in letteratura ricordiamo quello con interferon α -2b (IFN α -2b) ad alte dosi, (24-26) quello con dacarbazina (deticene, DTIC) ed interleuchina-2 (IL-2) (27), il cosiddetto vaccino di Morton. (28) ed il più recente con Ipilimumab, un anticorpo monoclonale anti-CTLA-4. (29) Tra questi schemi terapeutici, quello che si è dimostrato, ad oggi, di maggiore efficacia è rappresentato dall' interferone ad alte dosi che, infatti, è l'unico ad essere formalmente approvato negli USA dalla FDA (food and drug administration). Questa terapia ha mostrato una certa efficacia soprattutto per

quanto riguarda il tempo libero da malattia (disease free survival, DFS), mentre il miglioramento della sopravvivenza globale (overall survival, OS) è invece più dibattuto (30). Tuttavia questo trattamento è gravato da un'alta tossicità che ne limita, fortemente la tollerabilità per i pazienti e il mantenimento dei dosaggi prestabiliti. Per questo, particolarmente in Europa, si sono diffusi schemi di terapia con interferone a basse dosi (31)

La terapia adiuvante nei pazienti con melanoma viene in genere proposta in presenza di metastasi linfoghiandolari (stadio III AJCC 2009), ma dal momento che Alcuni Autori hanno sottolineato come anche i melanomi cutanei con spessore di Breslow intermedio (tra 1,5 e 4 mm) ed elevato (> 4 mm) in assenza di metastasi linfonodali, (8) presentano un rischio non trascurabile di progressione di malattia, la terapia adiuvante può essere proposta anche in questi casi, in particolare utilizzando interferone per via sottocutanea a basso dosaggio (32-36). Anche in questo caso si è osservato un miglioramento in particolare del DFS soprattutto negli studi più a lungo termine.

Chemioterapia del melanoma

Il primo approccio al trattamento medico del melanoma metastatico è stato quello monochemioterapico (37). Nel tempo una serie di farmaci antitumorali sono stati proposti e testati, inizialmente da soli e poi in combinazione tra loro e con altre sostanze, per valutarne la tossicità e l'efficacia nei pazienti con

melanoma in fase avanzata. Tra questi ricordiamo la dacarbazina, il cisplatino, le nitrosuree (carmustina, lomustina e fotemustina) e la temozolomide. Le percentuali di risposte complessive, sempre inferiori al 50 %, purtroppo non sono state soddisfacenti. Un discorso a parte merita la dacarbazina, considerata ancora da molti autori come il farmaco di riferimento per il trattamento medico del melanoma (38). Questo chemioterapico, alle dosi proposte di 800-1000 mg/m², in unica somministrazione mensile o in dosi refratte di 5 giorni al mese, è maneggevole e presenta scarsa tossicità (39). Nei vari trials eseguiti non ha, però, mostrato percentuali di risposta significative, anche se in singoli pazienti si sono osservate episodiche risposte complete protratte nel tempo (40). Un limite importante del farmaco è quello della scarsa capacità di aggredire le metastasi cerebrali, avendo difficoltà a superare la barriera ematoencefalica (41). Viceversa le nitrosuree (carmustina, lomustina, fotemustina), così come la temozolomide, riescono a superare la barriera ematoencefalica e sono pertanto elettivamente proposte per il trattamento del melanoma con metastasi cerebrali. Tra questi farmaci occorre sottolineare soprattutto l'efficacia terapeutica dimostrata in diversi trials dalla fotemustina (42).

Come ricordato, tutti i farmaci sopra menzionati hanno mostrato in monochemioterapia percentuali basse di risposte complessive, per cui una serie di schemi polichemioterapici sono stati proposti per migliorare la percentuale di risposta. Tra questi ricordiamo il BOLD, lo schema Dartmouth ed il CVD.

Il primo schema (BOLD) è un acronimo utilizzato per indicare i quattro farmaci di cui si compone: Bleomicina (somministrata i. m. al dosaggio di 15 U ai giorni I e IV), Vincristina (Oncovin, somministrata e. v. al dosaggio di $1\text{mg}/\text{m}^2$ ai giorni I e V), Lomustina (somministrata p. o. al dosaggio di $80\text{ mg}/\text{m}^2$ al giorno I) e Dacarbazina (somministrata e. v. al dosaggio di $200\text{ mg}/\text{m}^2$ dal giorno I al giorno V).

La durata del ciclo è di 5 giorni, ripetuti ogni 6 settimane. Un eventuale allungamento dell'intervallo tra cicli successivi potrebbe essere necessario a causa della leucopenia ritardata da nitrosuree (lomustina). Infatti le nitrosuree inducono una mielodepressione che inizia alla quarta settimana e può durare fino alla sesta. La polichemioterapia BOLD ha mostrato inizialmente dei risultati molto interessanti con risposte complessive superiori al 30%. In uno studio del 1980, condotto su 72 pazienti con melanoma metastatico, 7 hanno mostrato remissione completa (Complete Response, CR) di malattia (9%), 22 remissione parziale (Partial Response, PR) (31%), 12 stabilizzazione di malattia (Stable Disease, SD) (17%) e 31 progressione di malattia (Disease Progression, DP) (43%). Nei pazienti che hanno avuto CR, PR o SD l'OS medio è stato di 67 settimane, mentre in quelli che hanno avuto DP è stato di 20 settimane. Complessivamente l'OS medio dei 2 gruppi è stato di 31 settimane. Questi dati non sono stati successivamente confermati. In altri lavori si sono osservate risposte complessive intorno al 20% con OS medio di 6 mesi (circa 24-27 settimane) (43).

Anche presso il Dipartimento di Dermatologia dell'Università "Sapienza" di Roma lo schema terapeutico BOLD (associato a somministrazione di G-CSF tra un ciclo ed il successivo) è stato utilizzato su 8 pazienti affetti da melanoma metastatico (anche con metastasi cerebrali), con risultati molto incoraggianti: 3 (37.5%) degli otto pazienti hanno mostrato remissione completa di malattia, altri 3 pazienti hanno mostrato stabilizzazione di malattia e hanno quindi ricevuto ulteriori cicli di BOLD; solo 2 (25%) pazienti hanno interrotto il trattamento per evidente progressione di malattia (44).

Sulla base della dimostrata presenza di recettori per gli estrogeni sulla superficie delle cellule di melanoma è stata proposta negli anni '90 l'associazione polichemioterapia con ormonoterapia anti-estrogenica (Tamoxifene): si tratta dello schema Dartmouth, dal nome della Medical School (Hannover - New Hampshire - USA) dove è stato inizialmente sperimentato. Questo schema polichemioterapico consiste, infatti, nell'associazione tra dacarbazina, carmustina e cisplatino con tamoxifene. Il "Dartmouth regimen" si esegue somministrando dacarbazina 220 mg/m² e cisplatino 25 mg/m² (giorni 1-3), carmustina 150 mg/m² (giorno 1) a cicli alterni da effettuarsi ogni 6 settimane e tamoxifene 10 mg per os 2 volte/die ripetuto ogni 3 settimane (45). Anche in questo caso, dai primi risultati molto incoraggianti con risposte complessive intorno al 50%, si è passati, in studi successivi, a indici di risposta meno entusiasmanti e, anzi, alcuni autori hanno contestato la reale efficacia non solo

dell'associazione con anti-estrogeni, ma anche della vera superiorità rispetto alla dacarbazina da sola.

Lo schema polichemioterapico definito CVD, dalle iniziali dei tre farmaci che lo compongono (Vinblastina, somministrata al dosaggio di $1.6 \text{ mg/m}^2/\text{d}$ per 5 giorni, Dacarbazina al dosaggio di 800 mg/m^2 per via endovenosa, al giorno 1 e Cisplatino al dosaggio di $20 \text{ mg/m}^2/\text{d}$ per 4 giorni a partire dal giorno 2; i cicli vengono ripetuti ad intervalli di 3 settimane.), originariamente descritto da Legha SS et al, ha mostrato risultati sovrapponibili agli altri trattamenti. (46)

Altri schemi di polichemioterapia sono stati proposti ma nessuno ha mostrato risultati migliori (47).

Biochemioterapia del melanoma

Gli evidenti insuccessi purtroppo osservati con la chemioterapia hanno indotto i vari gruppi di ricerca ad indirizzare la loro attenzione verso la cosiddetta immunoterapia, o meglio, bioterapia. Il melanoma viene spesso indicato come un tumore associato ad immunodepressione anche se, in realtà, i diversi tentativi volti a dimostrare una precisa immunodeficienza nei pazienti con melanoma hanno fallito il loro obiettivo. Nonostante questo, la disponibilità di nuove molecole immunologicamente attive e di nuove procedure di “vaccinazione” ha spinto i diversi autori a verificare la loro efficacia nei pazienti con melanoma in fase avanzata (48). Tra le molecole più ampiamente utilizzate nei pazienti affetti da melanoma ricordiamo l'interferone e l'interleuchina 2 (49). Tra i vari tipi di

IFN sono stati utilizzati soprattutto gli α ricombinanti, in particolare gli α -2a e α -2b per lo più per via sottocutanea (50). L'IL-2 è stata somministrata soprattutto per via endovenosa o sottocutanea. Entrambi questi farmaci non hanno mostrato risposte complessive significative in monoterapia, per cui di regola vengono associati in schemi di biochemioterapia. Tra questi ricordiamo l'associazione DTIC + IFN e temozolomide + IFN (51), e l'associazione tra CVD ed IL-2 ed IFN (52)

L'IL-2 è stata associata al cisplatino e all'IFN- α nello schema di Khayat e somministrata per via endovenosa nei cicli di induzione e per via sottocutanea in quelli di mantenimento (53). La casistica ha riguardato 39 pazienti, 21 maschi e 18 femmine di età compresa tra 21 e 68 anni (media 44). I risultati sono stati interessanti, con risposte complessive del 53% (21/39): RC = 12,8% e RP = 41%. La durata della risposta è stata di 19 settimane (range 4+ - 59+) mentre la OS di 47 settimane (7 - 63+), circa 10 mesi. Questo schema di biochemioterapia era, però, gravato da elevata tossicità, in particolare per quanto riguarda la somministrazione per via endovenosa continuativa dell'IL-2 nei cicli di induzione. Perciò, un successivo schema di trattamento proposto da Bernengo *et al*, ha cercato di superare questo problema, proponendo la terapia con IL-2 sempre per via sottocutanea, anche nei cicli di induzione, mentre, per aumentare la percentuale di risposte, è stato aggiunto tamoxifene (TAM) (tabella 5) (54). La casistica ha compreso 36 pazienti, 20 maschi e 16 femmine di età compresa tra 23 e 70 anni (media 49). Si sono osservate risposte complessive in 17 su 36

pazienti ovvero nel 47,2 % dei casi: RC = 14% e RP = 33%. La durata della risposta è stata in media di 6,4 mesi (4+-59+) con OS medio di 10 mesi (7-63+). Anche il nostro gruppo ha trattato con questo schema 17 pazienti con melanoma metastatico e i risultati sono stati analoghi. I pazienti, 11 maschi e 6 femmine, di età compresa tra 20 e 70 anni (media 53), hanno presentato risposte complessive in 7 su 17 (41,1%). La durata di risposta è stata di 7 mesi (4+-53+) e l'OS di 10 mesi (2-23+).

Per quanto riguarda la cosiddetta immunoterapia con immunizzazione attiva molti gruppi di ricerca nel mondo hanno rivolto la loro attenzione alla preparazione di particolari “vaccini”, utilizzando le cellule dendritiche dell'ospite opportunamente modificate, o cellule tumorali estratte dal paziente, o frazioni antigeniche di melanoma. Tra le terapie vacciniche ricordiamo quella con cellule dendritiche del gruppo di Zurigo (55). Complessivamente i risultati sono stati deludenti e solo IL-2 e l'IFN hanno mantenuto una certa diffusione di utilizzazione in schemi associativi.

FOLLOW UP DEL PAZIENTE AFFETTO DA MELANOMA

Un regolare esame della cute è di estrema importanza nei pazienti con melanoma, dal momento che questi soggetti presentano un rischio elevato di sviluppare un secondo melanoma e questo accade, infatti, in percentuali variabili dall'1 all'8% circa dei pazienti.

Bisogna sottolineare, per questi pazienti, la necessità di evitare incongrue esposizioni solari; è necessario incoraggiare l'utilizzo appropriato di protezioni verso i raggi ultravioletti, attraverso l'uso di abiti adeguati, occhiali da sole, cappelli. Tutti i pazienti dovrebbero essere istruiti sull'importanza del controllo periodico di routine dal dermatologo.

I pazienti necessitano di uno stretto follow-up anche allo scopo di rilevare precocemente eventuali segni di ripresa di malattia: le direttive AJCC raccomandano di seguire il paziente per almeno 10 anni dalla data dell'asportazione chirurgica del melanoma, con frequenza variabile dei controlli che saranno più ravvicinati durante i primi cinque anni. Tuttavia, la frequenza dei controlli deve necessariamente variare anche in base ai fattori di rischio del paziente e all'eventuale presenza di alterazioni negli esami di controllo.

Gli accertamenti di controllo si basano in primo luogo sull'esame obiettivo, associato ad indagini di laboratorio e strumentali (differenti in base allo stadio di malattia) che ci aiutino a diagnosticare precocemente l'eventuale comparsa di metastasi.

BIOLOGIA E GENETICA DEL MELANOMA

Il ciclo cellulare è un processo geneticamente controllato, costituito da una serie di eventi coordinati e dipendenti tra loro, dai quali dipende la corretta proliferazione delle cellule eucariotiche. Gli eventi molecolari che controllano il ciclo cellulare sono ordinati e direzionali: ogni processo è la diretta conseguenza dell'evento precedente ed è la causa di quello successivo.

Affinché l'informazione genetica venga correttamente trasmessa dalla cellula madre alle cellule figlie, il genoma deve essere prima duplicato durante il periodo di tempo denominato fase S e in seguito i cromosomi devono venire segregati nelle due cellule figlie durante la fase M. La fase M è a sua volta composta da due processi, strettamente collegati: la mitosi, durante la quale i cromosomi della cellula sono divisi tra le due cellule figlie e la citodieresi, che comporta la divisione fisica del citoplasma della cellula. Esiste una fase chiamata G₀ in cui la cellula ferma il suo ciclo cellulare. Nel ciclo cellulare, sono presenti dei punti di controllo o checkpoints, localizzati a livello delle transizioni G₁/S e G₂/M. Infatti, tra le fasi S ed M ci sono normalmente due periodi di tempo detti "gap": G₁ fra la fine della mitosi e l'inizio della fase S e G₂ fra il termine della fase S e l'inizio della fase M.

Esistono regolatori molecolari del ciclo cellulare, quali cicline, chinasi ciclina-dipendenti (CDKs) e inibitori del ciclo cellulare.

Durante il ciclo cellulare, le cicline si legano ed attivano le rispettive chinasi ciclina-dipendenti, inducendo la fosforilazione e la secrezione delle proteine

bersaglio che stimolano la progressione del ciclo cellulare. Al contrario, gli inibitori del ciclo cellulare bloccano l'attività dei complessi ciclina-CDK e antagonizzano eventi quali la promozione della crescita e la fosforilazione: un'alterata regolazione del ciclo cellulare e delle sue componenti può comportare un'incontrollata proliferazione cellulare con conseguenze disastrose, come accade nelle neoplasie. Queste alterazioni nel controllo del ciclo cellulare rappresentano uno dei meccanismi chiave alla base dell'oncogenesi del melanoma. Il melanoma rappresenta una patologia complessa, nella quale intervengono presumibilmente sia mutazioni genetiche germinali che somatiche.

(Figura 5)

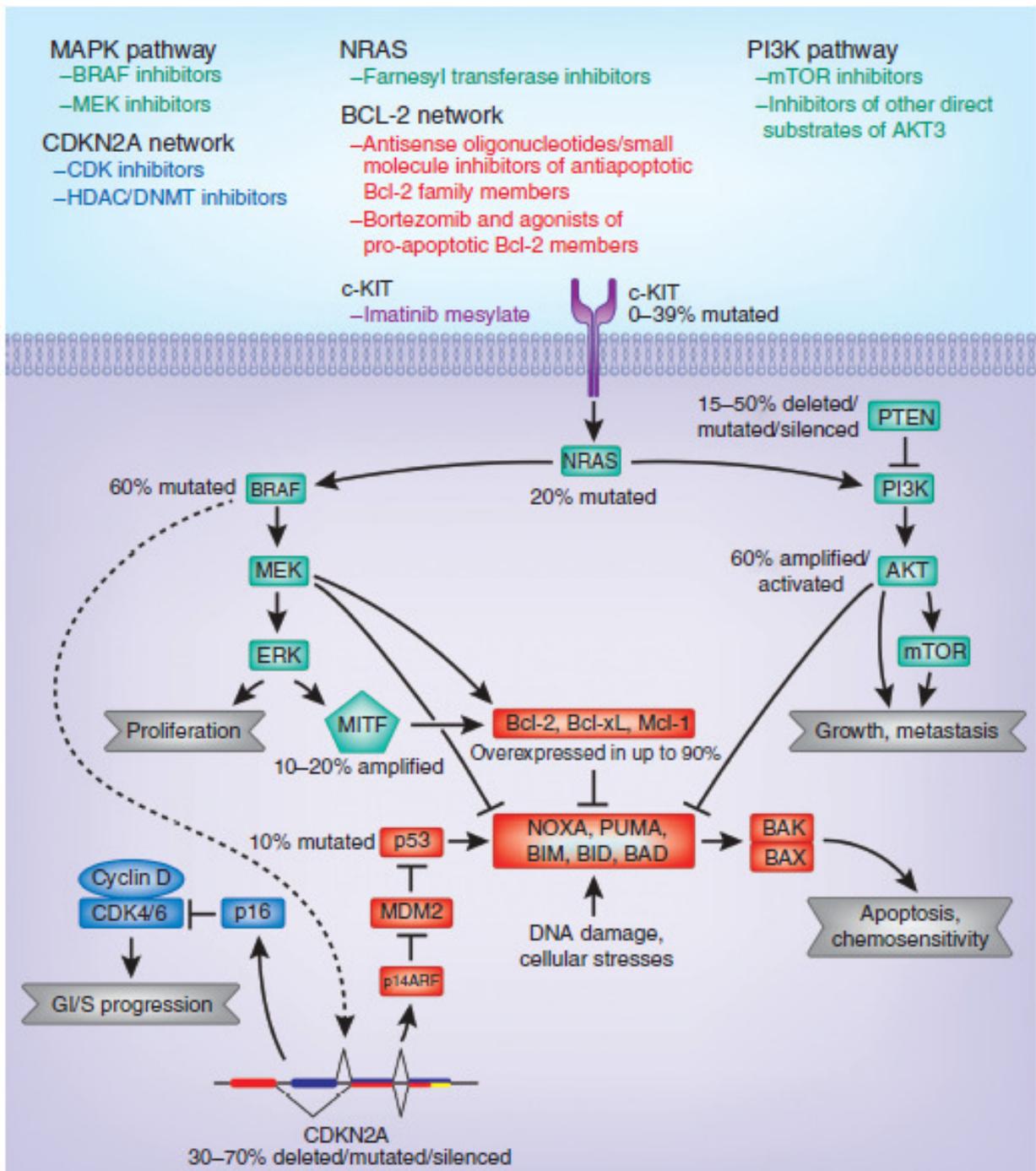


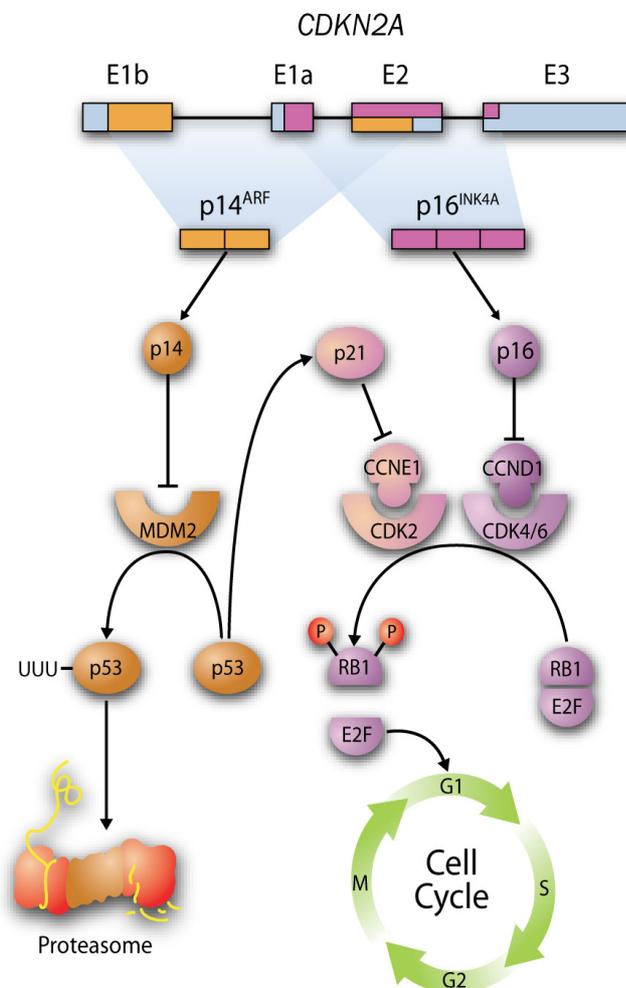
Figura 5 : vie di segnale e mutazioni (germinali e somatiche) coinvolte nel melanoma

Mutazioni germinali nel melanoma

Nel melanoma familiare sono state riscontrate con elevata frequenza alterazioni del locus CDKN2A (Figura 6), localizzato sul cromosoma 9p21 (56-58), il quale, a sua volta, controlla le proteine RB1 (retinoblastoma 1) e p53. Il locus CDKN2A presenta una struttura inusuale, poiché codifica per 2 proteine sovrapponibili ma ben distinte: p16^{INK4A} e p14^{ARF}; questo grazie all'utilizzo alternativo di due diversi esoni, che sono l'esone E1a per la proteina p16^{INK4A} e l'esone E1b per p14^{ARF} (59). Sebbene siano strutturalmente molto diverse, entrambe le proteine agiscono come regolatori negativi del ciclo cellulare: la p16^{INK4A} inibisce l'attivazione di CDK4 e CDK6 da parte della ciclina D1 (CCND1), prevenendo, in questo modo, la successiva fosforilazione di RB1; quest'ultimo, non fosforilato, sequestra il fattore di trascrizione E2F impedendogli, così, di indurre la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S. L'assenza di una proteina p16^{INK4A} funzionante, invece, comporta una iperfosforilazione di RB1, con conseguente rilascio di E2F e mancata inibizione della progressione del ciclo cellulare. La proteina p14^{ARF} regola l'attività della proteina p53 tramite l'inibizione di MDM2 ("murine double minute 2 protein"), una ubiquitin-ligasi in grado di avviare la proteina p53 alla degradazione attraverso proteosomi; livelli elevati di p14^{ARF} stabilizzano la p53, permettendo l'induzione della proteina p21^{WAF1/CIP1}, un inibitore del ciclo cellulare che blocca la fosforilazione di RB1 mediata dal complesso CDK2/ciclina E (CCNE1). In assenza di una p14^{ARF} funzionante, si verifica

un'incontrollata ubiquitinazione e degradazione di p53, il che comporta l'inibizione dell'induzione della proteina p21^{WAF1/CIP1}, la conseguente iperfosforilazione di RB1 ed, in ultima analisi, la progressione del ciclo cellulare. Un'altra mutazione riscontrata con minor frequenza nei melanomi familiari riguarda il CDK4, localizzato sul cromosoma 12q14 (60-63).

Figura 6: Il locus CDKN2A ed il controllo del ciclo cellulare



Sekulic A et al for the melanoma study group of the Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. Mayo Clin Proc. 2008;83(7):825-846

Mutazioni somatiche del melanoma

Le principali vie di segnale implicate nell'oncogenesi del melanoma cominciano attualmente ad essere chiarite. Gli eventi fondamentali nello sviluppo e nella progressione del melanoma possono essere suddivisi nelle seguenti categorie: proliferazione cellulare, segnali di sopravvivenza, cooperazione tra le vie RAS-RAF-MAPK e PI3K/AKT, alterazione di geni implicati nella differenziazione del melanocita, invasione ed adesione cellulare e attivazione dei recettori dei fattori di crescita.

Proliferazione cellulare

La via di trasduzione del segnale MAPK (mitogen-activated protein kinase), altresì nota come via RAS/RAF/MEK/MAPK (figura 7), riveste un ruolo chiave nella proliferazione di molte neoplasie, incluso il melanoma (64).

La cascata è iniziata dalla stimolazione, attraverso vari fattori di crescita, di recettori tirosin-chinasici di membrana; la stimolazione dei recettori attiva RAS, una proteina esistente in tre isoforme (HRAS, KRAS e NRAS). In seguito all'attivazione di quest'ultima, si forma un complesso tra RAS stessa e una delle isoforme della serin-treonin-protein chinasi RAF: ARAF, BRAF e CRAF; la formazione di questo complesso determina l'attivazione di RAF; a questo punto, il segnale è trasdotto attraverso la fosforilazione di MEK (MAPK/ERK chinasi, anche nota come MAP2K), una serin/treonin chinasi presente in due isoforme (MEK1 e MEK2). La fosforilazione stimola l'attività chinasica di MEK, che a

sua volta fosforila le isoforme di MAPK (anche nota come ERK), MAPK3 (anche chiamata ERK1) e MAPK1 (nota anche come ERK2) (59).

Una volta attivate, MAPK3 e MAPK1 inducono una serie di processi, inclusa la proliferazione cellulare e la protezione dall'apoptosi.

In caso di melanociti normali e nevi benigni, l'attivazione di queste vie è finemente regolata e, in assenza di ulteriori modificazioni oncogeniche, tipicamente conduce alla senescenza cellulare (65, 66).

Diverse alterazioni nella via MAPK, che ne determinano l'iperfosforilazione, rappresentano la base per la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule di melanoma in oltre il 90% dei casi (67).

Le più frequenti alterazioni che conducono all'iperattivazione di tale via sono le mutazioni di BRAF, che ne determinano l'attivazione costitutiva.

Fino al 70% dei melanomi è caratterizzato da mutazioni di BRAF, mentre non si osservano mutazioni di ARAF e CRAF (68).

Nei nevi benigni BRAF è frequentemente mutato ma queste lesioni pigmentate raramente evolvono verso la malignità, suggerendo la necessità di ulteriori insulti genetici per la trasformazione maligna.

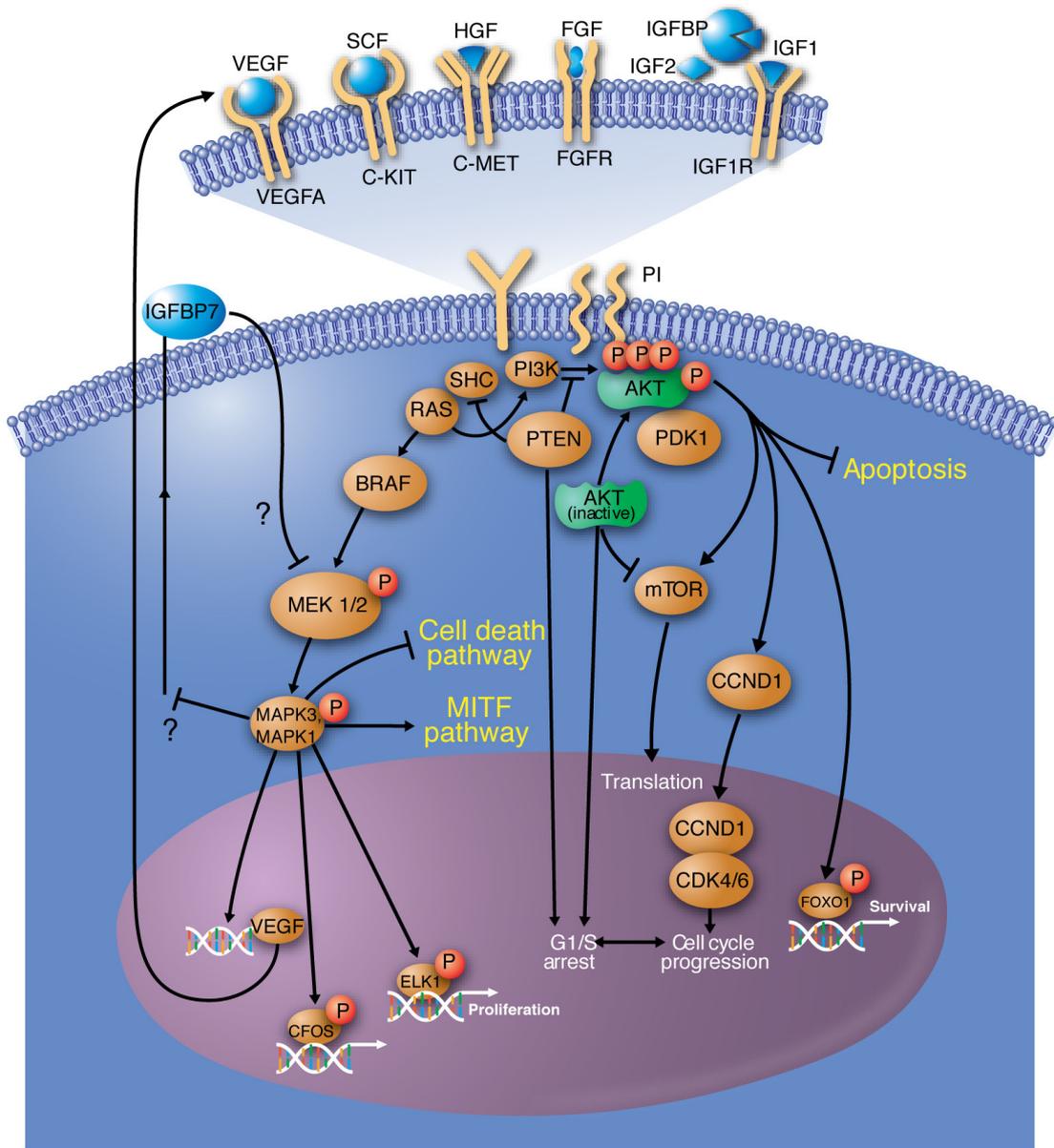
Sia nel melanoma che nei nevi la più frequente mutazione di BRAF consiste nella sostituzione di una valina con un glutammato in posizione 600 (V600E).

BRAF mutato è essenziale per la crescita del melanoma e stimola la proliferazione e la sopravvivenza MAPK-mediate (69).

Mutazioni sono anche frequenti in NRAS, che giustifica dal 15% al 30% dei casi di melanoma, mentre le mutazioni delle altre forme di RAS sono rare (68, 70-72).

Come le mutazioni attivanti di BRAF, NRAS mutato causa l'attivazione costitutiva della via MAPK. In assenza di inibitori del ciclo cellulare, come la proteina p16^{INK4A}, RAS può indurre la proliferazione del melanoma e giocherebbe un ruolo di primo piano nella sopravvivenza della neoplasia (70, 73).

Figura 7: Le vie MAPK e PI3K/AKT



Sekulic A et al for the melanoma study group of the Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. Mayo Clin Proc. 2008;83(7):825-846

Segnali di sopravvivenza

L'apoptosi rappresenta un processo fisiologico chiave nel mantenimento dell'omeostasi e della crescita tissutale. Due vie principali, quella intrinseca e quella estrinseca, convergono in più punti verso il risultato finale, rappresentato dall'apoptosi stessa (figura 8). Entrambe le vie sono influenzate da segnali di sopravvivenza aberranti, che sembrano essere implicati nella resistenza del melanoma alle terapie antitumorali standard (74-76).

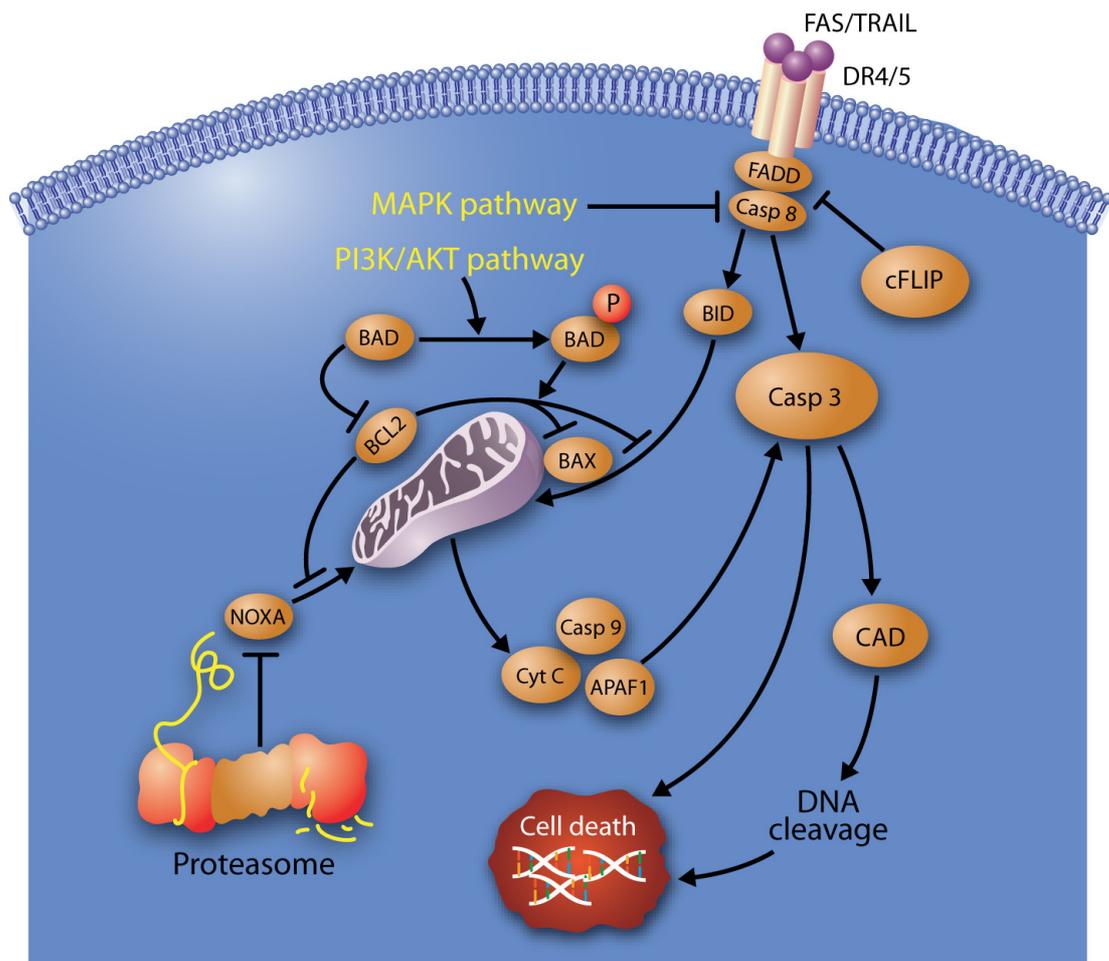
La via estrinseca è attivata dal legame di FAS o TRAIL ligando ai rispettivi recettori (DR4 o DR5); questo stimola a sua volta il reclutamento di FADD e l'attivazione della caspasi 8, che è regolata da cFLIP (noto anche come CFLAR) e da fattori di crescita attraverso la via MAPK. L'attivazione della caspasi 8 comporta il clivaggio della caspasi 3, che inizia processi proapoptotici multipli, inclusa la stimolazione del clivaggio del DNA (59).

Attraverso la via intrinseca, invece, l'attivazione di AKT stimola la fosforilazione di BAD, che consente a BCL2 di esercitare i suoi effetti antiapoptotici bloccando le proteine proapoptotiche NOXA e BAX.

Tuttavia, BAD defosforilato blocca BCL2 tramite eterodimerizzazione (BAD/BCL2), il che consente alle proteine proapoptotiche di formare dei pori nei mitocondri. Questo processo rilascia fattori apoptotici dallo spazio intermembranario mitocondriale, inclusi citocromo C (Cyt C), APAF1 e caspasi

9. Questi fattori formano il cosiddetto “apoptosoma”, che stimola l’apoptosi attraverso il clivaggio della caspasi 3 (59).

Figura 8: Vie di apoptosi



Sekulic A et al for the melanoma study group of the Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. Mayo Clin Proc. 2008;83(7):825-846

Nel melanoma, i segnali di sopravvivenza che si realizzano attraverso PI3K/AKT antagonizzano la via intrinseca dell'apoptosi (77). Attraverso le interazioni con i recettori attivati dei fattori di crescita, PI3K catalizza la produzione di fosfatidilinositolotrifosfato (PIP3) attraverso la fosforilazione di fosfatidilinositolo (PI), fosfatidilinositolo fosfato (PIP), e fosfatidilinositolo difosfato (PIP2) (78). Questo processo è antagonizzato dalla fosfatasi PTEN, che rimuove i gruppi fosfato.

Con la produzione di PIP3, AKT è trasferito alla membrana cellulare, dove è attivato da PDK1 (noto anche come PDK1); l'attivazione risultante di AKT prolunga la sopravvivenza cellulare attraverso l'inattivazione di BAD e l'attivazione del fattore di trascrizione FOXO1 (anche noto come FKHR), che comporta la sintesi di proteine antiapoptotiche (77, 79).

L'inattivazione di PTEN, che comporta un aumento dell'attività di AKT, sarebbe implicata in oltre il 20% dei melanomi al IV stadio (80).

Per quanto riguarda la via estrinseca, l'espressione dei recettori TRAIL-R1 e TRAIL-R2 (rispettivamente DR4 e DR5) potrebbe avere un ruolo nella progressione del melanoma metastatico. Sia DR4 che DR5 sono ridotti nel melanoma metastatico rispetto al melanoma primitivo e ai nevi. (81)

Cooperazione tra le vie RAS-RAF-MAPK e PI3K/AKT

La via RAS/RAF/MAPK non è esclusivamente proliferativa e la via PI3K/AKT non è completamente antiapoptotica. Nel melanoma, l'interazione tra queste due vie promuove tumorigenesi, crescita, chemio-resistenza, invasione, migrazione e disregolazione del ciclo cellulare.

Oltre a regolare l'attività di PI3K, la proteina PTEN gioca un ruolo fondamentale nella modulazione della via MAPK e nel blocco della progressione cellulare in G1/S attraverso l'overespressione dell'inibitore CDK, p27^{KIP1} (noto anche come CDKN1B) (79).

RAS può anche legare e attivare PI3K, aumentando l'attività di AKT. Questi dati suggeriscono che le mutazioni di PTEN e RAS sono ridondanti. Infatti, la presenza contemporanea di mutazioni a carico sia di PTEN che di NRAS nelle stesse linee cellulari è rara (82).

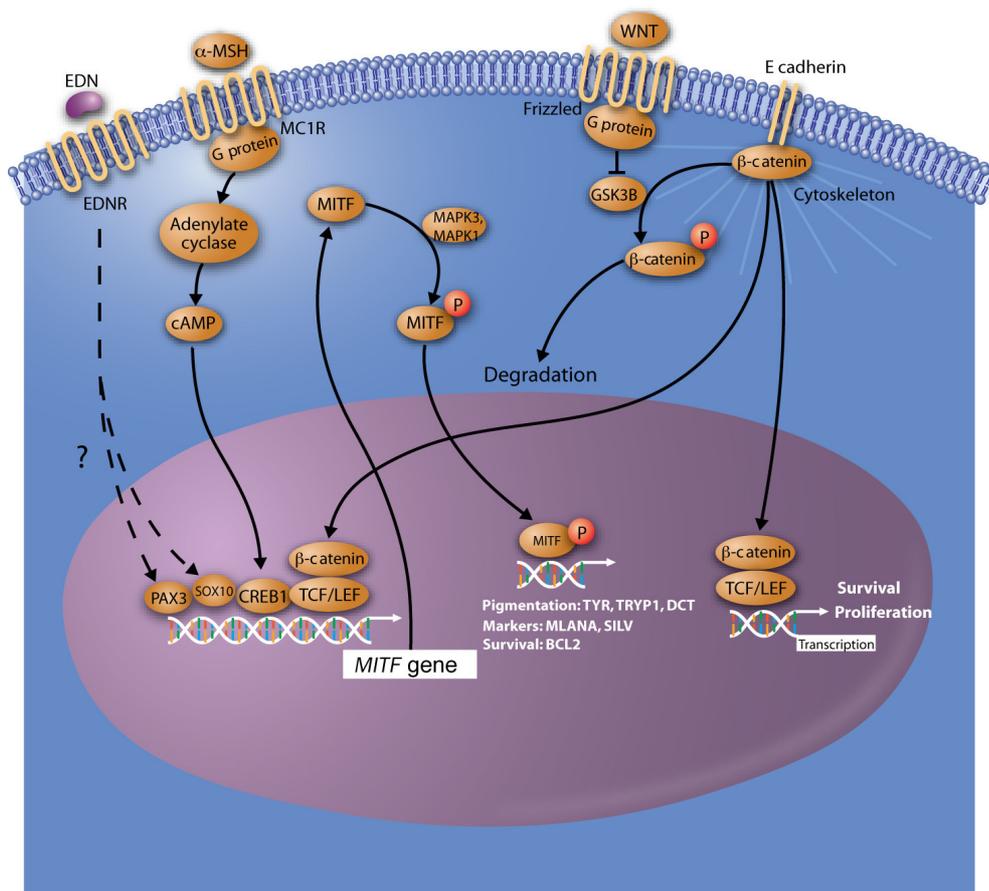
Alterazione di geni implicati nella differenziazione del melanocita

Uno tra i geni più importanti implicati nella differenziazione delle cellule melanocitarie è il MITF (83, 84).

La trascrizione di MITF è regolata da numerosi promotori, quali CREB1 e β catenina (Figura 9). Il primo viene attivato a seguito della cascata di segnali avviata dal legame di α -MSH al proprio recettore; il secondo, invece, viene sovraespresso nelle cellule melanocitarie quando la sua via fisiologica di

degradazione (tramite fosforilazione) viene inibita da eventi mutazionali (59). La proteina MITF fosforilata è maggiormente attiva come fattore trascrizionale; fisiologicamente, agisce da promotore per numerose proteine proprie del melanocita, quali tirosinasi, Melan-A, MART-1 e HMB-45 (85), ma anche per proteine pro-apoptotiche come BCL-2 (86). La fosforilazione di MITF è fisiologicamente controllata dalla via MAPK che, come già detto, è iperattivata nelle cellule di melanoma (59).

Figura 9: La via di MITF



Sekulic A et al for the melanoma study group of the Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. Mayo Clin Proc. 2008;83(7):825-846

Invasione e adesione cellulare

La morbilità e mortalità del melanoma sono una diretta conseguenza dell'invasione locale e della diffusione metastatica. Nei melanociti, le caderine di superficie sono state ben studiate come diretti mediatori di adesione cellulare e come componenti delle vie di segnale che influenzano la differenziazione (59).

Il dominio extracellulare delle caderine si lega ad altre caderine presenti sulla superficie di altri tipi cellulari e le alterazioni nell'espressione delle caderine influenzano l'interazione delle cellule con l'ambiente circostante. In particolare, l'espressione delle E-caderine nei melanociti media la loro associazione con i cheratinociti, prevenendo la proliferazione dei melanociti stessi e mantenendo la differenziazione melanocitaria attraverso diversi segnali (87).

La progressione dalla fase di crescita radiale a quella di crescita verticale del melanoma è caratterizzata dalla perdita di E-caderine, con conseguente rottura dell'interazione melanocita-cheratinocita e aumento dell'espressione delle N-caderine; una riduzione dell'espressione delle E-caderine aumenta la disponibilità intracellulare della β -catenina che, a sua volta, incrementa l'espressione di geni come MITF (88-90).

Attivazione dei recettori per i fattori di crescita

La trasduzione del segnale attraverso le vie RAS/RAF/MEK/MAPK e PI3K/AKT è innescata attraverso l'attivazione dei recettori dei fattori di crescita stimolati dai rispettivi ligandi. Sebbene fisiologicamente altamente regolate, queste proteine possono essere disregolate da diversi meccanismi nel melanoma. La stimolazione di fattori come C-MET (anche noto come MET), recettore per il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) e, soprattutto, l'IGF1 sono meccanismi importanti attraverso cui entrambe le vie (RAS/RAF/MEK/MAPK e PI3K/AKT) possono essere attivate senza mutazioni di RAS o RAF (59).

Sebbene il ruolo di insuline-like growth factor receptor 1 (IGF1R) e dei suoi ligandi sia ancora oggetto di studio, sono recentemente emersi dati interessanti; ad esempio, nei melanociti, IGF1 è fondamentale per la crescita delle cellule sia nei nevi che nel melanoma allo stadio iniziale. Inoltre, IGF1 e IGF1R sono espressi da tutte le cellule melanocitarie.

La perdita di espressione di IGF1R, utilizzando small interfering RNA, conduce all'apoptosi delle cellule di melanoma, sia wild type che con mutazioni di RAS o RAF (91).

La tabella 2 riassume le principali mutazioni genetiche nel melanoma cutaneo.

Tabella 2: Mutazioni genetiche nel melanoma cutaneo

Gene	Mechanism	Frequency	Reference(s)
<i>NRAS</i>	Activating mutation; Q61R most common mutation	56% in congenital nevi 33% in primaries 26% in metastases	71, 72
<i>BRAF</i>	Constitutive activation; V600E most common mutation	66% in melanomas 82% in benign nevi	95, 188
<i>PTEN</i>	Inactivation by deletion, mutation	30–40% in cell lines 10% in primaries	105, 140
<i>p16^{INK4A}</i>	Inactivation by mutation, deletion, promoter methylation	30–70% in melanomas	18
<i>APAF1</i>	Inactivation by loss of heterozygosity; also by methylation	42% in melanomas	189
<i>MITF</i>	Gene amplification	11% in primaries 15% in metastases	58
<i>BCL-2</i>	Gene amplification	>90% of melanomas	63
<i>cKIT</i>	Activating mutations; gene amplification	28% melanomas on sun-damaged skin 0–18% in benign nevi	169
<i>TP53</i>	Mutation or deletion	1–5% in primaries 11–25% in metastases	128, 129
<i>AKT3</i>	Activation	43–67% in sporadic melanomas 4% in benign nevi	190
<i>mTOR</i>	Activation	73% in melanomas: 77% in situ melanomas 67% invasive melanomas 75% metastases	152

Abbreviations: BCL-2, B cell lymphoma-2; MITF, microphthalmia transcription factor; mTOR, mammalian target of rapamycin; PTEN, phosphatase and tensin homolog; TP53, tumor protein 53.

Nageatte Ibrahim and Frank G. Haluska. Molecular Pathogenesis of Cutaneous Melanocytic Neoplasms Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2009. 4:551–79

IL SISTEMA DEI FATTORI DI CRESCITA INSULINO-SIMILE

Il sistema dei fattori di crescita insulino-simile (IGFs, Insulin-like Growth Factors) riveste un ruolo particolarmente significativo nella crescita e nella funzionalità di molti tipi cellulari.

Gli studi condotti con topi *knockout* (KO), in cui sono stati disattivati selettivamente alcuni geni specifici (IGF, IGFR, BP) confermano l'importante ruolo di questi fattori nella crescita, nella differenziazione e nella sopravvivenza cellulare (92-93).

Gli IGFs esistono in tre isoforme: IGF-1 e IGF-2, caratterizzate in dettaglio, con il 62% di omologia, e IGF-3, meno conosciuta.

IGF-1 è un peptide di 70 amminoacidi (765 kDa) importante per la normale crescita durante la vita postnatale, nonché per lo sviluppo e la differenziazione di molti organi e sistemi (94).

IGF-2 è un peptide di 67 amminoacidi (747 kDa) che riveste un ruolo particolarmente significativo nello sviluppo ed è espresso in elevate quantità nei tessuti fetali (95-98); alcuni studi suggeriscono che IGF-2 potrebbe controllare la crescita fetale regolando la sintesi di glicogeno, giocando, così, un ruolo di primo piano nel passaggio dalla vita fetale a quella postnatale.

Nel sistema degli IGFs rientrano, inoltre, altri fattori: due recettori cellulari di membrana, IGF1R e IGF2R, nonché 7 proteine di legame, le IGF binding proteins 1-7 (IGFBP 1-7) (99). Studi recenti hanno, inoltre, aggiunto nuovi membri alla famiglia degli IGF: il recettore correlato al recettore per l'insulina

(insulin-receptor-related receptor, IRR), varie proteine correlate alle IGFBPs (IGFBP-rP) e diverse proteasi di IGFBP (94).

Le localizzazioni geniche di IGF-1 e IGF-2 si trovano rispettivamente sul cromosoma 12 e 11, 1.4 kb a valle del gene dell'insulina. Il gene di IGF-1 ha due promotori, mentre IGF-2 ne ha quattro (P1-P4) (100). L'utilizzo alternativo dei promotori e lo splicing della regione in 5' non tradotta che origina esoni comuni codificanti determina la produzione di trascritti comuni. Sono stati descritti numerosi elementi cis (siti di legame al DNA per i fattori transregolatori) e fattori trascrizionali (TF) che regolano il promotore P3. Nel segmento prossimale al promotore P3 sono presenti elementi cis e potenziali TF coinvolti nella regolazione dell'attività dello stesso (101). La trascrizione di IGF-2 ha inizio dal promotore P1 nel tessuto adulto, mentre nel tessuto fetale comincia dai promotori P3-P4 e incrementa nei tessuti neoplastici.

Una volta prodotti, gli IGFs vengono liberati in circolo, dove si legano alle IGFBPs, le quali ne modulano l'attività: solo l'1-2% degli IGFs circola in forma libera, mentre approssimativamente il 20% è legato alle proteine IGFBP-1, IGFBP-2 o IGFBP-4, che li trasportano ai loro target cellulari. L'80% è associato a IGFBP-3, che risulta glicosilata nella porzione N-terminale (102), e previene l'azione dei recettori per IGF nell'indirizzare la cellula verso la proliferazione e sopravvivenza (103).

Le funzioni biologiche degli IGFs si svolgono sia con meccanismo autocrino che paracrino/endocrino a seconda che i tessuti bersaglio siano gli stessi che le

producono (autocrino) o siano tessuti differenti (paracrino se gli IGFs raggiungono tali tessuti attraverso il liquido extracellulare, endocrino se li raggiungono tramite trasporto ematico) (101).

La maggior parte dei tessuti adulti non esprime IGF-2 e la forma prevalente in circolo durante l'età adulta è rappresentata da IGF-1 (104): l'IGF-1 circolante e la sua principale proteina di trasporto, l'IGFBP-3, sono significativamente correlati alla secrezione di ormone somatotropo (GH) (105) e vengono utilizzati anche come marker dello stato del GH in caso di anomalie della crescita (106-108).

I recettori degli IGFs e le vie di segnalazione

Gli IGFs svolgono la propria azione legandosi a specifici recettori della superficie cellulare. Sono noti 3 recettori diversi: IGF1R, IGF2R e il recettore dell'insulina (IR). IGF1R è il recettore che media maggiormente l'effetto degli IGFs (109).

Sia IGF1R che IGF2R sono glicoproteine localizzate sulla membrana. La prima è espressa in molti tessuti eccetto quelli che rispondono all'azione dell'insulina, come tessuto adiposo e fegato, ed è un tetramero costituito da due subunità α e due subunità β . La subunità α contiene una porzione extracellulare che permette l'interazione con il ligando, mentre la subunità β presenta un dominio di membrana e un dominio intracellulare catalitico. A causa dell'elevata analogia strutturale metà IGF1R (α - β) si associa a metà IR (α - β) per formare un recettore ibrido ($\alpha_2\beta_2$). IGF1R presenta un'elevata affinità per IGF-1 e IGF-2.

IGF2R è un monomero costituito da una singola catena polipeptidica con un'unità extracellulare ripetitiva (109), molto simile, dal punto di vista strutturale, al recettore del mannosio 6-fosfato (110).

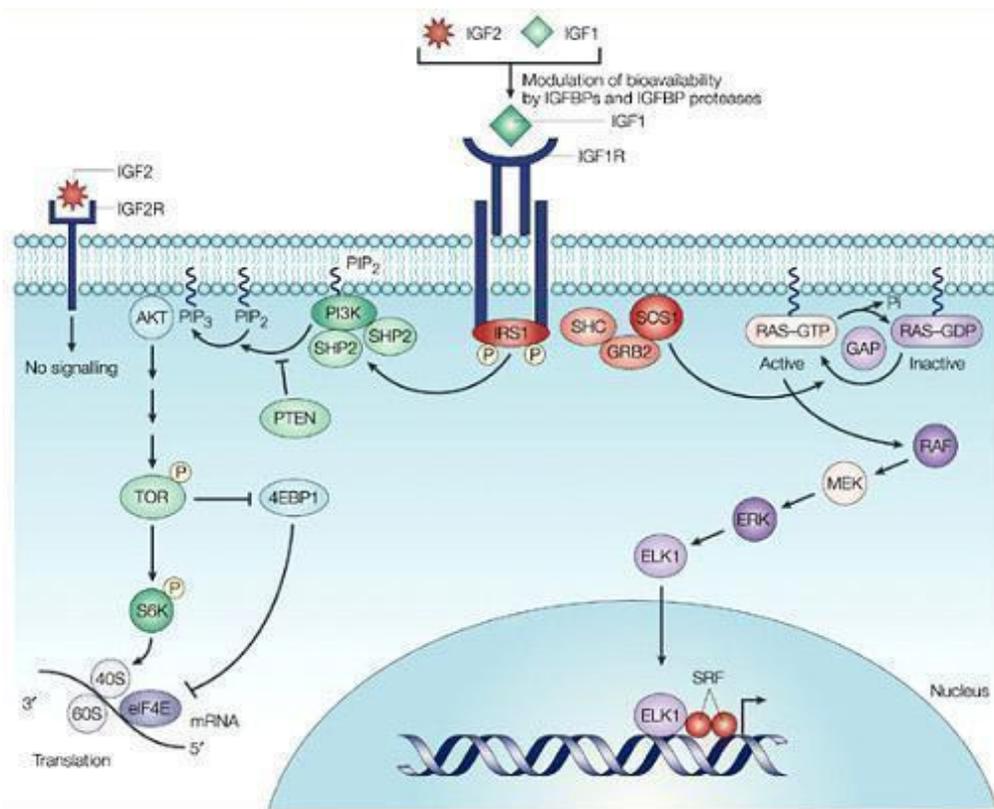
IGF2R lega con maggiore affinità IGF-2 rispetto a IGF-1; lega anche proteine contenenti il mannosio-6 fosfato, mentre non ha alcuna affinità per l'insulina. Questo recettore è associato con l'internalizzazione e la degradazione lisosomiale dei ligandi (109). I domini tirosin-chinasici dell'IGF1R e dell'IR mostrano omologia di sequenza più elevata se paragonata a quella che si osserva nella regione ricca di cisteina della subunità α e nel dominio C-terminale. Le differenze presenti in α determinano l'affinità dell'IGF1R e dell'IR per l'IGF o per l'insulina, mentre quelle nella subunità β determinano una divergenza delle vie di segnalazione, che culminano negli effetti mitogeni ed antiapoptotici, tramite l'IGF1R, ed in quelli metabolici tramite l'IR.

L'espressione di IGF-1R è regolata dagli ormoni steroidei e dai fattori di crescita. Inoltre, questa può essere controllata negativamente dalle IGFs, inibita dai soppressori tumorali, quali la proteina p53 e WT1 (la proteina del tumore di Wilms). I meccanismi molecolari che permettono l'espressione di IGF2R non sono ben noti, sebbene alcuni studi sostengano l'ipotesi di una regolazione positiva da parte dell'insulina e degli IGFs (100).

Il legame degli IGFs al recettore IGF1R può attivare diverse vie di trasduzione del segnale, tra le quali due sono le meglio caratterizzate (Figura 10). Un percorso attiva le proteine Ras, Raf e la proteina chinasi mitogena, raggiungendo

il nucleo cellulare dove viene stimolata la trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare (101).

Figura 10: attivazione Ras, Raf e protein chinasi mitogena (Nat Rev Cancer, 2004)



Un altro percorso è mediato dall'attivazione della fosfoinositolo-3-chinasi che attraverso le chinasi AKT e TOR porta alla stimolazione della sintesi proteica, con effetti mitogenici e antiapoptotici (163). Al contrario, il legame di IGF-2 al recettore IGF2R non produce eventi di signaling, ma induce la degradazione di IGF-2 stesso, riducendone così la funzionalità. Per tale ragione, IGF2R è considerato un soppressore tumorale (100).

Il ruolo di IGF1R nella trasformazione maligna è ben documentato ed è stato recentemente ridiscusso da diversi Autori (111).

L'IGF1R è overespresso in diverse linee cellulari tumorali (112-114): un disordine a carico del gene per IGF1R, che sopprime l'espressione di IGF1R e ne inibisce, così, le funzioni, può abolire la trasformazione cellulare (115); infatti, le linee cellulari di fibroblasti derivanti da embrioni di topo in cui il gene per IGF1R è danneggiato, non possono essere trasformate da oncogeni. (116-118)

La capacità di IGF1R di promuovere la crescita e di mantenere la trasformazione cellulare sono il risultato della sua potente attività antiapoptotica. Queste caratteristiche sono state dimostrate in diversi sistemi (119-121). Il numero dei recettori IGF1Rs sulla superficie cellulare è il fattore più importante nel determinare la sopravvivenza cellulare (122). La via del segnale di IGF1R può indurre diversi effetti, inclusa differenziazione, trasformazione e prevenzione dell'apoptosi. I fattori che possono influenzare questi effetti non sono ancora ben noti, ma il recettore 1 per l'insulina (insulin receptor substrate 1, IRS1) sembra essere coinvolto; in assenza di IRS1, l'IGF1R trasmette un segnale che promuove la differenziazione. Al contrario, quando IRS1 è espresso, il segnale è mitogenico ed antiapoptotico (112).

In seguito all'autofosforilazione ed all'attivazione dell'IGF1R, vengono fosforilati vari substrati intracellulari, fra cui IRS-1, IRS-2, Shc e Grb10 (123). IRS-1 interagisce a sua volta con proteine di adesione, integrine, antigeni T e

media il legame della subunità p85 della fosfatidilinositolo 3-chinasi (P13-K) al complesso dell'IGF1R, determinando la stimolazione della via Akt/proteina chinasi B e la disattivazione delle vie apoptotiche (123-125).

In risposta all'interazione con il ligando di IGF1R, vengono inoltre attivate Raf, Ras e le MAP chinasi, e la specifica stimolazione delle diverse vie determina i differenti effetti degli IGF sulle cellule bersaglio (123-126). Quindi, i due principali substrati, IRS e Shc, mediano molti degli effetti di crescita e differenziazione degli IGF tramite l'IGF1R, attivando vari effettori a valle.

La diversa disponibilità di substrati interagenti può determinare l'effetto biologico finale dell'attivazione dell'IGF1R: qualora predomini IRS-1, le cellule tendono a proliferare e a trasformarsi; in caso di predominanza di Shc (Src-homology-2 and collagen homology domain protein), le cellule tendono a differenziarsi (127).

Diversi studi (124-126) sostengono che, in risposta all'attivazione dell'IGF1R, vengano attivate più vie di segnalazione che culminano nella protezione della cellula dall'apoptosi.

La principale via di segnalazione che determina la protezione dall'apoptosi si ritiene mediata dalla P-13 chinasi, seguita dall'attivazione della Akt/proteina chinasi B, culminante nella fosforilazione di BAD (membro della famiglia BCL-2 che forma un dimero con BCL-2 determinandone l'inattivazione) (124-126).

La fosforilazione di BAD inattiva questa proteina neutralizzante, quindi BCL-XL e BCL-2 si rendono disponibili per inibire l'apoptosi.

Sono state descritte almeno altre due vie, fra cui l'attivazione della via delle MAP chinasi e la traslocazione mitocondriale di Raf, che culminano entrambe nella fosforilazione di BAD (125): l'attivazione di più vie di segnalazione tramite l'IGF1R, che convergono tutte nella fosforilazione della proteina BAD, conferisce quindi a questo recettore un potente ruolo antiapoptotico.

L'inibizione dell'espressione del recettore Fas (128) e/o la riduzione dei livelli di ossido nitrico in risposta all'IGF1 (128-130) sono altri meccanismi che mediano gli effetti anti-apoptotici dell'IGF1R.

Mentre le vie che mediano gli effetti proliferativi e quelli differenziativi sono chiaramente separate, altrettanto non si può dire per ciò che riguarda le vie che mediano gli effetti proliferativi e antiapoptotici. Tuttavia, studi recenti suggeriscono che i domini dell'IGF1R che mediano gli effetti anti-apoptotici siano distinti da quelli che attivano la proliferazione (130); la PI3-k potrebbe mediare principalmente gli effetti antiapoptotici, mentre le MAPK quelli proliferativi.

I dati presenti in letteratura indicano inoltre che l'asse IGF/IGF1R non solo media gli effetti mitogeni degli IGF, ma anche di numerosi altri oncogeni e fattori di crescita, fra cui il proto-oncogene c-myc (131), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita dell'epidermide (EGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF) (132-133), l'ormone somatotropo (GH), gli ormoni estrogeni (134) e l'oncogene virale SV40-antigene T (135).

Quindi, si sta evolvendo il concetto che gli IGF, tramite l'IGF1R, svolgano il ruolo di fattore di crescita capace di mediare gli effetti mitogeni di numerosi fattori di crescita ed oncogeni, e che potrebbero di conseguenza essere necessari per sostenere la progressione del ciclo cellulare di quasi tutte le cellule, normali e neoplastiche, oltre ad essere critici per la trasformazione delle cellule tramite oncogenesi virale o cellulare (136).

Poiché l'IGF-1 e l'IGF-2 proteggono la cellula da diversi stimoli apoptotici, come l'etoposide, l'iperespressione di c-myc, la sottrazione di fattori di crescita, l'attivazione di Fas e l'esposizione ai raggi UV-B, è possibile che i potenti effetti anti-apoptotici dell'IGF1R facilitino la trasformazione ed amplificazione cellulare.

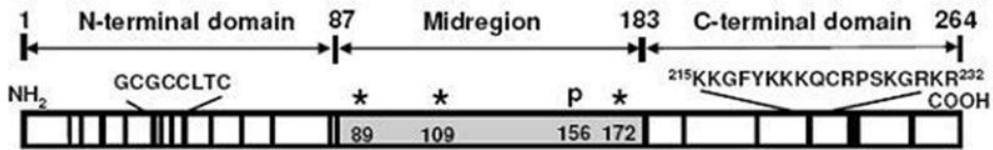
Le IGF-binding proteins

Sono state finora identificate sette IGFBPs (indicate con numero arabo da IGFBP-1 a IGFBP-7), con una struttura proteica ben conservata (figura 11).

I domini C-terminale ed N-terminale contengono diversi residui di cisteina capaci di interagire per formare ponti disolfuro. La regione centrale è variabile. Nella regione C-terminale di diverse IGFBPs (IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5) si trovano motivi di legame per l'eparina, che mediano l'interazione con i proteoglicani nella matrice cellulare o con la superficie cellulare. Ad esempio, tali motivi sono fondamentali per aumentare l'affinità di legame tra l'IGFBP-3 e la superficie cellulare e diminuire quella con l'IGF, che viene rilasciato in circolo. Inoltre, alcuni residui nella regione C-terminale sono importanti per la

stabilità del complesso IGF-IGFBPs, poiché ne incrementano l'affinità di legame. La regione N-terminale, ben conservata nelle IGFBPs, contiene il sito primario per l'interazione con le IGFs. Altri motivi strutturali nelle IGFBPs includono una sequenza Arg-Gly-Asp (RGD) nella regione C-terminale (IGFBP-1 e IGFBP-2), importante per il legame con l'integrina e per l'associazione cellulare (122).

Figura 11: struttura IGFBPs (Endocrine Reviews, 2009)



*Similarità strutturale tra le sei IGFBPs- 58%

*Regioni ricche di cisteine (12 Cs)

*Motivo IGFBP- GCGCCXXC

*Subdomini non caratterizzati (20,21)

*Sito principale di legame per IGF

* Regione centrale altamente variabile- la similarità è solo del 15% con le altre IGFBPs

*Modificazioni post-traduzionali (glicosilazione *, fosforilazione p)

*Associazione dell'IGFBP-3 alla superficie cellulare mediata dal suo recettore

*Siti proteolitici per differenti proteasi delle IGFBPs sono stati trovati in questa regione

-Similarità strutturale tra le sei IGFBPs- 34%

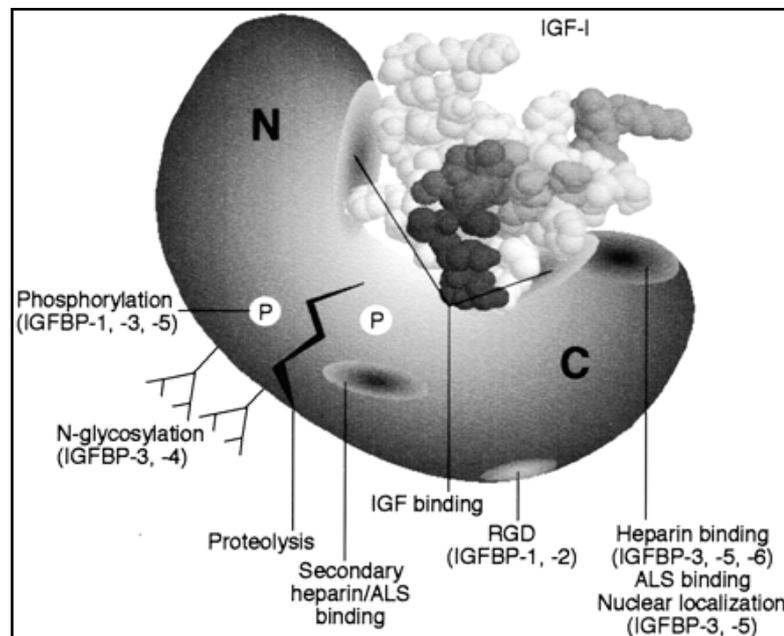
-Regione ricche di cisteine (6Cs)

-*Residui di legame per IGF

-Motivo di 18 residui basici che legano l'eparina, altri glicosaminoglicani, proteoglicani, fibrinogeno, fibrina

-Regione di legame per la subunità acido labile (ALS) e la transferrina

- Sequenza di localizzazione nucleare



Una volta tradotte, le IGFbps possono subire modificazioni che accrescono l'affinità per gli IGFs, la maggior parte delle quali interessano la regione centrale variabile. Fosforilazione, proteolisi e glicosilazione sono le diverse modificazioni che possono coinvolgere tali proteine. Ad esempio, IGFbps-3 può subire fosforilazione sul residuo della Ser156 (137). Inoltre, IGFbps-3, IGFbps-4, IGFbps-5 e IGFbps-6 possono essere glicosilate: N-glicosilazioni (residui di Asp) sono state trovate nelle prime due, mentre O-glicosilazioni (residui di Ser e Thr) sono state riscontrate nelle ultime. IGFbps-3, ad esempio, contiene tre siti di N-glicosilazione (Asp89, Asp109, Asp172); questa proteina è presente nel siero in forma quasi esclusivamente glicosilata. La glicosilazione non modifica l'interazione con IGFs ma può influenzare l'associazione con la superficie cellulare (138).

L'affinità tra gli IGFs e le IGFbps è molto elevata ($K_D = 10^{-10}$ M circa), superiore a quella tra IGF e IGF1R ($K_D = 10^{-9}$ M circa). Questo spiega il perché gli IGFs in circolo e nei fluidi extracellulari si trovino quasi esclusivamente in associazione con le IGFbps.

L'espressione delle IGFbps è regolata da molteplici ormoni, inclusi estrogeni, glucocorticoidi, ormoni paratiroidei, FSH, ormoni tiroidei, insulina, vitamina D e cortisolo.

Le IGFbps svolgono funzioni multiple e complesse, che possono dipendere o meno dall'IGF. Per quanto riguarda la funzione IGF-dipendente, le IGFbps sono capaci di inibire o aumentare l'azione degli IGFs, stimolando o inibendo di

conseguenza la proliferazione cellulare. Tuttavia, le IGFBPs (in particolare IGFBP-3) possono agire anche attraverso un meccanismo IGF-indipendente, legandosi, come proteina secretoria, ai recettori sulla superficie cellulare per attivare i pathways di trasduzione del segnale, essere internalizzate o indurre l'apoptosi (139).

Formando complessi con gli IGFs, questi vengono veicolati dalle IGFBPs nel siero, proteggendoli dalla degradazione e regolandone l'interazione con il recettore. Quest'ultima non avviene finchè gli IGFs sono complessati con le IGFBPs; il rilascio degli IGFs può avvenire in seguito a proteolisi delle IGFBPs o in seguito all'associazione dell'IGFBPs con la membrana cellulare o la matrice extracellulare. Tale associazione riduce l'affinità di legame fra IGFBPs (in particolare IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3 e IGFBP-5) e IGFs, determinando il rilascio di questi ultimi.

IGFBP-3

IGFBP-3 è un peptide di 264 aminoacidi, codificato da un gene di 8,9 kb che comprende cinque esoni, uno dei quali contenente esclusivamente sequenze 3' UTR, mentre gli altri quattro hanno il loro omologo nelle altre IGFBPs. Il gene per IGFBP-3 è espresso in un vasto numero di tessuti come un singolo mRNA di 2,6 kb. La relativa abbondanza del mRNA per IGFBP-3 nel fegato è in accordo con l'ipotesi che la sintesi epatica sia la fonte principale dell'IGFBP-3 circolante (110). In circolo molti IGFs formano un complesso ternario (150 kDa) con

IGFBP-3 ed una subunità acido labile (ALS) (140), espressa sia nel fegato che nel rene (110).

L'azione dell'IGFBP-3 risiede nella capacità di formare un complesso con IGF-1 o IGF-2, impedendone il legame con IGF-R e inibendo la proliferazione e la sopravvivenza cellulare (139). Quando IGFBP-3 interagisce con la superficie cellulare è capace di regolare l'azione degli IGFs.

Come già accennato, diverse evidenze dimostrerebbero che, oltre al suo ruolo di modulazione delle funzioni di IGF e alle attività IGF-dipendenti, IGFBP-3 avrebbe un'attività antiproliferativa diretta, il che rifletterebbe una capacità intrinseca di IGFBP-3 (141) o un'attività probabilmente mediata dal legame a specifici recettori di superficie cellulare (142-144).

Alcuni Autori hanno dimostrato l'effetto antiproliferativo *in vitro* di IGFBP-3 su fibroblasti nei quali era stato precedentemente alterato l'IGFR1, dimostrando ulteriormente l'indipendenza di questa risposta da IGF (145).

A supporto dell'ipotesi del ruolo di inibitore della crescita di IGFBP-3, è stato dimostrato che l'espressione dei geni per IGFBP-3 (146, 147) è indotta da altri fattori antiproliferativi, come TGF β (148), acido retinoico (149), tumour necrosis factor- α (150), antiestrogeni (151), p53 (152) e analoghi della vitamina D (153); inoltre, anche alcune citochine, come l'interleuchina 1 o 6, sono capaci di elevare i livelli di IGFBP-3 (152).

Gli effetti cellulari diretti di IGFBP-3 indipendenti da IGF1R richiedono spesso un legame con la superficie cellulare, suggerendo la presenza di un recettore specifico per IGFBP-3 sulla superficie cellulare.

Evidenze sempre crescenti suggeriscono che gli effetti antiproliferativi di IGFBP-3 possano essere mediati attraverso l'induzione dell'apoptosi. A supporto di questa ipotesi esistono sia studi *in vivo* che *in vitro*. Sia IGF-1 che IGF-2 sono noti come fattori di sopravvivenza per numerose specie cellulari e proteggono le cellule da differenti stimoli apoptotici attraverso vie di sopravvivenza cellulare mediate da IGF1R (154). Inoltre, la riduzione quantitativa di IGF1R può portare ad apoptosi, mentre un'overespressione di IGF1R può proteggere dall'apoptosi *in vivo*.(155) Dunque, il sequestro degli IGFs da parte di IGFBP-3 e la conseguente impossibilità di interazione con IGFRI sembra inibire l'induzione dell'apoptosi.

La più forte evidenza della funzione pro-apoptotica diretta IGF indipendente di IGFBP-3 proviene dagli studi di Rajah et al, i quali hanno dimostrato un'induzione dose-dipendente dell'apoptosi in risposta all'aggiunta di IGFBP-3 (50 ng/ml–500 ng/ml) ricombinante nelle cellule di carcinoma prostatico PC-3. Questo effetto veniva solo parzialmente inibito dall'aggiunta di IGF e non veniva eliminato in presenza di analoghi dell'IGF che non legano le IGFbps, suggerendo che quest'effetto sia IGF indipendente (156).

Studi recenti hanno dimostrato che esiste una via ras-dipendente coinvolta nella regolazione della sensibilità cellulare all'effetto inibitorio di IGFBP-3 sulla

sintesi del DNA. Le cellule epiteliali di mammifero MCF-10, se trasfettate con un oncogene H-ras, diventano refrattarie all'azione inibitoria di IGFBP-3, sebbene le stesse cellule, ma wild-type, siano inibite da concentrazioni di IGFBP-3 inferiori a 10 ng/ml (157).

IGFBP3: un mediatore di apoptosi

La proliferazione cellulare si ottiene dal bilanciamento tra divisione e morte cellulare. La proteina IGFBP-3 può modulare l'apoptosi: una via attraverso la quale si può verificare questa funzione è il sequestro degli IGFs, bloccando, così, la loro attività antiapoptotica. (158) Tuttavia, effetti apoptotici di IGFBP-3 sono stati riportati anche in cellule prive del recettore per IGF di tipo 1, (156) e in condizioni in cui l'IGF-1 non potesse esprimere un effetto di sopravvivenza, (159), sottolineando l'esistenza di una via d'azione IGF indipendente per IGFBP-3.

La capacità antiproliferativa di IGFBP3 è stata valutata da diversi Autori. Una delle più importanti proteine umane di soppressione, p53, capace di mediare l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi, è in grado di indurre il gene di IGFBP3 attivandone l'espressione in risposta al danno al DNA da radiazioni ionizzanti (160-163). Tuttavia, IGFBP-3 sembra in grado di indurre apoptosi anche attraverso vie p53 indipendenti, dal momento che risulta attiva anche in linee cellulari p53 negative (156, 163).

Le proteasi che agiscono sulle IGFBPs

In varie condizioni, fisiologiche e patologiche, le IGFBPs possono essere modificate mediante tagli proteolitici operati da diversi enzimi. La regolazione della proteolisi delle IGFBPs è complessa e variabile in base alle diverse condizioni fisiologiche (100). Ad esempio, l'antigene prostata-specifico (PSA), una serin-proteasi, è in grado di tagliare IGFBP-3 e IGFBP-5; un'altra serin-proteasi, il fattore di crescita γ del nervo (che presenta il 65% di omologia con il PSA) proteolizza sia l'IGFBP-4 che IGFBP-6; le catepsine D, G ed L sono proteasi lisosomiali acide in grado di proteolizzare tutte le IGFBPs; le metalloproteinasi della matrice, inclusa la collagenasi interstiziale, la gelatinasi A, la stromelisina 1, la tripsina e la gelatinasi B sono coinvolte nelle proteolisi dell'IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4 e IGFBP-5. Il ruolo di proteolisi è svolto anche da plasmina, trombina e dalla proteina A plasmatica in gravidanza.

Gli IGFs modulano l'attività proteolitica verso le IGFBPs, suggerendo la presenza di un loop autocrino regolatorio che controlla le proteasi delle IGFBPs. L'insulina e gli estrogeni, ma non il GH, influenzano le proteasi delle IGFBPs (100).

La proteolisi dell'IGFBP-3 si osserva in diversi fluidi biologici, quali quello peritoneale, follicolare, seminale, amniotico e cerebrospinale (164). IGFBP-3 presenta diversi siti di taglio nella porzione N-terminale della regione conservata e nel dominio variabile (centrale) (102).

Se la proteina intatta viene trattata con plasmina genera due frammenti principali, uno comprendente gli amminoacidi 1-160 e un secondo comprendente gli amminoacidi 1-95.

Il frammento più grande ha un peso molecolare di 30 kDa in forma glicosilata e di 22 kDa in forma non glicosilata ed ha un'affinità per gli IGF molto minore rispetto alla proteina intatta. Il frammento più piccolo misura 20 kDa in forma glicosilata e 16 kDa in forma non glicosilata e non lega gli IGFs (139). Pertanto, la proteolisi specifica di IGFBP-3 rappresenta un meccanismo di regolazione per il rilascio delle IGFs e la sua maggiore disponibilità per i tessuti. Inoltre, il frammento N-terminale 1-95, media l'abilità dell'IGFBP-3 nativa nell'indurre l'apoptosi attraverso il meccanismo IGF-indipendente (139).

Un terzo frammento proteolitico di IGFBP-3 (aminoacidi 161-264) include il dominio centrale e la regione C-terminale della proteina. Altri quattro frammenti sono stati identificati, tuttavia il folding della proteina permette di esporre solo alcuni dei diversi siti di taglio, proteggendo gli altri dall'attacco proteolitico.

Dunque, la proteolisi dell'IGFBP-3 è in accordo con le sue differenti funzioni. La forma intatta trasporta e limita la disponibilità degli IGFs, la proteolisi ne riduce l'affinità rilasciando gli IGFs liberi di interagire con i recettori. Quando l'attività delle proteasi o la loro concentrazione è alta, il frammento maggiore (IGFBP-3¹⁻¹⁶⁰) subisce un ulteriore taglio formando un frammento secondario (IGFBP-3¹⁻⁹⁵) che inibisce la crescita cellulare (100).

Il complesso ternario

L'80% circa degli IGFs circola sottoforma di complesso ternario (150 kDa) che contiene IGF-1/2, IGFBP-3/5 e la subunità acido labile (ALS, 85 kDa). Il complesso non è capace di attraversare l'endotelio capillare. Tuttavia, IGFBP-3 è più abbondante di IGFBP-5 perciò la maggior parte dell'IGF è legato a IGFBP-3. La percentuale rimanente delle IGFs in circolo forma un complesso binario di circa 50 kDa con altre IGFBPs. L'ormone della crescita regola l'espressione di IGFBP-3, IGF-1 e ALS. Il complesso ternario ha almeno due funzioni principali. In primo luogo, esso limita l'accesso dell'IGF circolante ai fluidi extracellulari e quindi ai vari tessuti (164). In secondo luogo stabilizza gli IGFs, accrescendone l'emivita (approssimativamente di 10 minuti in forma libera e di 12-15 h in forma complessata) e assicurando così una riserva di IGF in circolo.

L'mRNA dell'IGFBP-3 è localizzato soprattutto nell'endotelio epatico, mentre l'mRNA di ALS è espresso esclusivamente negli epatociti: ciò è a supporto dell'ipotesi che la formazione del complesso ternario può avvenire solo in circolo e non nell'ambiente extracellulare epatico (110).

GLI IGF E IL CANCRO

IGF-1 e IGF-2 sono dotati di eguale efficacia come agenti mitogeni, mostrando solo lievi differenze di potenzialità (98, 101, 165): è stato, infatti, evidenziato un importante ruolo degli IGFs nell'innesco e nella proliferazione delle cellule tumorali (101, 166, 167).

Alcuni dati dimostrerebbero una forte associazione tra elevati livelli circolanti di IGF-1 e il rischio di sviluppo di tumore mammario nella donna (168) e di tumore della prostata nell'uomo (169). Diversi studi rafforzano l'ipotesi che IGF-1 sia un mediatore essenziale degli effetti mitogeni degli estrogeni, con un ruolo critico nella progressione in G2 del ciclo cellulare (170): IGF-1 induce una regolarizzazione positiva dell'attività mitogena degli estrogeni e questi ultimi inducono un aumento dell'IGF-1 mediando l'espressione dei recettori di tipo 1 per IGF-1 e delle molecole di segnale a valle, IRS 1 (substrato 1 del recettore dell'insulina) e IRS 2 (substrato 2 del recettore dell'insulina) (171).

Oltre all'IGF-1 circolante, l'espressione autocrina degli IGF, in particolare di IGF-2, svolge un ruolo di primo piano nel conferire un vantaggio di accrescimento a molte cellule tumorali (101, 166, 167).

Si può ipotizzare che tutti i fattori che incrementano la disponibilità biologica degli IGF per vie endocrine, paracrine o autocrine siano in grado di indurre un aumento del rischio di carcinogenesi. La disponibilità biologica dell'IGF-1 circolante è influenzata non solo dall'ormone somatotropo e dagli ormoni

steroidi che incrementano la secrezione epatica di IGF-1, ma anche da fattori locali, come le binding proteins.

Ruolo dell'IGF2R nella tumorigenesi

L'IGF2R interagisce con diversi ligandi, fra cui l'IGF-2 e numerose proteine contenenti residui di mannosio-6 fosfato (M-6-P) nelle loro catene laterali glucidiche, come gli enzimi lisosomiali, il precursore del fattore di crescita trasformante- β (TGF- β) e la prolifina; il recettore è stato quindi denominato M-6-P/IGF2R, e ne è stata dimostrata la capacità di legare anche l'acido retinoico (RA); l'IGF2R lega l'IGF-2 con un'affinità superiore di 100 volte rispetto all'IGF-1, e non lega l'insulina (172).

L'IGF2R è progettato per regolare i segnali di crescita in gran parte delle cellule epiteliali tramite il legame dell'IGF-2, che determina la sua internalizzazione e degradazione; tramite endocitosi delle proteasi lisosomiali, come le catepsine D, B ed L, attraverso la riduzione della concentrazione di enzimi proteolitici coinvolti nell'invasione tumorale e facilitando l'attivazione del TGF- β e l'internalizzazione di RA, si assiste ad un aumento dei segnali inibitori della crescita sulle cellule epiteliali bersaglio (172). L'IGF2R è stato, quindi, designato come una proteina con attività oncosoppressiva, e che sembra svolgere un ruolo fondamentale nella regolazione fine della disponibilità dell'IGF-2, sia durante la crescita e lo sviluppo fetale che durante la tumorigenesi.

La delezione funzionale dell'IGF2R in fase postnatale può determinare la soppressione degli effetti inibitori della crescita esercitati da TGF- β e RA, e l'aumento della proliferazione tramite il legame dell'IGF-2 all'IGF1R; insieme ad altri effetti trasformanti, la perdita di IGF2R può condurre alla tumorigenesi. La disponibilità di un eccesso di enzimi proteolitici catepsina-simili in assenza di IGF2R potenzierebbe, quindi, la capacità di invadere e metastatizzare delle cellule trasformate: la regolazione negativa dell'IGF2R è stata infatti riportata in molte neoplasie (173).

Un altro recettore identificato è l'isoforma A del recettore dell'insulina (IR-A), che lega l'IGF-2 con un'elevata affinità, ed è espresso nelle cellule fetali e nelle cellule tumorali (174); l'IR umano esiste, dunque, in due isoforme, IR-A e IR-B; lo splicing alternativo di un piccolo esone determinerebbe la formazione di due trascritti, in cui vengono esclusi (IR-A) o inclusi (IR-B) 36 nucleotidi (175): IR-B è espresso prevalentemente nei tessuti, adiposi, epatici e muscolari, che sono i tessuti bersaglio principali degli effetti metabolici dell'insulina, mentre l'IR-A è espresso soprattutto nel sistema nervoso centrale e nelle cellule ematopoietiche, specialmente durante lo sviluppo fetale, e sembra essere nuovamente espresso in alcuni tumori (174). Quindi, si può ritenere che l'effetto biologico finale dell'IGF-2 sulla cellula sia determinato dalla presenza relativa di IGF1R, IGF2R (forme associate a membrana o solubili) ed IR-A.

IGFBP-3 E MELANOMA

Le vie di segnale di IGF sono coinvolte nella progressione del melanoma (176, 177): secondo alcuni Autori (178) questa proteina potrebbe essere utilizzata come un marker nel melanoma, in virtù della sua aumentata espressione nella malattia metastatica; altri, invece, (179) hanno riportato solo piccole differenze nell'espressione della proteina in caso di malattia metastatica o meno e nessuna differenza nei livelli plasmatici di IGFBP3.

Un recente lavoro (180) ha valutato l'espressione di IGFBP 3 nel melanoma; questa è stata analizzata su pezzi in paraffina provenienti da nevi, melanomi primitivi e metastasi: l'espressione di IGFBP3 varia in modo significativo nelle linee cellulari di melanoma umano, infatti non è stata rinvenuta alcuna espressione di IGFBP3 nei nevi, mentre una debole positività (1-5% delle cellule) è stata osservata nei melanomi primitivi; nessuna immunoreattività è stata osservata nella cute sana adiacente la neoplasia; le metastasi hanno mostrato, infine, debole positività, ma maggiore rispetto alle cellule del melanoma primitivo: questo suggerirebbe che l'espressione di IGFBP3 potrebbe essere indotta in caso di progressione di malattia. Inoltre, gli stessi autori hanno indagato circa l'esistenza di una correlazione tra i livelli circolanti di IGFBP3 nel plasma e la progressione di malattia, non rilevando alcuna significativa differenza tra i pazienti in stadio II e in stadio IV: di conseguenza, IGFBP3 non può essere utilizzata come marker sierico nei pazienti affetti da melanoma (179, 180).

L'espressione di IGFBP3 si riduce durante la progressione di malattia ma, come riportato anche per altre neoplasie (181), IGFBP3 sembra avere un modesto valore diagnostico. Inoltre, IGFBP3 sembra avere un ruolo sia nella proliferazione che nell'apoptosi cellulare; i meccanismi che regolano l'espressione di IGFBP3 nel melanoma includono sia un silenziamento dovuto alla metilazione del promoter di IGFBP3 che un coinvolgimento delle vie di segnale PI3-chinasi/AKT e MAPK/ERK1/2, la cui inibizione comporterebbe una riduzione dei livelli di IGFBP3 (180)

Diversi lavori sono stati condotti sullo studio di eventuali geni che potessero rivestire un ruolo importante nella progressione del melanoma (182): tra questi, proprio IGFBP-3 sembra essere un candidato importante, in virtù del suo ruolo chiave nella proliferazione cellulare e nella metastatizzazione (183).

Allo scopo di validare l'ipotesi del ruolo di IGFBP-3 nella progressione del melanoma, alcuni Autori hanno studiato l'espressione di tale proteina su linee cellulari di melanoma primitivo (WM35) e metastatico (WM266-4). La linea cellulare WM35 deriva da un melanoma primitivo a diffusione superficiale nella fase di crescita radiale, mentre la linea WM266-4 deriva da un paziente affetto da malattia metastatica. Questi Autori hanno scoperto che IGFBP-3 era altamente overespressa nella linea cellulare metastatica WM266-4, se paragonata alla linea derivante dal melanoma primitivo, WM35; inoltre, gli stessi Autori hanno dimostrato che una riduzione dell'attività di IGFBP-3, ottenuta mediante interferenza con RNA, riduceva significativamente il

potenziale invasivo della linea cellulare WM266-4 *in vitro*: questi dati si traducono nella dimostrazione che IGFBP-3 possa giocare un ruolo centrale nella modulazione del potenziale metastatico delle cellule di melanoma, e che possa rappresentare un marker prognostico (178).

In conclusione, la gestione del melanoma cutaneo potrebbe, dunque, beneficiare dell'identificazione di marker di progressione di malattia e potenziale metastatico.

LE METALLOPROTEASI

Le Metalloproteasi di Matrice (Matrix Metalloproteinases, MMP), conosciute anche come matrixine, sono una famiglia di enzimi proteolitici, la cui attività catalitica di tipo endopeptidasico, come indicato dallo stesso nome, è dipendente dalla presenza di specifici ioni metallici. Le MMP hanno una potente azione degradativa nei confronti di componenti proteici della matrice extracellulare (ExtraCellular Matrix, ECM) e possiedono, inoltre, attività di cleavage verso molecole presenti sulla membrana cellulare e verso altre molecole proteiche pericellulari (184).

L'attività di questi enzimi è fondamentale per lo svolgimento di numerosi processi fisiologici; a titolo puramente esemplificativo, le MMP sono riconosciute come indispensabili sia per il corretto sviluppo embrionale, sia per il rimodellamento/turn-over tissutale e per la riparazione di ferite nella vita adulta. Allo stesso tempo, però, le MMP sono coinvolte in svariati processi patologici sia di tipo infiammatorio che degenerativo (ad es. artriti, artrosi) e, inoltre, nell'acquisizione del fenotipo invasivo e/o metastatizzante delle neoplasie (184).

Tale molteplicità di funzioni svolte dalle MMP è accompagnata da precisi meccanismi di regolazione, che, quando perdono di efficienza, possono appunto determinare la comparsa di eventi patologici. I meccanismi di controllo dell'attività delle MMP sono molto articolati e agiscono a differenti livelli; oltre

ad essere conosciuti dei meccanismi di regolazione a livello trascrizionale, le MMP, al pari degli enzimi pancreatici, sono secrete come “zimogeni” cioè come enzimi che si attivano solo dopo la rimozione di un pro-peptide inibitorio. Inoltre, l'attività delle MMP è ulteriormente regolata da molecole con azione inibitoria chiamate Inibitori Tissutali delle MMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, TIMP).

Gli organismi superiori producono numerose e diverse MMP, ciascuna delle quali si

contraddistingue per possedere un proprio profilo di espressione, localizzazione, attivazione, inibizione e clearance così come uno specifico pannello di substrati da degradare. Tuttavia, alcune funzioni delle diverse MMP sono sovrapponibili; in questo modo, l'attività delle MMP è, per certi aspetti, ridondante, ma, allo stesso tempo, è vantaggiosa per l'organismo perché garantisce una sorta di meccanismo compensatorio, nel caso di perdita di funzione di qualche MMP (185)

La nomenclatura delle MMP associa normalmente all'acronimo MMP un numero che di solito si riferisce alla sequenza cronologica della scoperta. In aggiunta, le MMP possono essere raggruppate e, di conseguenza, anche nominate, sulla base dell'organizzazione dei loro domini. La maggior parte delle MMP sono secrete; tuttavia, 6 mostrano un dominio transmembranario e sono espresse come molecole di superficie.

Genericamente e in modo schematico, la struttura delle MMP può essere così organizzata (185):

1. peptide segnale N-terminale (chiamato anche pre-dominio) che è rimosso dopo avere indirizzato la proteina durante la sua sintesi verso il reticolo endoplasmatico
2. propeptide, che garantisce la latenza dell'attività fino alla sua rimozione
3. dominio catalitico legante lo zinco
4. hinge-region cioè una regione cerniera, che varia in lunghezza e composizione aminoacidica tra le MMP e influisce sulla specificità dei substrati
5. dominio per l'emopessina, che influenza varie funzioni tra cui il legame con i TIMP.

Sulla base della specificità per i substrati, della similarità nella sequenza e nell'organizzazione dei domini, le MMP dei vertebrati sono state divise in 6 distinti gruppi (185).

Collagenasi

Appartengono a questo gruppo la MMP1, MMP8, MMP18 (Xenopus); sono caratterizzate dalla capacità di digerire il collagene interstiziale di tipo I, II, e III insieme ad altre molecole della matrice extracellulare.

Gelatinasi

Appartengono a questo gruppo la Gelatinasi A e B, che rappresentano rispettivamente le MMP2 e 9. Questi enzimi hanno inserito nel dominio catalitico 3 ripetizioni di un dominio legante la fibronectina. L'azione degradativa è diretta verso la gelatina, la laminina e il collagene di tipo IV e V, cioè il collagene non fibrillare che è il maggiore componente della membrana basale; solo la MMP2 può anche digerire collagene di tipo I e III.

Stromelisine

La stromelisina 1 (MMP3) e la stromelisina 2 (MMP10) hanno una simile specificità di substrato, anche se l'attività della MMP3 è più efficiente. Oltre a degradare vari componenti della ECM, la MMP3 partecipa all'attivazione di numerose pro-MMP. La stromelisina 3 (MMP11) è generalmente raggruppata nonostante il nome tra le "altre MMP" perché la sequenza e la specificità di substrati divergono da quella delle altre stromelisine.

Matrilisine

Come già affermato, gli enzimi di questo gruppo non possiedono il dominio per l'emopessina e comprendono la matrilisina 1 (MMP7) e la matrilisina 2 (MMP26). Oltre a processare vari componenti della ECM (collagene di tipo I, IV, fibronectina etc), la MMP7 degrada anche il pro-TNF α , il Fas-ligand la E-caderina e altre molecole di superficie.

MMP membrane type

Il nome di queste MMP deriva dal fatto che sono molecole di membrana (Membrane Type MMP, MTMMP); le prime 4 MTMMP (corrispondenti in ordine alle MMP14, MMP15, MMP16 e MMP24) sono dotate di un dominio transmembranario di tipo I, mentre le MT5MMP e MT6MMP (MMP17 e MMP25) sono proteine ancorate alla membrana attraverso la molecole del GPI (glicosil fosfatidil inositolo). Con l'eccezione della MT2MMP le altre MTMMP hanno tutte la capacità di attivare la proMMP2 oltre a digerire numerosi componenti delle ECM (collegene tipo I, II e III). Inoltre, la MT1MMP è conosciuta per svolgere un ruolo fondamentale nei processi di angiogenesi e di regolazione della produzione del VEGF.

Il gruppo delle "altre MMP"

Appartengono a questo gruppo 7 MMP. La MMP12 o metalloelastasi è conosciuta per essere espressa nei macrofagi dove svolge un ruolo fondamentale nei processi di migrazione digerendo appunto l'elastina e numerose altre proteine. La MMP19 sembra essere un auto-antigene espresso nei pazienti affetti da artrite reumatoide. La MMP20, o enamelisina, digerisce l'amelogenina ed è primariamente espressa a livello dentale. La MMP23 non possiede il cysteine-switch-motif a livello di predominio e al posto del dominio emopessinico presenta un dominio ricco in cisteina e prolina chiamato "IL-1 type II receptor-like domain". La MMP23 è stata proposta come MMP di membrana di tipo II

perché possiede un dominio transmembranario a livello N-terminale del predominio. Inoltre sempre nel propeptide, è presente un motivo che riconosce la furina ed è perciò clivata a livello dell' Apparato di Golgi e rilasciata come proteina già attiva nello spazio extracellulare. Appartengono infine a questo gruppo la MMP22, con funzione ancora ignota, e la MMP28, principalmente espressa nei cheratinociti.

Attivazione delle MMP

Come altri enzimi proteolitici, le MMP, in una sorta di meccanismo autodifensivo, sono sintetizzate primariamente come zimogeni, cioè proenzimi inattivi (definite perciò come proMMP). La latenza è garantita dal gruppo sulfidrilico di una cisteina a livello dell'estremità C-terminale del prodominio; questo gruppo sulfidrilico rappresenta il quarto sito di legame per lo zinco presente nel sito attivo del dominio catalitico.

L'attivazione si verifica quando il legame gruppo sulfidrilico – ione zinco (c.d. cystein to zinc switch) è rimosso; a questo punto il sito attivo, in cui il quarto legame è rimpiazzato con una molecola di acqua, può attaccare i legami peptidici delle proteine target delle MMP (185, 186).

Attivazione “in vitro”

“In vitro”, l'attivazione delle MMP può essere mediata da molti agenti chimici quali ad esempio SDS, glutatione ossidato, agenti caotropici, oltre che da bassi valori di pH e da trattamento al calore. Questi agenti probabilmente

interferiscono direttamente con l'interazione tra la cisteina e lo zinco del sito attivo.

Attivazione “in vivo”

“In vivo” l'attivazione della maggior parte delle MMP a livello extracellulare avviene per proteolisi. Tale attivazione procede generalmente per step e può essere iniziata o da altre MMP, a loro volta già attivate, oppure da numerose serin-proteasi. Il primo attacco proteolitico avviene a livello della bait region del prodominio. Quando questa prima parte del prodominio è rimossa, si verifica una destabilizzazione complessiva di tutta questa regione comprendendo anche l'interazione cisteina-zinco del sito attivo. L'attivazione completa della MMP è mediata da una successiva processazione intermolecolare da parte di altre MMP parzialmente o totalmente attivate; di conseguenza, lo step finale dell'attivazione è MMP-dipendente.

TIMP

I TIMP sono inibitori peptidici di peso molecolare compreso tra 21 e 29 kDa, che legano le MMP secondo un rapporto stechiometrico di 1:1. Nei vertebrati sono stati identificati 4 diversi TIMP (TIMP1, 2, 3 e 4). Analogamente alle MMP, anche l'attività dei TIMP è regolata in condizioni fisiologiche. I TIMP hanno un'estremità N e C terminale di, rispettivamente, 125 e 65 aminoacidi, ciascuno contenente 3 ponti disolfuro. L'estremità N-terminale è quella con azione inibitoria sulle MMP. La struttura complessiva tridimensionale dei TIMP

è riferibile ad un “cuneo” che si inserisce a livello del solco del sito attivo nel dominio catalitico delle MMP (185). Da un punto di vista funzionale, è noto che i TIMP, oltre l’inibizione delle MMP, svolgono altre funzioni come la stimolazione dell’attività eritroide e della crescita cellulare (186).

Meccanismi molecolari dell’attività delle MMP

Sebbene le MMP possano virtualmente degradare tutto lo spettro di componenti proteici che costituiscono l’ECM, l’attività proteolitica delle MMP è diretta anche nei confronti di altre molecole sia circolanti che presenti sulla superficie cellulare o pericellulare. Da ciò deriva che le MMP, oltre ad essere coinvolte nei processi di rimodellamento della matrice sia fisiologici che patologici, risultano in grado di influenzare il comportamento cellulare attraverso numerosi meccanismi.

Rimodellamento della ECM

La degradazione della ECM, operata dalle MMP in concerto con altri gruppi di molecole proteolitiche quali principalmente le serin-proteasi, è un processo che permette, distruggendo fisicamente le barriere strutturali, l’invasione cellulare dei tessuti circostanti. Tuttavia la ECM non deve essere considerata solo come una semplice impalcatura, perché la sua degradazione può fortemente influenzare il comportamento cellulare in conseguenza della liberazione numerose molecole bioattive che normalmente sono sequestrate nella ECM stessa. Queste molecole sono molto numerose e possiedono funzioni tra loro

molto differenti: fattori di crescita, proteine che legano i fattori di crescita e molecole che rappresentano i ligandi per recettori cellulari di adesione (ad es. per le integrine). Di conseguenza, la ECM risulta implicata nella regolazione di numerosi processi cellulari quali la forma, il movimento, la crescita, la differenziazione e la sopravvivenza. Per estensione, tutti questi processi possono essere alterati dall'azione delle MMP, che modificando la normale composizione e organizzazione della ECM, influenzano tutti i segnali derivati dalla matrice. Ad esempio, per dimostrare come l'attività delle MMP possa influenzare il comportamento cellulare, la degradazione MMP-dipendente delle fibrille native di collagene determina l'esposizione di siti altrimenti criptati che possono essere legati da integrine di cellule neoplastiche di melanoma, consentendone la sopravvivenza e la crescita (186).

Degradazione di molecole di superficie

Le MMP possiedono attività degradativa anche diretta verso molecole proteiche presenti sulla superficie cellulare come, per esempio, molecole di adesione. Infatti, le MMP3 e 7 degradano le molecole di adesione cellulare E-caderina, rilasciando un frammento solubile, che inibisce l'aggregazione cellulare e promuove fenomeni di tipo invasivo. Ancora, alcune MTMMP possono degradare delle transglutaminasi tissutali di superficie che, come co-recettori di integrine, promuovono l'adesione e la diffusione delle cellule attraverso il legame con la fibronectina, favorendo o inibendo l'invasione di cellule con

fenotipo neoplastico a seconda della particolare composizione della ECM in cui si trovano.

Sempre nell'ambito del rimodellamento di molecole di superficie, le MMP possono determinare anche il rilascio di molecole bioattive. Ad esempio, la MMP3 può determinare la liberazione dai leucociti di L-selectina e può anche rilasciare il fattore di crescita HB-FGF in forma attivata. La MMP7 a sua volta può indurre apoptosi cellulare mediata dal recettore FAS determinando il rilascio del ligando attivato per il FAS dalla superficie delle stesse cellule con un meccanismo autocrino. La liberazione del ligando per il FAS può prevenire in certi contesti la progressione neoplastica, ma, allo stesso tempo, può essere responsabile della selezione di sottopopolazioni neoplastiche resistenti all'apoptosi FAS-mediata. Le MMP2 e 9 possono attivare il TGF- β e almeno 7 diverse MMP possono attivare il precursore del TNF- α legato alla membrana cellulare. Oltre ad attivare e/o rilasciare numerosi fattori di crescita e citochine, le MMP possono rilasciare anche i recettori specifici per tali molecole. Ad esempio, la MMP2 libera dalla superficie cellulare il recettore 1 per l'FGF, che mantiene dopo il rilascio la capacità di legame con l'FGF influenzandone di conseguenza la biodisponibilità (184).

Regolazione di segnali paracrini

Le MMP possono intervenire anche nella regolazione di segnali con azione paracrina sia inattivando direttamente le molecole responsabili di tali segnali sia,

in alternativa, degradando i recettori destinati al legame con tali molecole ad azione paracrina. Per esempio le MMP possono direttamente degradare molecole con azione paracrina quali angiotensina I e II, bradichinina e la sostanza P (184).

LE METALLOPROTEINASI E IL MELANOMA

Negli ultimi anni è diventato sempre più chiaro che ritenere le metalloproteasi indispensabili esclusivamente per la distruzione di componenti della matrice extracellulare (MEC) con la conseguente acquisizione di capacità invasive da parte delle cellule tumorali, fosse riduttivo. La matrice extracellulare, oltre alle sue funzioni strutturali e di barriera, riveste altri importanti ruoli; ad esempio, la membrana basale influenza la crescita e la sopravvivenza di cellule epiteliali e la MEC serve come serbatoio di numerose molecole biologicamente attive (187). La proteolisi di componenti della MEC da parte di metalloproteasi può alterare queste funzioni. Inoltre, sono stati identificati una serie di substrati non appartenenti alla MEC che possono influenzare le funzioni cellulari (188). Ad esempio è stato dimostrato che l'IGFBP3 è un substrato per le metalloproteasi, in particolare per le metalloproteasi 1, 2 e 3 (189).

MATERIALI E METODI

Da giugno 2007 a marzo 2010, sono stati arruolati 48 pazienti (25 maschi e 23 femmine, con età mediana di 60,5 anni, range 24-82) affetti da melanoma cutaneo e seguiti presso il Dipartimento di Dermatologia dell'Università "Sapienza" di Roma.

Le variabili analizzate sono state l'età, il sesso, la data della diagnosi, il tipo di melanoma, lo spessore di Breslow, il livello di Clark, la presenza o meno di ulcerazione, lo stadio di malattia al momento della diagnosi e al momento di una eventuale progressione, la data di progressione, morte o ultimo follow up, il performance status, la presenza di eventuali malattie associate e terapie intercorrenti, l'intervallo libero da malattia (Disease Free Survival, DFS) e la sopravvivenza globale (Overall Survival, OS).

Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte nella tabella 3.

Ciascun paziente è stato seguito secondo le linee guida GIPMe (Gruppo Italiano Polidisciplinare sul Melanoma), basate sull'ultima stadiazione dell'American Joint Committee on Cancer.

I campioni di sangue sono stati prelevati da ciascun paziente alla loro prima visita presso il Dipartimento di Dermatologia dell'Università "Sapienza" di Roma e ad intervalli di 3–12 mesi, in base allo stadio e al follow-up; quindi, i campioni sono stati centrifugati in centrifuga refrigerata e crioconservati in aliquote a -80°C fino al momento della successiva analisi.

Tabella 3: caratteristiche dei pazienti

Caratteristiche dei pazienti (N = 48)	Numero
Sesso	
Maschio	25 (52.08%)
Femmina	23 (47.92%)
Età	
≤40	8 (16.67%)
41-60	16 (33.33%)
>60	24 (50%)
Spessore di Breslow	
≤1.00	9 (18.75%)
1.01-2.00	7 (14.58%)
2.01-4.00	17 (35.41%)
>4.00	12 (25%)
Non valutabile (melanoma occulto)	3 (6.26%)
Ulcerazione	
Assente	20 (41.66%)
Presente	25 (52.08%)
Non valutabile	3 (6.26%)
Sottotipo istologico	
Superficial Spreading Melanoma (SSM)	24 (50%)
Nodular Melanoma (NM)	20 (41.66%)
Acral Lentiginous Melanoma (ALM)	1 (2.08%)
Occulto	3 (6.26%)
Decesso	
Si	6 (12.5%)
No	42 (87.5%)
Familiarità	
Si	4 (8.33%)
No	44 (91.77%)
Presenza di malattia al prelievo	
Si	16 (33.33%)
No	32 (66.67%)
Melanoma multiplo	
Si	5 (10.41%)
No	43 (89.59%)
Progressione	
Si	21 (43.75%)
No	27 (56.25%)
Stadio al prelievo	
Stadio 1	10 (20.84%)
Stadio 2	15 (31.25%)
Stadio 3	9 (18.75%)
Stadio 4	14 (29.16%)

Western blot

La concentrazione di IGFBP-3 sierica è stata valutata utilizzando la metodica Western Blot (WB); prima dell'analisi elettroforetica, la concentrazione totale di proteina nei sieri è stata determinata mediante tecnica Bradford.

I sieri sono stati diluiti 1:10 per l'analisi e caricati a parità di volume corrispondente a 0,6 µl. La quantità di IGFBP-3 endogena è stata valutata confrontandola con quantità note della proteina IGFBP-3 ricombinante (31674 Da, GenWay). I campioni sono stati quindi separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide al 12,5% in presenza di SDS (SDS-PAGE) e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa, utilizzando un buffer contenente Tris-Glicina e 20% metanolo. I filtri sono quindi stati bloccati per 1h con 5% Not Fat Dry Milk (NFDM, AppliChem) in PBS, lavati ed incubati over night con l'anticorpo primario policlonale (IGFBP-3, ABD Serotec) in 5% NFDM in PBS. Successivamente i filtri sono stati lavati in 5% NFDM in PBS + 0,1% Tween-20, ed incubati per 45 minuti con anticorpo secondario coniugato con perossidasi diretto contro le immunoglobuline di coniglio, diluito in 10% NFDM (in PBS/T). Quindi, i filtri sono stati lavati in Wash Buffer (5% milk in PBS/T). L'immunoreattività è stata visualizzata tramite chemiluminescenza (ECL, Bio-Rad). Per evidenziare la reazione, i filtri sono stati esposti ad una lastra fotografica per un tempo variabile da alcuni secondi ad alcuni minuti.

ELISA

La tecnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Dosaggio Immune Adsorbito Legato a un Enzima) è un versatile metodo di analisi immunologica usato in biochimica per rilevare la presenza di un antigene grazie all'uso di uno specifico anticorpo.

Nel nostro caso è stata utilizzata la metodica ELISA non competitiva diretta che si può riassumere nelle seguenti fasi:

FASE A. L'anticorpo monoclonale specifico per IGFBP-3 (IGFBP-3, ABD Serotec) o ALS (ALS, ABD Serotec) è stato fissato al substrato di PVC.

FASE B. Il campione biologico di siero è stato inserito nei pozzetti di PVC; dopo incubazione (indicata dalla casa produttrice), si procede al lavaggio per evitare che tracce di antigene possano permanere all'interno.

FASE C. Si inserisce un anticorpo monoclonale marcato con fosfatasi alcalina; infine si effettua il lavaggio che ha il compito di eliminare dal sistema gli anticorpi marcati che non sono legati.

Successivamente alle tre fasi si aggiunge p-nitrofenilfosfato che provoca una reazione con l'enzima coniugato all'anticorpo secondario producendo p-nitrofenolo di colore giallo. un liquido che, a contatto con l'enzima perossidasi o con l'enzima fosfatasi alcalina, determina una variazione di colore osservabile al microscopio o, nella maggior parte dei casi, ad occhio nudo.

Lettura del risultato: la reazione cromogenica prodotta dalla reazione tra enzima fosfatasi e p-nitrofenilfosfato è stata misurata e quantizzata tramite spettrofotometro.

RIA

Il metodo RIA (Radio Immune Assay) si basa su una reazione di competizione: l'IGF1, presente nel siero dei pazienti arruolati in quantità variabile, e l'antigene noto marcato competono simultaneamente per un limitato numero di siti leganti anticorpo-specifici. Secondo la legge dell'azione di massa, l'antigene presente in concentrazione maggiore, sia marcato che non, ha occupato la maggior parte dei siti leganti anticorpali, pertanto le molecole di antigene marcato che si sono legate ai siti leganti anticorpali disponibili sono state in numero inversamente proporzionale alla quantità di antigene non marcato.

La separazione della frazione legata dalla frazione libera ha rappresentato un passaggio necessario dopo l'avvenuta formazione del complesso antigene-anticorpo.

Successivamente, la frazione legata all'anticorpo è stata sottoposta a conteggio di radioattività che ha consentito di poter esprimere in termini di concentrazione la quantità di IGF1 presente nel siero dei pazienti.

Saggio per le proteasi di IGFBP-3

Per valutare l'attività proteasica nel siero dei pazienti al IV stadio, 1 µl di siero in 20 µl di buffer contenente il substrato dell'enzima è stato incubato a 37°C per 72 ore, in presenza e assenza di inibitori delle proteasi. Successivamente sono

state prese delle aliquote a 0, 24, 48 e 72 ore, sottoposte ad elettroforesi e western blot per determinare lo stato di degradazione di IGFBP-3.

Per valutare l'attività proteasica nel mezzo di coltura delle linee cellulari di melanoma, 1 µl di siero proveniente da donatori sani è stato utilizzato come fonte di IGFBP-3 intatta, glicosilata. Questo è stato miscelato con 20 µl del mezzo di coltura delle cellule e i campioni così ottenuti sono stati incubati a 37°C per 96 ore e poi sottoposti a SDS-PAGE in condizioni riducenti. La proteolisi dell'IGFBP-3 è stata quindi valutata mediante western blot.

Zimografia

La zimografia è una tecnica elettroforetica utilizzata per identificare l'attività proteolitica di enzimi separati sulla base del loro peso molecolare su speciali gel di poliacrilamide in condizioni non denaturanti. Separando gli enzimi sulla base del peso molecolare, questa tecnica garantisce di poter separatamente identificare la forma proenzimatica dalla forma attivata delle MMP. Inoltre, l'elettroforesi garantisce un'efficiente separazione di questi enzimi anche da eventuali TIMP. La tecnica consiste nell'impiegare gel di poliacrilammide che sono stati polimerizzati inglobando il substrato specifico della MMP da investigare; ad esempio con la gelatina se si vogliono studiare le MMP2 e 9 o con il collagene se si intende studiare la MMP1. Alla corsa elettroforetica è fatta seguire una fase prima di rinaturazione con speciali buffer contenenti Triton X 100, che rimuove i residui di SDS presenti nel gel di poliacrilammide; a questa prima fase è fatta seguire una seconda fase di incubazione in condizioni di

temperatura idonea e in presenza di cofattori in modo da favorire l'attività dell'enzima. La tecnica si conclude con la colorazione del gel con Blu di Comassie o con un altro colorante generico per le proteine. La presenza nel campione analizzato di attività MMP è evidenziata con la presenza di bande "non colorate" che rappresentano l'esito della digestione da parte dell'enzima delle proteine substrato presenti nel gel.

Un μl di siero dei pazienti (contenuto totale proteico di 60-80 μg) è stato separato in un gel al 10% di SDS poliacrilamide, contenente 1 mg/ml di gelatina bovina (Sigma, Deisenhofen, Germany), in condizioni non riducenti.

Dopo l'elettroforesi i gel sono stati lavati due volte, per 30 minuti, in un buffer di triton X-100 al 2,5% per rimuovere l'SDS. Successivamente i gel sono stati incubati tutta la notte, ad una temperatura di 37°C, con un buffer contenente il substrato dell'enzima (Tris-HCl 50mM, pH 7,5; NaCl 150mM; CaCl₂ 5mM).

Infine, i gel sono stati colorati con Blue Coomassie R250 e decolorati in acqua.

Culture cellulari

Rappresentano uno dei metodi più utilizzati dalla biologia cellulare per l'osservazione di cellule viventi. La sopravvivenza delle colture è legata all'utilizzo di appropriati terreni. Attualmente sono disponibili terreni di coltura allestiti sulla base dello studio della biochimica nutrizionale e sulle esigenze delle cellule che vengono poste in coltura. È essenziale il controllo della pressione osmotica e del pH.

I terreni contengono: soluzioni tamponate di amminoacidi, basi puriniche e pirimidiniche, vitamine, zuccheri e sali inorganici.

I terreni vengono arricchiti con siero bovino, umano o di cavallo o lisati proteici ed estratti embrionali e addizionati di antibiotici per evitare la contaminazione batterica o fungina.

Nel nostro studio abbiamo utilizzato 3 linee cellulari di melanoma umano: le Me-501, le LG e le Wm-793, ottenute grazie alla collaborazione con i colleghi dell'Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento del Farmaco.

Le linee cellulari Wistar melanoma (WM) sono state gentilmente fornite dal Dr. Meenhard Herlyn, Wistar Institute, Philadelphia, PA. Le linee cellulari LG e Me501 sono state ottenute da metastasi asportate chirurgicamente a pazienti affetti da melanoma presso l'Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italia. Tutte le linee cellulari di melanoma sono state seminate in piastre di Petri (2×10^5 o 4×10^5 per piastra) in un terreno RPMI 1640 addizionato con 100 UI/mL di penicillina, 100 $\mu\text{g/mL}$ di streptomina (Life Technologies, Gaithersburg, MD) e 2 mmol/L di glutamina (Life Technologies) con il 10% FCS in atmosfera al 5% di CO₂ ad una temperatura di 37°C.

Scratch test

E' un test che si utilizza per valutare la motilità cellulare. Consiste nel "graffiare" una coltura cellulare in adesione e monitorare se e con che velocità il graffio torni a riempirsi di cellule, quindi misura la capacità delle cellule di muoversi; è detto anche wound-healing. E' stato effettuato su tutte e tre le linee

cellulari a nostra disposizione. (WM709, LG e Me501). Le cellule in monostrato sono state “graffiate” con la punta di una pipetta in modo da determinare una “ferita”. Quindi la piastra è stata lavata con PBS ed incubata in DMEM con il 3% di siero bovino fetale in presenza o assenza di IGFBP-3 ricombinante (ABd serotec). La migrazione cellulare è stata quindi monitorata con un microscopio ottico, utilizzando un microscopio Axiovert 200M con una macchina fotografica digitale (Carl Zeiss, Thornwood, NY), eseguendo fotografie a 2, 4, 6, 24 e 48 ore. Le immagini sono state acquisite con il software AxioVision 4.0 (Carl Zeiss). E’ stata quindi valutata la chiusura della ferita iniziale calcolando la differenza tra l’area iniziale e l’area rimanente ad ogni orario di controllo.

Trypan blue test

Il test di esclusione della colorazione viene utilizzato per determinare il numero di cellule vitali presenti in una sospensione.

Si basa sul principio che le cellule vive, avendo membrane cellulari intatte, non permettono a determinati coloranti come il tripan blue, di penetrare all’interno del citoplasma. Una sospensione cellulare viene messa a contatto con il colorante e successivamente esaminata al microscopio per valutare se le cellule appaiono colorate oppure no. Questo test non è in grado di distinguere cellule apoptotiche da cellule necrotiche.

Test di invasività cellulare

L’invasività delle cellule di melanoma è stata valutata con la metodica di invasione del Matrigel (strato di membrana basale ricostituita in vitro) adeso alla

membrana di separazione tra il compartimento superiore ed inferiore di una camera di Boyden. I due pozzetti della camera di Boyden sono stati separati da un filtro di policarbonato con pori della larghezza di $8\mu\text{m}$, che è stato ricoperto con Matrigel ($50\mu\text{g}/\text{filtro}$): il Matrigel corrisponde alla composizione della membrana basale in vivo. La possibilità delle cellule di oltrepassare tale barriera anatomica è indicativa delle proprietà invasive delle cellule.

Multipozzetti da 24 posti, preraffreddati a -20°C , sono stati riempiti con $300\mu\text{l}/\text{pozzetto}$ di Matrigel ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) con una pipetta fredda, evitando la formazione di bolle. Il Matrigel è stato lasciato a polimerizzare per un'ora a 37°C . Le cellule Me-501 sono state sospese in terreno di coltura, stratificate su Matrigel polimerizzato e incubate a 37°C . Otto pozzetti sono stati utilizzati come controllo ed in 16 è stata aggiunta IGFBP-3 ricombinante a diversa concentrazione, rispettivamente in 8 a $2,5\mu\text{g}/\text{ml}$ ed in altri 8 a $5\mu\text{g}/\text{ml}$. L'effetto è stato valutato sin dalla sesta ora ed i singoli pozzetti sono stati fotografati dopo 24 ore dalla semina cellulare.

Immunoistochimica

L'immunoistochimica è una tecnica ampiamente utilizzata per l'identificazione e la localizzazione istologica di antigeni e di costituenti cellulari e tissutali in situ.

La tecnica si effettua dopo aver fissato la sezione sul vetrino, quindi la si fa reagire con l'anticorpo monoclonale specifico per la sostanza che si sta cercando, che nel nostro caso era IGFBP-3 e metalloproteasi 9; dato che all'anticorpo è associato un enzima questo scindendo il suo substrato colora col prodotto

ottenuto le zone del campo dove la sostanza è presente e le rende visibili al microscopio ottico come zone di colore marrone o rosso.

Analisi statistica

Per stabilire quali variabili relative ai pazienti inclusi nello studio fossero statisticamente correlate a bassi livelli sierici di IGFBP-3, i dati sono stati raccolti su foglio di lavoro Microsoft Excel ed analizzati attraverso tavole di contingenza create con test χ^2 e con il test ANOVA di confronto delle medie; un valore di $P \leq 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Per identificare un cut off valido per i livelli sierici di IGFBP-3 nei nostri pazienti, correlato alla presenza di malattia al momento del prelievo, abbiamo utilizzato una curva ROC.

I valori di IGF1 ed IGFBP-3 ottenuti rispettivamente con metodica RIA ed ELISA, sono stati aggiustati per sesso ed età come descritto da Friedrich et al. (190)

Il confronto tra i valori ottenuti con metodica ELISA riguardanti la concentrazione sierica di IGFBP-3 e ALS e valori ottenuti con metodica RIA per IGF1, è stato effettuato con test ANOVA di comparazione delle medie.

Le curve di sopravvivenza sono state costruite utilizzando il metodo Kaplan-Meier e confrontate mediante log-rank test.

L'analisi statistica è stata effettuata tramite MedCalc[®] version 8.0.0.0 su piattaforma Windows XP Home edition, Copyright[®] 1993-2005 Frank Schoonjans, licensed to Digerati.

RISULTATI

Le concentrazioni di IGFBP-3 sono risultate significativamente inferiori nei pazienti affetti da melanoma al IV stadio sia quando misurate mediante WB che mediante ELISA

Concentrazioni sieriche di IGFBP-3 stimate con metodica WB

Per valutare la quantità di IGFBP-3 nei sieri di 41 tra i pazienti arruolati e in quelli dei controlli sani, abbiamo effettuato l'analisi Western Blot utilizzando anticorpi commerciali anti-IGFBP-3. A differenza del metodo ELISA, questo tipo di analisi consente di valutare i livelli delle differenti forme di proteina; in particolare, consente di distinguere tra IGFBP-3 intatta e i suoi vari frammenti proteolitici.

La IGFBP-3 intatta, glicosilata ha forte affinità per gli IGFs circolanti e ne trasporta oltre il 95%, modulandone l'attività. (153)

Dopo ECL e audioradiografia, la IGFBP-3 sierica appariva in tre bande principali: le due più larghe (circa 40 e 42 kDa) corrispondenti a IGFBP-3 intatta, glicosilata e la banda più piccola (circa 30 kDa) corrispondente al principale frammento proteolitico della proteina, comprendente gli aminoacidi 1-160. Le bande di 40 e 42 KDa sono state quantizzate mediante ImageQuant software. Per valutare la concentrazione della proteina nei campioni di siero è stata utilizzata una curva standard ottenuta tramite IGFBP-3 commerciale.

Come mostrato in figura 12, la quantità di IGFBP-3 intatta nei campioni di siero era pressochè costante nei controlli sani, con un valore medio di 3,5 pmol/ μ L (figura 12). Valori medi simili sono stati ottenuti con i sieri dei pazienti affetti da melanoma in stadio I-III. Tuttavia, i valori di IGFBP-3 di questi ultimi pazienti hanno dimostrato maggiore variabilità rispetto ai controlli, probabilmente riflettendo una marcata eterogeneità per stadio e/o malattia. Infine, i pazienti al IV stadio di malattia mostravano concentrazioni sieriche molto ridotte di IGFBP-3 intatta, con un valore medio di circa 1 pmol/ μ L (figura 13), sebbene spesso si arrivasse a livelli non dosabili.

Figura 12: quantità di IGFBP-3 intatta nei campioni di siero nei controlli sani

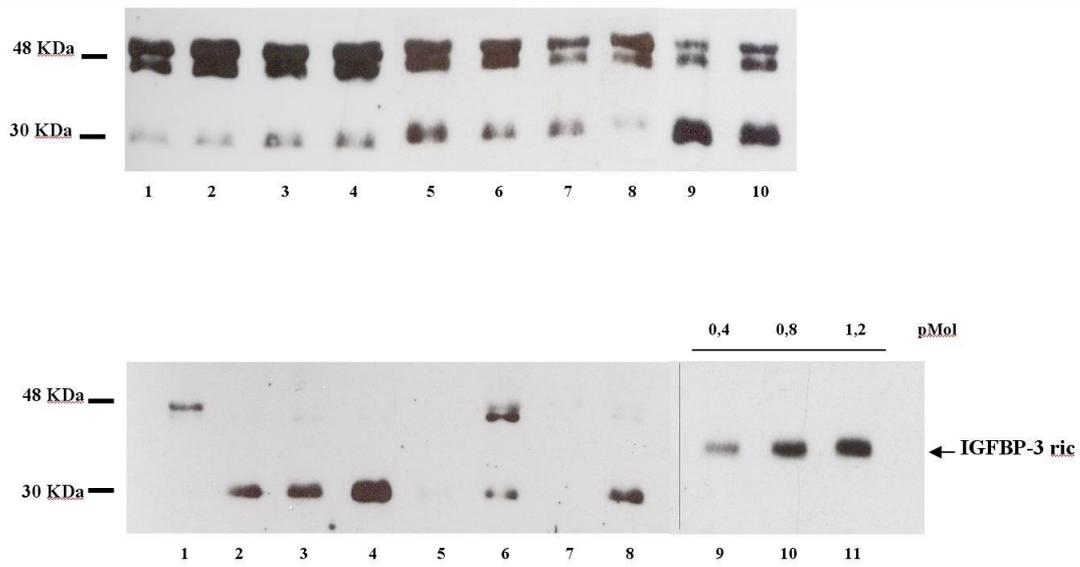
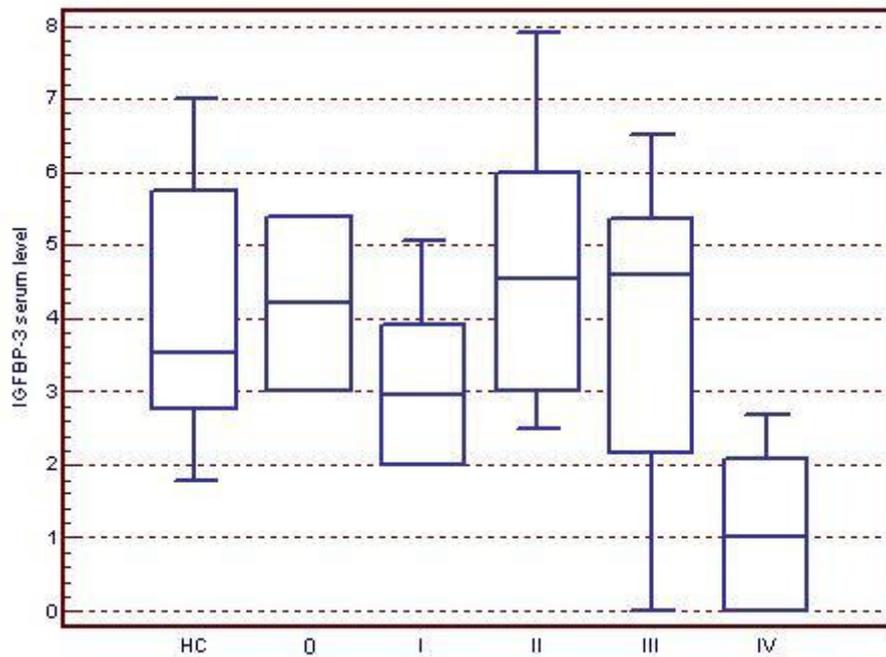


Figura 13: valore medio di IGFBP-3 nei sieri



Sulla base di un livello di cut-off pari a 2.7 pmol/μl, stabilito mediante curva ROC utilizzando la presenza di malattia al momento del prelievo come variabile indipendente, abbiamo suddiviso i pazienti in due gruppi.

Le tavole di contingenza, ottenute tramite test χ^2 , hanno dimostrato che i livelli di IGFBP-3 non correlavano con variabili quali il sesso, l'età, lo spessore di Breslow, il livello di Clark, la presenza di ulcerazione, l'istotipo di melanoma, lo stadio alla diagnosi, la familiarità e la presenza di melanomi multipli. Invece, correlazioni statisticamente significative sono state ottenute per variabili quali presenza di malattia al momento del prelievo, progressione e stadio al momento del primo prelievo, morte (tabella 4).

Tabella 4: correlazione tra i livelli sierici di IGFBP-3 valutati mediante WB e le variabili studiate

Caratteristiche dei pazienti (N = 41)	Numero	Pazienti con bassi livelli sierici di IGFBP-3 in WB	P value
Sesso Maschi Femmine	24 (58.5%) 17 (41.5%)	13 (54.1%) 9 (52.9%)	P = 0,8101
Età ≤40 41-60 >60	8 (19.5%) 13 (31.7%) 20 (48.8%)	3 (37.5%) 6 (46.1%) 13 (65.0%)	P = 0,3381 P (trend) = 0,1490
Spessore di Breslow ≤1.00 1.01-2.00 2.01-4.00 >4.00 Non valutabile (melanoma occulto)	10 (24.4%) 6 (14.6%) 11 (26.8%) 12 (29.3%) 2 (4.9%)	4 (40.0%) 3 (50.0%) 6 (54.5%) 7 (58.3%) 2 (100.0%)	P (trend) = 0,1771
Livello di Clark I II III IV V Non valutabile (melanoma occulto)	2 (4.9%) 4 (9.8%) 9 (21.9%) 15 (36.6%) 9 (21.9%) 2 (4.9%)	0 2 (50.0%) 4 (44.4%) 9 (60.0%) 5 (55.5%) 2 (100.0%)	P (trend)= 0,2225
Ulcerazione Assente Presente Non valutabile (melanoma occulto)	18 (43.9%) 21 (51.2%) 2 (4.9%)	8 (44.4%) 12 (57.1%) 2 (100.0%)	P = 0,6386
Istotipo SSM NM ALM Occulto	17 (41.5%) 21 (51.2%) 1 (2.4%) 2 (4.9%)	8 (47.0%) 12 (57.1%) 0 2 (100.0%)	P = 0,3497
Stadio alla diagnosi Stadio 0 Stadio 1 Stadio 2 Stadio 3 Stadio 4	2 (4.9%) 9 (21.9%) 18(43.9%) 12 (29.3%) 0	0 5 (55.5%) 11 (61.1%) 6 (50.0%) 0	P = 0,4242 P (trend) = 0,5670
Decesso Si No	18(43.9%) 23(56.1%)	14 (77.7%) 8 (34.7%)	P = 0,0153
Familiarità Si No	2 (4.9%) 39 (95.1%)	2 (100.0%) 20 (51.2%)	P = 0,5349
Presenza di malattia al momento del prelievo Si No	23 (56.1%) 18 (43.9%)	16 (69.5%) 6 (33.3%)	P = 0,0462
Melanomi multipli Si No	2 (4.9%) 39 (95.1%)	1 (50.0%) 21 (53.8%)	P = 0,5349
Progressione Si No	24 (58.5%) 17 (41.5%)	17 (70.8%) 5 (29.4%)	P = 0,0213
Stadio al momento del prelievo Stadio 0 Stadio 1 Stadio 2 Stadio 3 Stadio 4	2 (4.9%) 6 (14.6%) 8 (19.5%) 11 (26.8%) 14 (34.2%)	0 2 (33.3%) 2 (25.0%) 4 (36.3%) 14 (100.0%)	P = 0,0007 P (trend) = 0,0002

In sintesi, i pazienti affetti da malattia al IV stadio presentano concentrazioni sieriche significativamente ridotte di IGFBP-3, il che correla con un decorso più severo di malattia e con un maggior rischio di decesso (figura 13).

Concentrazioni sieriche di IGFBP-3 stimate con metodica ELISA

Per valutare la quantità di IGFBP-3 nei sieri dei pazienti arruolati e in quelli dei controlli sani, abbiamo effettuato anche l'analisi ELISA utilizzando anticorpi commerciali anti-IGFBP-3.

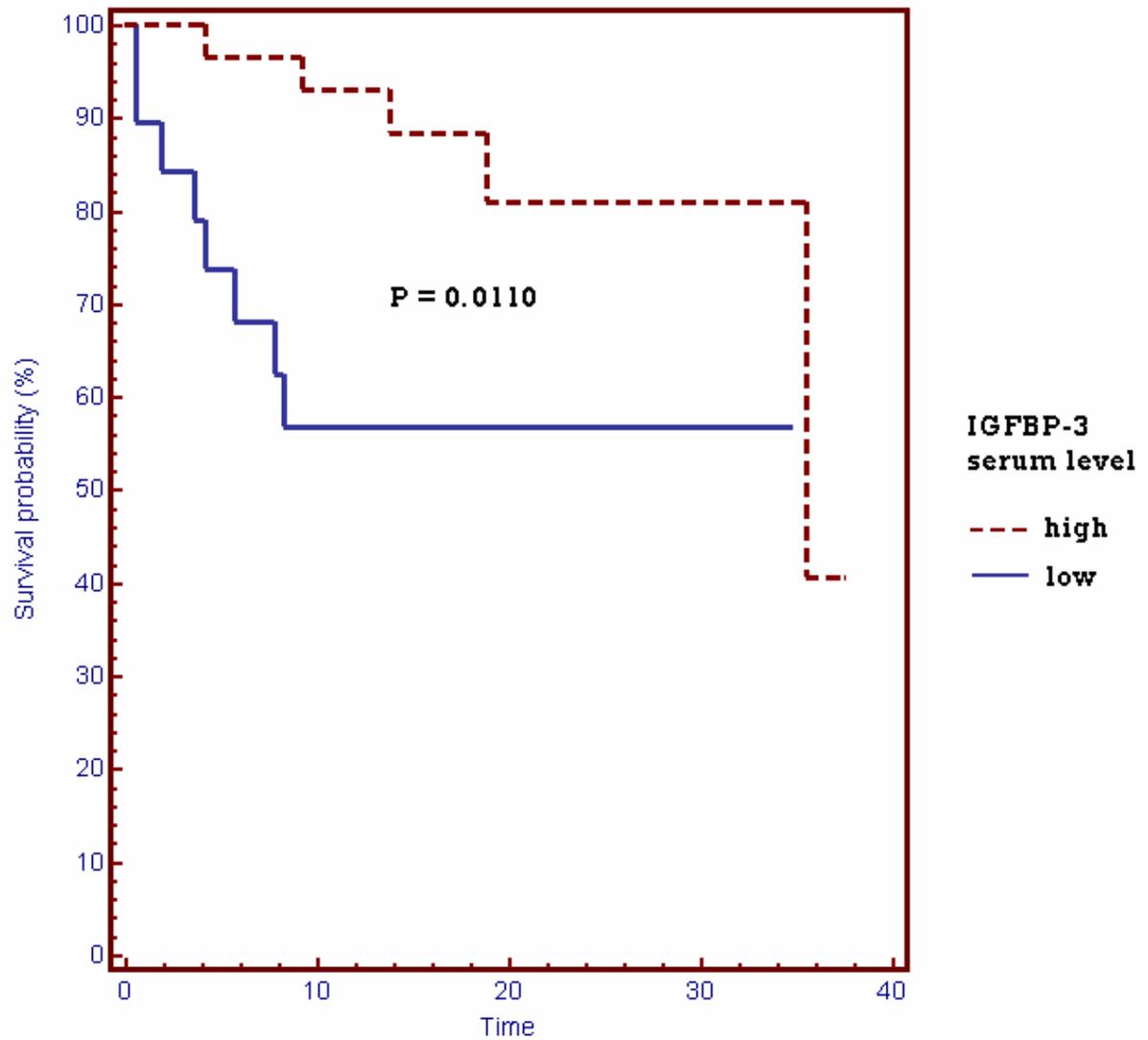
La correlazione tra le variabili prese in esame per i diversi pazienti e la concentrazione sierica di IGFBP-3, ottenuta mediante metodica ELISA, è stata effettuata tramite ANOVA test di confronto delle medie; tale indagine, come si evince dalla tabella 5, mostra significatività statistica per le variabili: stadio al momento del prelievo e volume metastatico.

A questo punto, abbiamo calcolato, tramite curva ROC, un valore cut-off dell'IGFBP-3, per poter discernere tra i pazienti che fossero o non fossero andati incontro a decesso. Abbiamo quindi costruito, secondo il metodo di Kaplan Meier e paragonato mediante log-rank test, le curve di sopravvivenza dei due gruppi di pazienti aventi valore elevato o basso di IGFBP-3. Tali curve sono risultate statisticamente ben differenziabili con una significatività pari a $P=0.011$ (Figura 14).

Tabella 5: correlazione tra i livelli sierici di IGFBP-3 valutati mediante ELISA e le variabili studiate mediante test ANOVA

Caratteristiche dei pazienti (N = 48)	N. pazienti (Valore medio IGFBP-3 in ng/ml)	P value
Sesso		
Maschi	25 4780,7517	P = 0,744
Femmine	23 4881,1966	
Età		
≤40	7 5193,5344	P = 0,592
41-60	17 4825,5782	
>60	24 4724,8643	
Spessore di Breslow		
≤1.00	9 5372,4164	P = 0,130
1.01-2.00	7 5026,7412	
2.01-4.00	17 4353,5847	
>4.00	12 5059,6402	
Occulto	3 4506,9185	
Ulcerazione		
Assente	20 5026,2152	P = 0,529
Presente	25 4709,6501	
Non valutabile	3 4506,9185	
Istologia		
SSM	24 5173,4689	P = 0,118
NM	20 4521,5990	
ALM	1 3670,3256	
Occulto	3 4506,9185	
Decesso		
No	35 4966,3123	P = 0,138
Si	13 4458,8755	
Presenza di malattia al momento del prelievo		
No	32 4982,4951	P = 0,153
Si	16 4521,6544	
Progressione		
No	26 5054,4924	P = 0,106
Si	22 4562,2505	
Stadio al prelievo		
Stadio 0	0	P = 0,020
Stadio 1	10 5252,9080	
Stadio 2	15 5040,5362	
Stadio 3	9 5108,4885	
Stadio 4	14 4119,4853	
Volume Metastatico tra 0 e 15cc oltre 15cc		
tra 0 e 15cc	36 5051,4858	P = 0,009
oltre 15cc	12 4161,0686	

Figura 14: sopravvivenza globale dei pazienti correlata ai valori di IGFBP-3; linea blu pazienti con bassi livelli di IGFBP-3, linea tratteggiata rossa pazienti con elevati livelli di IGFBP-3



Le concentrazioni di IGF-1 e ALS non sono risultate correlabili alla progressione di malattia

IGF1 e ALS, misurate rispettivamente mediante metodica RIA ed ELISA, non sono risultate statisticamente significative quando correlate alle variabili di interesse clinico quali la progressione di malattia, il decesso o lo stadio di malattia. Le concentrazioni sieriche di IGF-1 e ALS sono risultate dipendenti esclusivamente, come ci si aspettava, dall'età del paziente. Anche il rapporto tra le concentrazioni sieriche di queste due molecole (IGF-1/ALS) non è risultato statisticamente correlato alle variabili di interesse clinico, bensì solo al sesso dei pazienti. (Tabella 6)

Tabella 6: correlazione tra il rapporto IGF-1/ALS e le variabili studiate mediante test ANOVA

Caratteristiche dei pazienti (N = 48)	N. pazienti (Valore medio IGF1/ALS)		P value
Sesso			
Maschi	25	0,1897	P = 0,001
Femmine	23	0,1396	
Età			
≤40	8	0,1984	P = 0,138
41-60	16	0,1538	
>60	24	0,1627	
Spessore di Breslow			
≤1.00	9	0,1866	P = 0,444
1.01-2.00	7	0,1421	
2.01-4.00	17	0,1734	
>4.00	12	0,1536	
Occulto	3	0,1619	
Ulcerazione			
Assente	20	0,1669	P = 0,987
Presente	25	0,1652	
Non valutabile	3	0,1619	
Istologia			
SSM	24	0,1736	P = 0,527
NM	20	0,1599	
ALM	1	0,1010	
Occulto	3	0,1619	
Decesso			
Si	12	0,1693	P = 0,788
No	36	0,1645	
Presenza di malattia al momento del prelievo			
Si	16	0,1588	P = 0,528
No	32	0,1691	
Progressione			
Si	22	0,1676	P = 0,824
No	26	0,1641	
Stadio al prelievo			
Stadio 0	0		P = 0,938
Stadio 1	10	0,1682	
Stadio 2	15	0,1593	
Stadio 3	9	0,1641	
Stadio 4	14	0,1717	
Volume Metastatico tra 0 e 50cc	40	0,1612	P = 0,188
oltre 50cc	8	0,1883	

La ridotta biodisponibilità di IGF-1 sierico è risultata correlata alla sopravvivenza dei pazienti.

Per valutare l'effettiva biodisponibilità dell'IGF-1 nel siero dei pazienti arruolati, abbiamo tenuto in considerazione che l'IGFBP-3 è la proteina maggiormente implicata nel trasporto dell'IGF-1 libero.

Abbiamo, quindi, introdotto il valore IGF-1/IGFBP-3 ratio, onde ottenere un seppur approssimativo valore di IGF-1 libero capace, quindi, di mediare i suoi effetti proliferativi e antiapoptotici a livello dei tessuti.

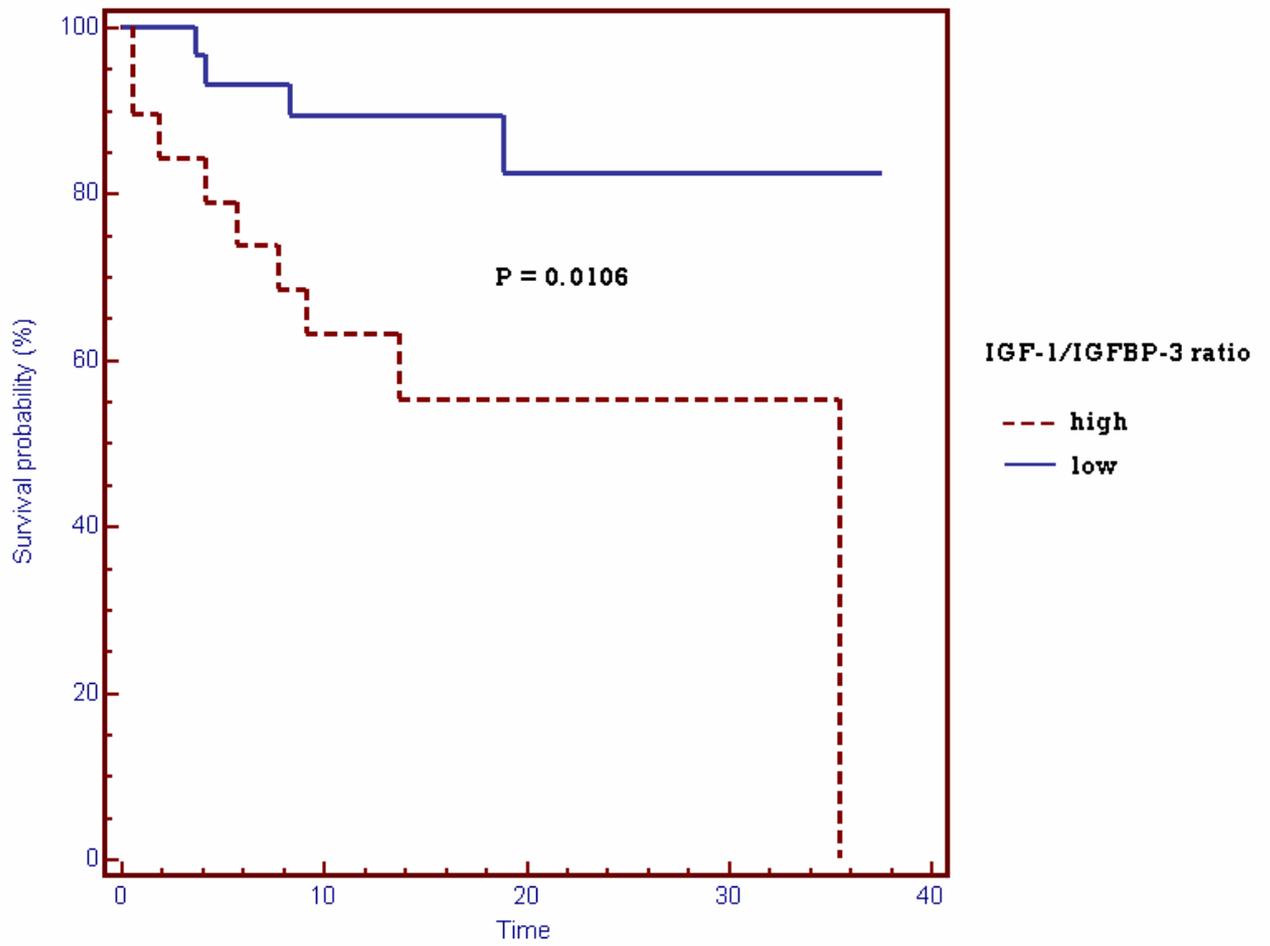
Tale valore è risultato statisticamente correlato con l'età ($P=0,006$) ed il sesso ($P=0,015$); un valore al limite della significatività è stato riscontrato anche per il volume metastatico ($P=0,057$). (Tabella 7)

Tabella 7: correlazione tra il rapporto IGF-1/IGFBP-3 e le variabili studiate mediante test ANOVA

Caratteristiche dei pazienti (N = 48)	N. pazienti (Valore medio IGF1/IGFBP-3)		P value
Sesso			P = 0,015
Maschi	25	6,1935	
Femmine	23	5,1392	
Età			P = 0,006
≤40	7	7,3294	
41-60	17	5,3785	
>60	24	5,4290	
Spessore di Breslow			P = 0,876
≤1.00	9	5,5030	
1.01-2.00	7	6,1181	
2.01-4.00	17	5,8069	
>4.00	12	5,5458	
Occulto	3	5,1393	
Ulcerazione			P = 0,696
Assente	20	5,8729	
Presente	25	5,6065	
Non valutabile	3	5,1393	
Istologia			P = 0,123
SSM	24	5,8264	
NM	20	5,4407	
ALM	1	8,9716	
Occulto	3	5,1393	
Decesso			P = 0,063
No	35	5,4387	
Si	13	6,3602	
Presenza di malattia al momento del prelievo			P = 0,382
No	32	5,5503	
Si	16	5,9642	
Progressione			P = 0,515
No	26	5,5542	
Si	22	5,8467	
Stadio al prelievo			P = 0,398
Stadio 0	0		
Stadio 1	10	5,3555	
Stadio 2	15	5,3519	
Stadio 3	9	5,7662	
Stadio 4	14	6,2364	
Volume Metastatico tra 0 e 15cc			P = 0,057
oltre 15cc	36	5,4463	
	12	6,4142	

A questo punto, abbiamo calcolato, tramite curva ROC, un valore cut-off del rapporto IGF-1/IGFBP-3, per poter discernere tra i pazienti che fossero o non fossero andati incontro a decesso. Abbiamo quindi costruito, secondo il metodo di Kaplan Meier e paragonato mediante log-rank test, le curve di sopravvivenza dei due gruppi di pazienti aventi valore elevato o basso di IGF-1/IGFBP-3 ratio. Tali curve sono risultate statisticamente ben differenziabili con una significatività pari a $P=0.0106$ (Figura 15).

Figura 15: sopravvivenza globale dei pazienti correlata ai valori di IGF-1/IGFBP-3 Ratio; linea blu pazienti con bassa biodisponibilità di IGF-1, linea tratteggiata rossa pazienti con elevata biodisponibilità di IGF-1



La progressione di malattia nei pazienti si accompagna a una riduzione dei livelli sierici di IGFBP-3 misurati mediante WB

Allo scopo di validare i risultati sopra descritti, abbiamo effettuato ulteriori misurazioni dei livelli sierici di IGFBP-3 nei sieri degli stessi pazienti ottenuti da campioni di sangue prelevati durante il follow-up dopo la diagnosi di melanoma.

Sono stati valutati dieci pazienti; tra questi, alcuni erano liberi da malattia da almeno 14 mesi, mentre altri erano andati incontro a progressione di malattia ed in alcuni casi a morte.

Per evitare bias soggettivi, prima di effettuare l'analisi Western Blot, a ciascun siero è stato attribuito un codice non noto allo sperimentatore che ha effettuato l'allestimento dei gel e l'analisi quantitativa. Solo dopo l'analisi dei dati e la quantizzazione di IGFBP-3 i codici sono stati rivelati e i valori ottenuti attribuiti ai rispettivi pazienti.

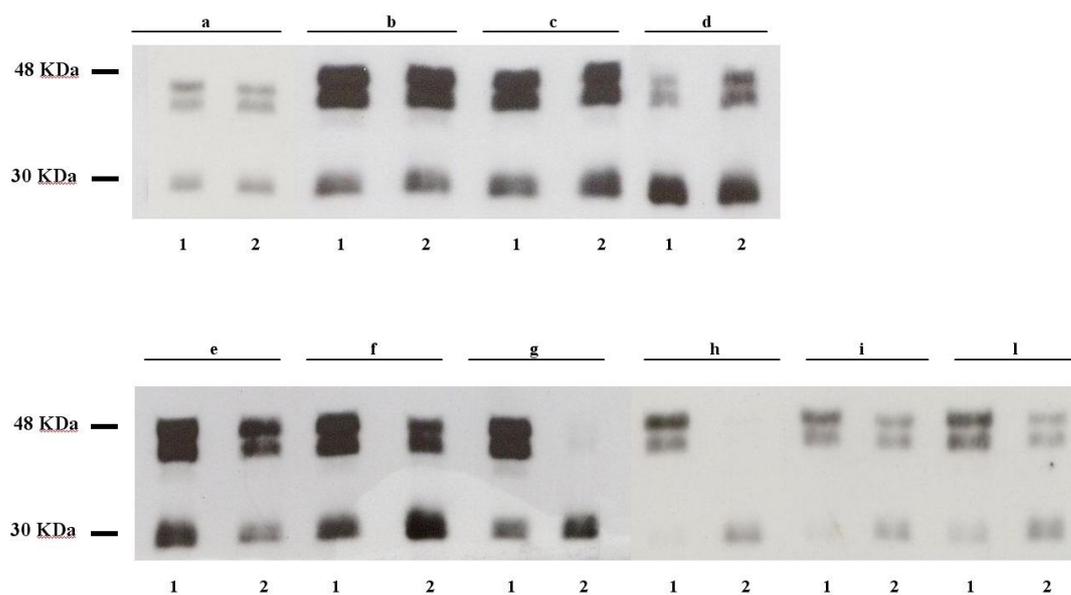
I risultati, mostrati in figura 15, ancora una volta hanno dimostrato la stretta correlazione esistente tra la concentrazione sierica di IGFBP-3 intatta e la progressione di malattia.

Tutti i 4 pazienti stabili a 14 mesi di follow up presentavano valori sostanzialmente costanti di IGFBP-3 sierica. Inoltre, uno di questi pazienti, sottoposto a terapia con interferon- α dopo l'exeresi chirurgica del melanoma primitivo, ha presentato un lieve aumento dei livelli di IGFBP-3 (Figura 16d).

Invece, in tutti i 6 pazienti affetti da malattia in progressione, le concentrazioni

di IGFBP-3 erano significativamente ridotte; inoltre, una più bassa concentrazione di proteina era associata con uno stadio più avanzato di malattia e/o con la morte del paziente.

Figura 16: correlazione tra la concentrazione sierica di IGFBP-3 intatta e progressione di malattia



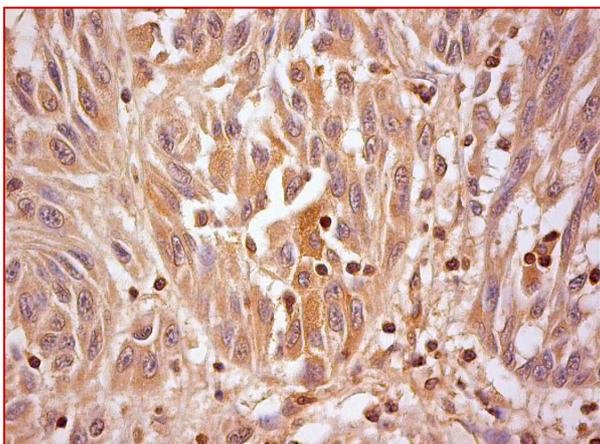
L'espressione di IGFBP-3, valutata in immunistochemica, è maggiore nei melanomi primitivi rispetto alle metastasi sia linfonodali che dermiche.

L'espressione di IGFBP-3 è stata valutata anche con immunistochemica su tessuto, su melanoma primitivo, metastasi linfonodale e metastasi dermica, mostrando differenti gradi di positività citoplasmatica e nucleare.

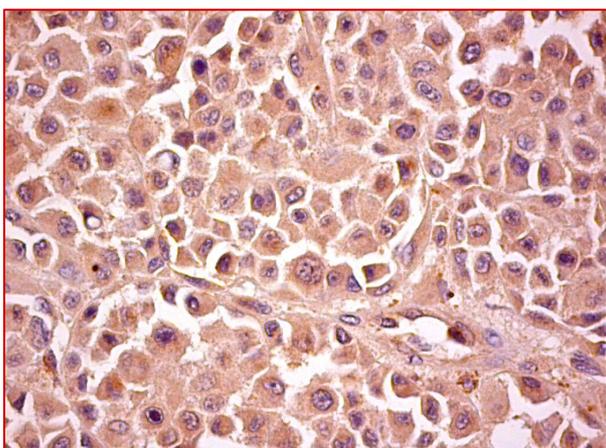
In particolare, a livello del tumore primitivo la positività per IGFBP-3 è risultata più evidente in circa il 5% delle cellule della neoplasia; nelle metastasi linfonodali e nelle metastasi dermiche IGFBP-3 è risultata maggiormente espressa nelle cellule che compongono lo stroma connettivale peritumorale rispetto ai nidi di cellule metastatiche vere e proprie. (Figura 17)

Prendendo in considerazione la positività immunistochemica all'IGFBP-3 delle sole cellule tumorali, i melanomi primitivi hanno mostrato una maggiore espressione di tale proteina rispetto alle metastasi. (Figura 18)

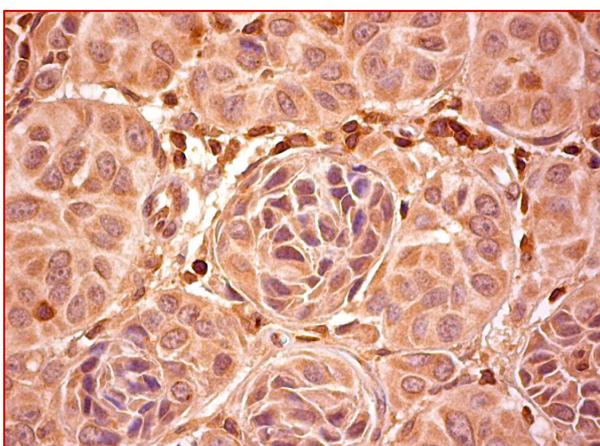
Figura 17: Espressione di IGFBP-3 in melanomi primitivi e metastatici: l'IGFBP 3 è espressa nelle cellule di melanoma con differenti gradi di positività citoplasmatica e nucleare.



Melanoma primitivo

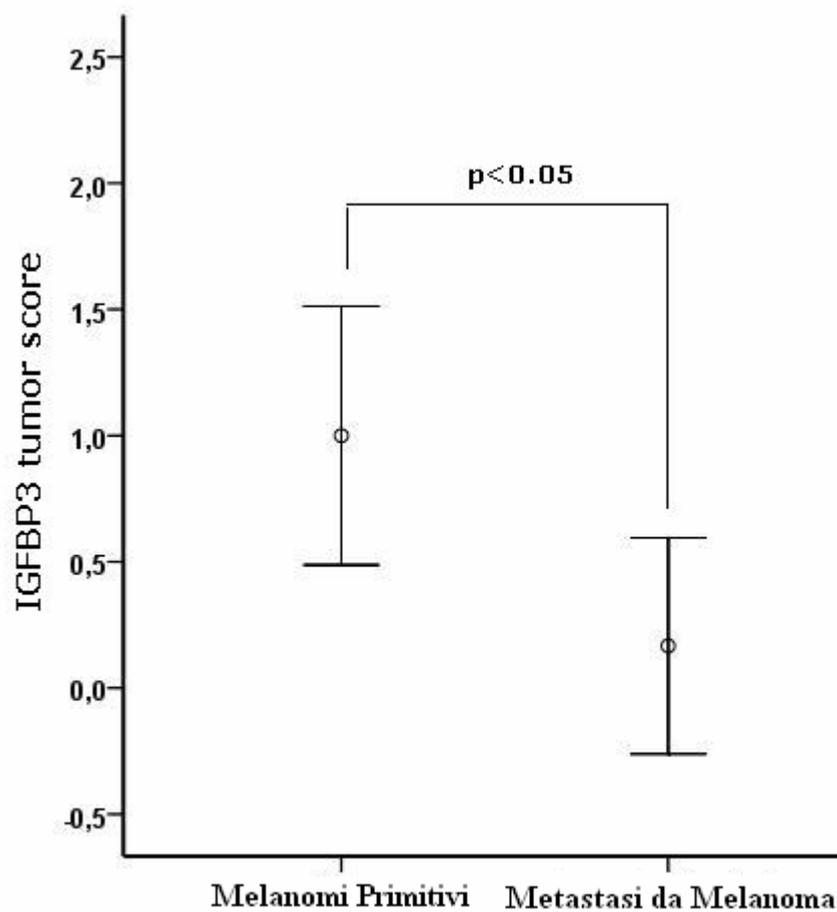


Metastasi linfonodale



Metastasi dermica

Figura 18: Espressione di IGFBP-3 è significativamente maggiore nei melanomi primitivi che nelle metastasi

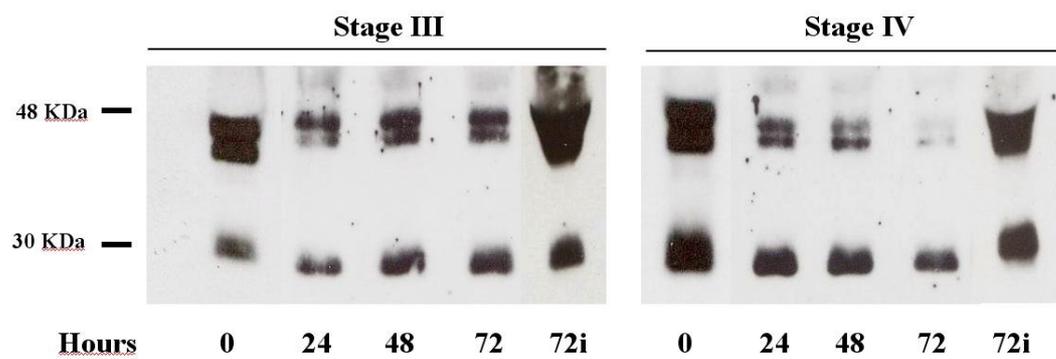


Nel siero dei pazienti al IV stadio di malattia la riduzione dei valori di IGFBP-3 è mediata da specifici processi proteolitici assenti nel siero dei pazienti in stadio dallo 0 al III

La produzione di proteasi è un evento che facilita la progressione tumorale in diversi tipi di neoplasie.

Per verificare se la riduzione dell'IGFBP-3 nel siero dei pazienti in stadio avanzato di malattia potesse essere attribuibile a specifici processi proteolitici abbiamo incubato per tre giorni alla temperatura di 37°C, due aliquote di siero provenienti dallo stesso paziente, ma prelevate la prima quando egli si trovava in stadio III di malattia e la seconda quando, a seguito di progressione, il paziente era in stadio IV. Ad entrambe le aliquote sono state aggiunte quantità uguali di IGFBP-3 glicosilata in modo da poter avere valori di tale proteina rilevabili all'indagine WB. Dopo 72 ore di incubazione la concentrazione di IGFBP-3 nel siero raccolto al IV stadio non era più rilevabile, mentre subiva solo un lieve decremento nel siero ottenuto dal paziente al momento del III stadio di malattia. L'aggiunta di inibitori aspecifici di proteasi (PMSF, aprotidina, e leupeptina) ha permesso di osservare il blocco della degradazione di IGFBP-3 anche nel siero raccolto dal paziente al IV stadio di malattia. (Figura 19)

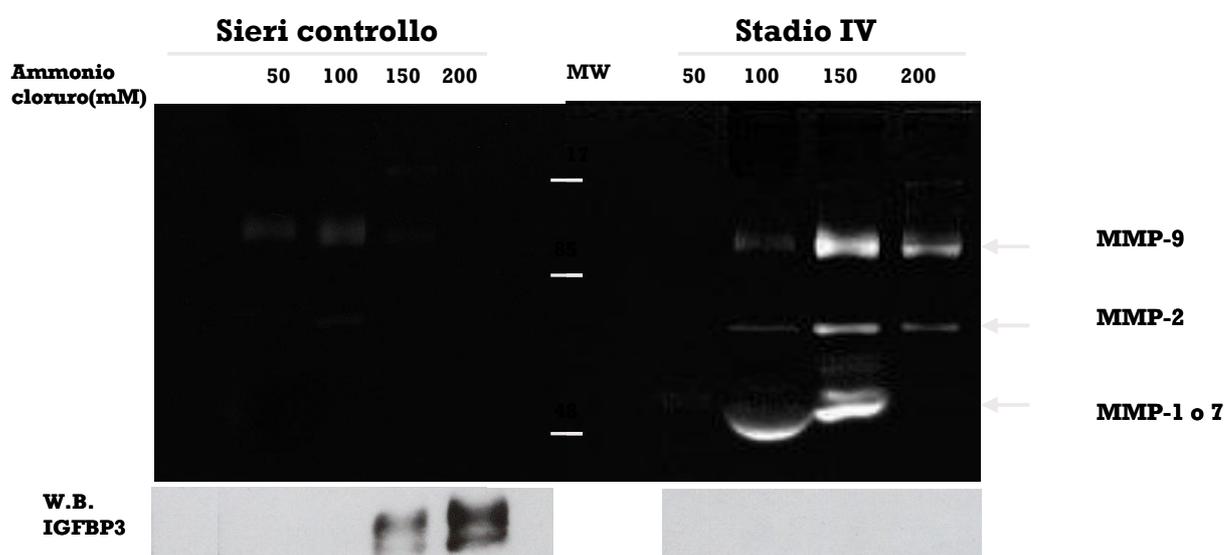
Figura 19: Clivaggio proteolitico dell'IGFBP-3 nel siero di un singolo paziente prelevato prima e dopo la progressione di malattia.



Nel siero dei pazienti al IV stadio sono presenti metalloproteasi 1, 2, 7 e 9.

E' stato condotto un saggio di zimografia sui campioni di siero dei pazienti al IV stadio di malattia e su sieri provenienti da donatori sani. Il test ha evidenziato la presenza, nei pazienti al IV stadio, delle metalloproteasi 1, 2, 7 e 9 mentre nei controlli non è stata rilevata alcuna positività. Sugli stessi campioni è stato eseguito anche un western blot che ha dimostrato la presenza dell'IGFBP-3 intatta nei controlli e la sua assenza nei pazienti al IV stadio di malattia. (Figura 20)

Figura 20 Identificazione delle gelatinasi attraverso la zimografia nei sieri dei controlli sani e dei pazienti affetti da melanoma



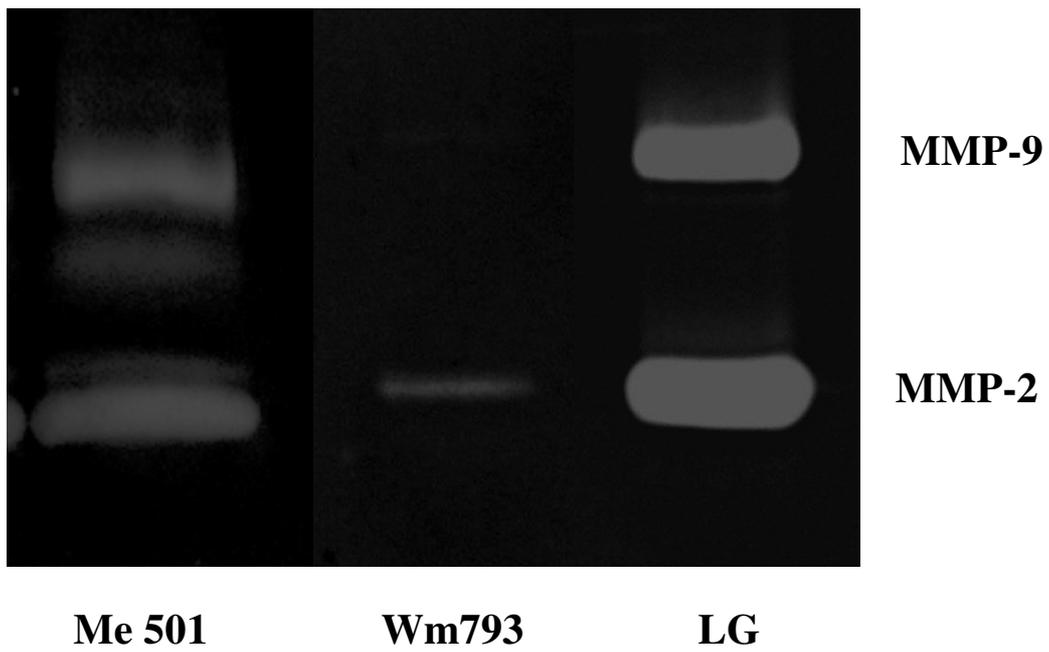
Le linee cellulari di melanoma producono metalloproteasi che degradano IGFBP-3.

Per valutare la presenza di proteasi in grado di degradare IGFBP-3 prodotte da cellule di melanoma in coltura, il terreno di coltura delle nostre linee cellulari è stato addizionato con IGFBP-3 ricombinante; in seguito è stato condotto un WB sul sovrinatante di queste cellule, al tempo 0 e dopo 96 ore di incubazione per verificare la degradazione di IGFBP-3.

Il test ha dimostrato che linee cellulari di melanoma producono proteasi che degradano IGFBP-3 (Figura 21) e la successiva zimografia ha mostrato la presenza delle metalloproteasi 2 e 9 (Figura 22)

Figura 22 Le linee cellulari di melanoma producono MMPS in vitro e in vivo

Medium serum-free(24h)

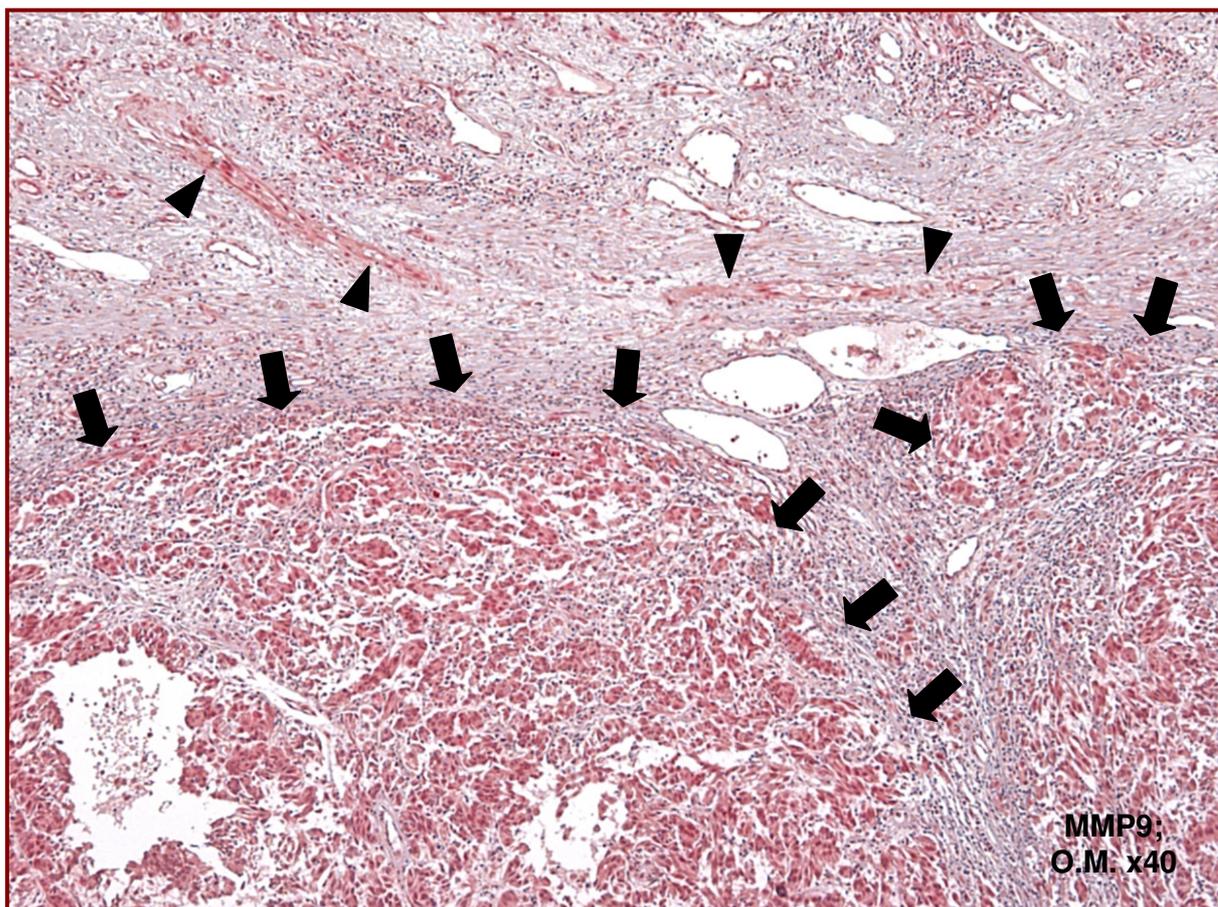


La metalloproteasi 9 è espressa dalle cellule di melanoma primitivo.

A conferma dei dati ottenuti tramite zimografia abbiamo voluto verificare mediante immunostochimica l'espressione della metalloproteasi 9 su alcuni melanomi primitivi;

La MMP 9 è risultata fortemente positiva sia nelle cellule di melanoma che a livello vasale (Figura 23).

Figura 23 Espressione di MMP9 nei melanomi primitivi: MMP9 è espressa nelle cellule di melanoma ed a livello vasale



L'aggiunta di IGFBP-3 ricombinante al terreno di cellule di melanoma in coltura (Me-501) riduce la motilità cellulare.

E' stato effettuato lo scratch test sulle linee cellulari in studio (Wm-793, Me-501 ed LG) in condizioni basali per valutare la capacità e la cinetica di migrazione delle cellule appartenenti alle tre linee. A 24 ore sia le Me-501 che le LG mostravano di aver completamente richiuso la "ferita", mentre le Wm-793 non mostravano capacità migratoria (Figura 24).

Abbiamo voluto valutare come l'aggiunta di IGFBP-3 ricombinante esogeno potesse influenzare la motilità. L'esperimento è stato condotto sulle cellule Me-501; è stato effettuato lo scratch test sulle cellule in condizioni basali e dopo aggiunta di IGFBP-3 ricombinante esogeno al dosaggio di 1,5ng/ml. A 24 ore abbiamo osservato che, in presenza di IGFBP-3, le cellule diminuiscono significativamente la motilità (Figura 25). Pertanto abbiamo esguito anche l'esperimento opposto, cioè lo scratch test dopo l'aggiunta di un anticorpo specifico per IGFBP-3; il risultato ottenuto ha dimostrato che, in queste condizioni, le cellule non solo riacquistano la motilità, ma perdono l'aderenza dal substrato rimanendo in sospensione; attraverso il test del Trypan blue abbiamo dimostrato che queste cellule sono comunque vitali (Figura 26).

Figura 24 Scratch test su linee cellulari di melanoma

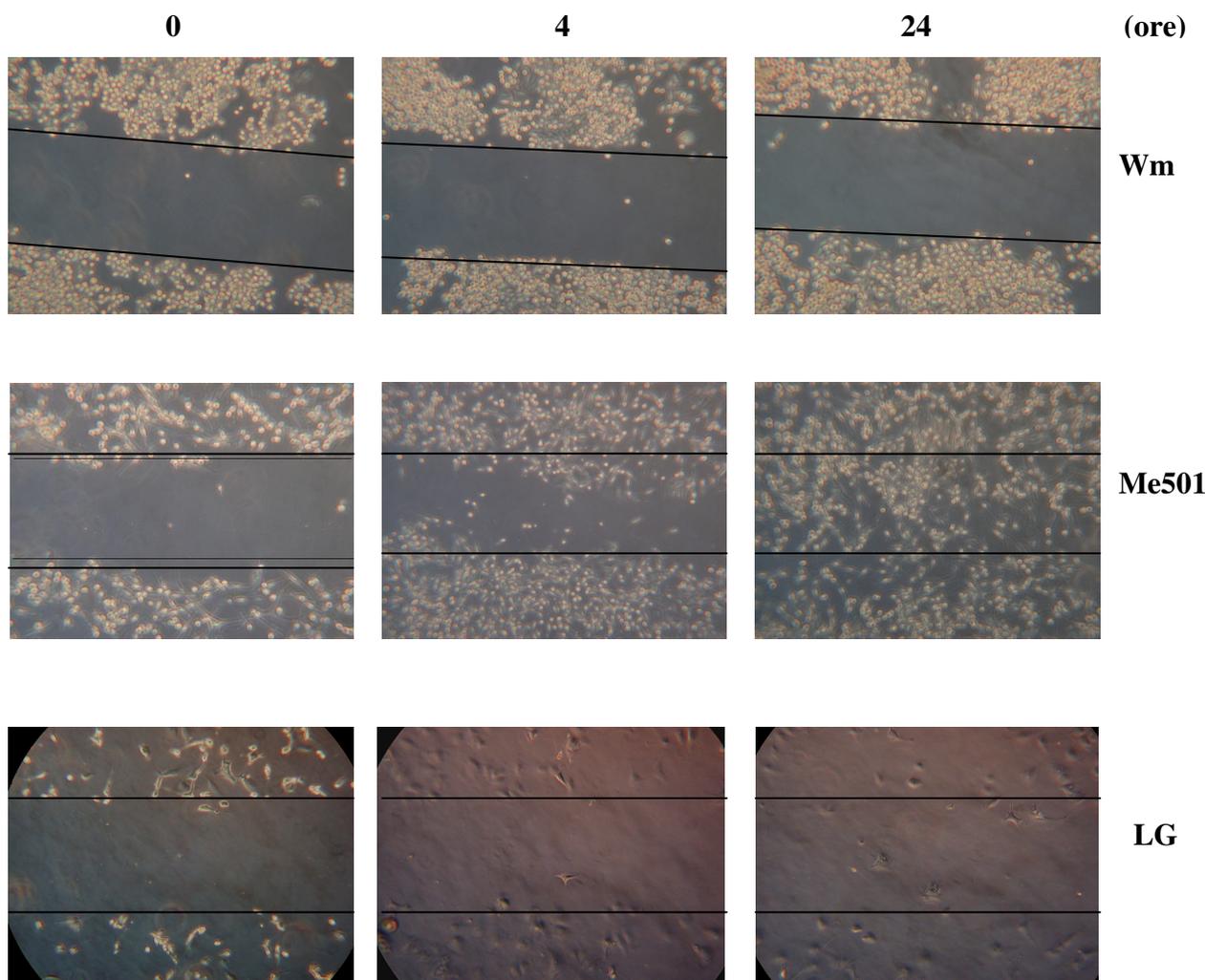


Figura 25 Scratch test su cellule Me-501 in assenza e dopo aggiunta di IGFBP-3 ricombinante e dopo aggiunta di un anticorpo specifico per IGFBP-3

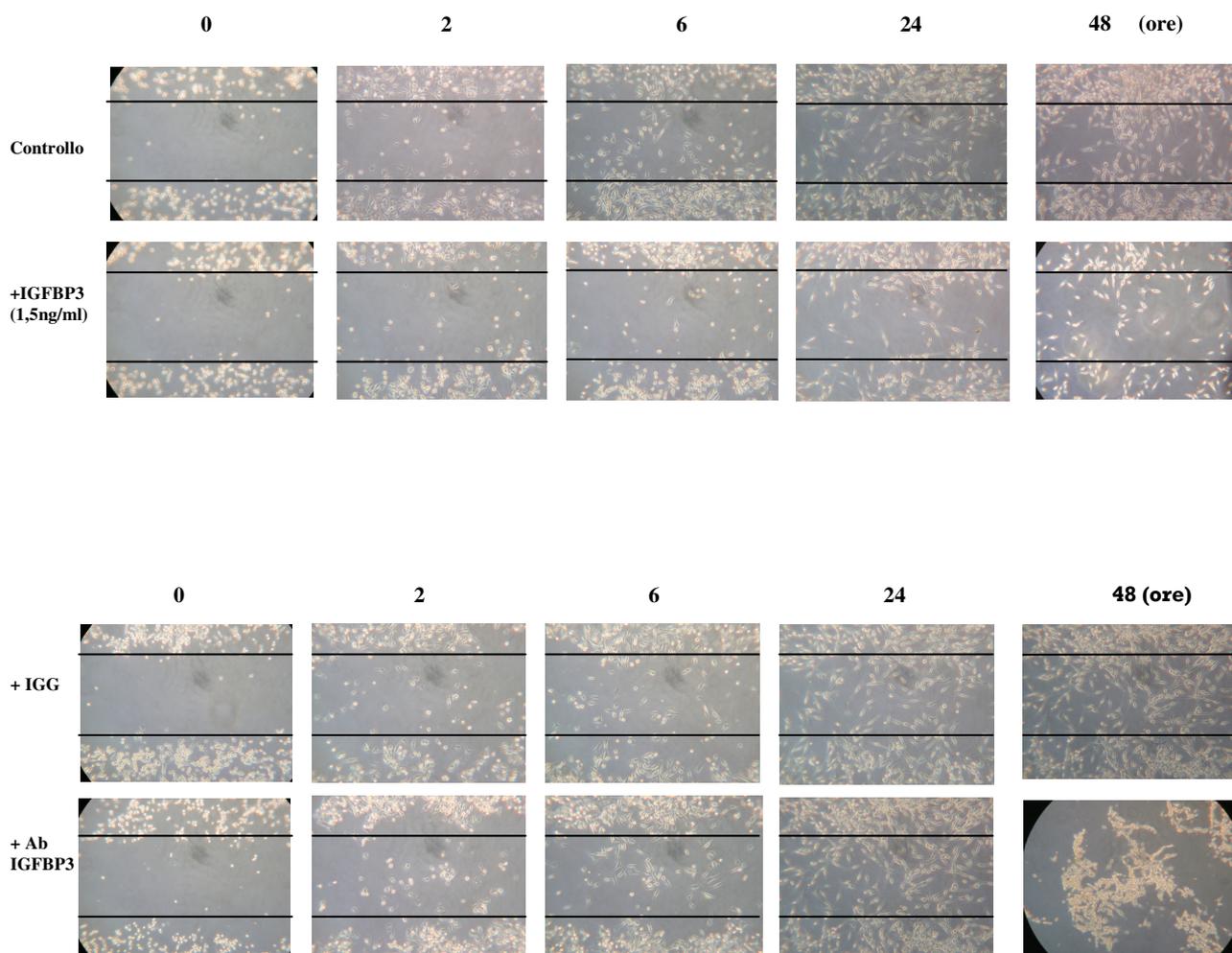
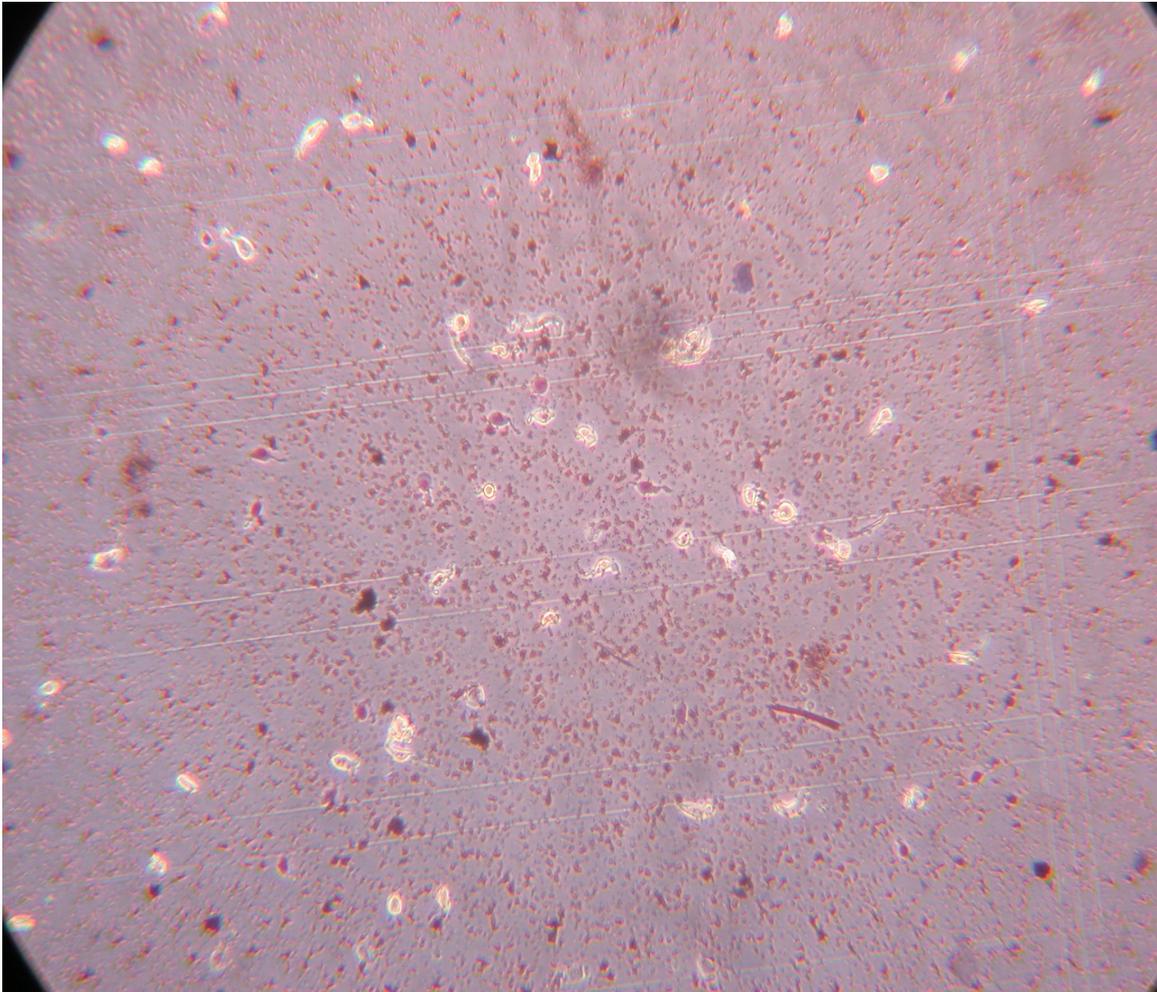


Figura 26 Test del Trypan blue



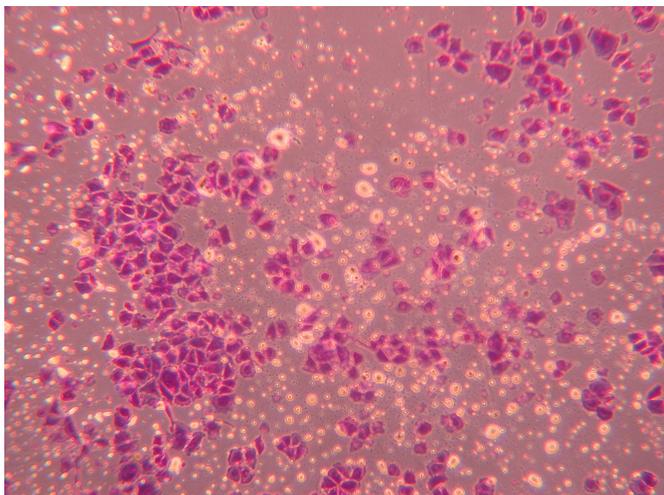
L'aggiunta di IGFBP-3 ricombinante al terreno di cellule di melanoma in coltura (Me-501) riduce la capacità migratoria di tali cellule.

L'invasività delle cellule di melanoma è stata valutata con la metodica di invasione del Matrigel (strato di membrana basale ricostituita in vitro) adeso alla membrana di separazione tra il compartimento superiore ed inferiore di una camera di Boyden. La possibilità delle cellule di oltrepassare tale barriera anatomica è indicativa delle proprietà invasive delle cellule.

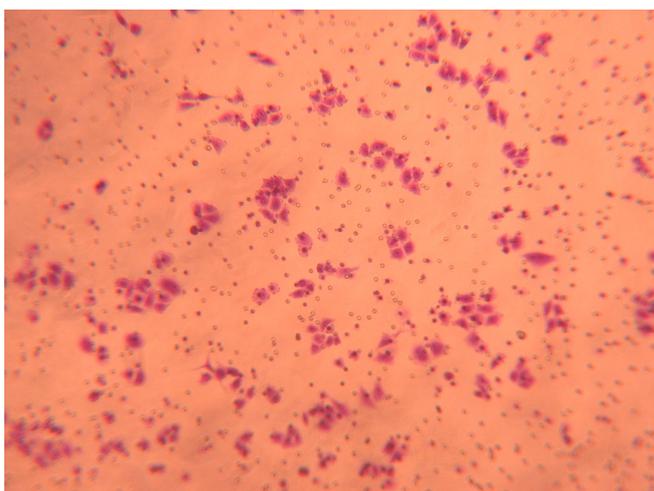
Otto pozzetti sono stati utilizzati come controllo ed in 16 è stata aggiunta IGFBP-3 ricombinante a diversa concentrazione, rispettivamente in 8 a 2,5µg/ml ed in altri 8 a 5µg/ml. L'effetto è stato valutato sin dalla sesta ora ed i singoli pozzetti sono stati fotografati dopo 24 ore dalla semina cellulare.

La capacità migratoria delle cellule Me-501 è risultata notevolmente diminuita in presenza di IGFBP-3 con un effetto correlato alla dose. (Figura 27)

Figura 27 Test di invasione del Matrigel condotto su cellule Me-501 in assenza (A) e dopo aggiunta di IGFBP-3 ricombinante alla dose di 2,5 μ g/ml (B) e 5 μ g/ml (C).



A: Controllo



B: + IGFBP-3 alla dose di

2,5 μ g/ml



C: + IGFBP-3 alla dose di 5 μ g/ml

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il melanoma rappresenta una neoplasia la cui incidenza è in continuo aumento in tutto il mondo.(154)

La sopravvivenza dei pazienti varia notevolmente a seconda dello stadio di malattia alla diagnosi: infatti, a 5 anni risulta inferiore al 20% per i pazienti al IV stadio di malattia, mentre è prossima al 90% in caso di malattia localizzata.(155)

Come detto in precedenza, nella maggior parte dei melanomi sono state riscontrate delle mutazioni “attivanti” (ad esempio, BRAF V600E) di uno o più segnali intracellulari che fisiologicamente sono innescati dal legame di IGF-1 al proprio recettore, IGFIR.(156) Un’aumentata biodisponibilità di IGF-1 nei pazienti affetti da melanoma potrebbe perciò essere un fattore legato all’eventuale progressione di malattia. IGFBP-3 è nota come la principale proteina di trasporto per gli IGFs circolanti, nonché la più importante proteina modulatrice dell’attività di questi fattori. In particolare, IGFBP-3 controlla la disponibilità degli IGFs, che non possono esercitare la loro attività favorente la proliferazione se legati a tale proteina.

L’ipotesi che nei pazienti con stadio di malattia più avanzato potesse esistere un microambiente particolare capace sia di innescare che di favorire la crescita tumorale, ci ha portato a valutare i livelli sierici di IGFBP-3 nei soggetti affetti da melanoma.

Nel nostro studio abbiamo dimostrato l’esistenza di una stretta correlazione tra i livelli sierici di IGFBP-3 intatta, glicosilata e lo stadio di malattia nei pazienti

affetti da melanoma. Infatti la diffusione metastatica è risultata associata ad una marcata riduzione della concentrazione sierica di IGFBP-3, che diventa addirittura indosabile negli stadi più avanzati. Inoltre, è stato possibile valutare questo dato nella storia clinica dei singoli pazienti, osservando una riduzione di IGFBP-3 in quelli andati in progressione e, al contrario, livelli stabili di tale proteina in coloro in cui non si sia osservata progressione.

La proteolisi selettiva di IGFBP-3 è una delle strade per controllare il rilascio degli IGFs, dal momento che i vari frammenti di IGFBP-3 hanno una ridotta affinità per gli IGFs rispetto alla proteina intatta.(157) Quindi, la riduzione dei livelli sierici di IGFBP-3 potrebbe rappresentare una strategia mediante la quale il melanoma incrementa il suo potenziale metastatico, assicurando una maggiore disponibilità di IGFs.

Tale concetto è rafforzato dai dati del nostro studio riguardanti la reale biodisponibilità sierica dell'IGF-1 nei nostri pazienti. I nostri dati, infatti, sottolineano come il rapporto IGF-1/IGFBP-3 possa essere considerato un affidabile marker sierico prognostico. Tale rapporto ci consente infatti di differenziare due sottogruppi di pazienti, aventi non solo diversa prognosi *quod vitam* (sopravvivenza a 20 mesi 85% VS 55%) ma anche differenti intervalli liberi da malattia. Sulla base di questo dato potremmo ipotizzare che laddove siano presenti un maggior numero di cellule tumorali ci sia anche una maggiore produzione di proteasi specifiche per IGFBP-3 con conseguente aumentata biodisponibilità di IGF-1.

Per quanto riguarda i dosaggi sierici di IGFBP-3, seppur più dispendiosa sia in termini di tempo che in termini economici, la metodica WB è risultata maggiormente appropriata e sensibile e ci ha consentito di poter valutare la reale concentrazione di proteina intatta nel siero dei pazienti.

I livelli sierici di IGFBP-3 valutati secondo WB sono risultati correlati non solo con lo stadio di malattia al momento del prelievo, ma anche con la sopravvivenza stessa dei pazienti.

I livelli sierici di IGFBP-3 valutati, invece, utilizzando la metodica ELISA ed aggiustati per sesso ed età, come precedentemente descritto in letteratura (190), pur non avendo fornito dati relativi all'integrità della proteina, sono risultati statisticamente correlati, non solo allo stadio della malattia al momento del prelievo ma anche al volume metastatico. Infatti, pazienti con più di 15 cm³ di metastasi al momento del prelievo, mostravano livelli sierici significativamente più bassi di IGFBP-3. Bassi valori di questa proteina nel siero, seppur misurati con una metodica meno raffinata quale l'ELISA, sono risultati comunque correlati a prognosi più infausta (sopravvivenza a 20 mesi 82% VS 55%).

Il fatto che le indagini da noi condotte abbiano messo in luce che nel siero dei pazienti affetti da melanoma, IGFBP-3 esista sia come proteina integra che frammentata da processi proteolitici, ci ha portato a postulare che il test ELISA riconosca anche alcuni frammenti proteici come se fossero proteine intatte.

IGFBP-3 è anche nota per la sua attività intrinseca proapoptotica ed antiproliferativa, indipendente dagli IGFs.

Il decremento dei valori sierici di IGFBP-3 nei pazienti portatori di metastasi viscerali, potrebbe dipendere da diversi fattori; alcuni Autori (147) hanno messo in evidenza, attraverso indagini immunohistochimiche, come, nel tessuto di metastasi da melanoma, tale proteina sia maggiormente espressa in forma legata alla membrana delle cellule metastatiche stesse; secondo questo dato potremmo ipotizzare che nei pazienti al IV stadio di malattia il livello sierico di IGFBP-3 diminuisca in seguito al sequestro della stessa proteina da parte dei tessuti metastatici; i nostri dati immunohistochimici confermano solo parzialmente tali osservazioni; infatti, a livello del tessuto metastatico, le maggiori concentrazioni di IGFBP-3 sembrano osservarsi più a livello dello stroma connettivale peritumorale che a livello delle cellule tumorali stesse. Altri Autori (158), studiando linee cellulari di neoplasia del colon, hanno verificato che tali cellule sono in grado di produrre proteasi specifiche per IGFBP-3: l'analisi di questo dato confermerebbe l'ipotesi che nei pazienti metastatici le cellule di melanoma producano un fattore proteolitico in grado di degradare selettivamente IGFBP-3, determinandone una riduzione della concentrazione sierica.

Secondo i nostri dati, la riduzione dei livelli sierici di IGFBP-3 nei pazienti affetti da malattia al IV stadio è probabilmente attribuibile alla sua frammentazione da parte di proteasi prodotte dalla neoplasia. Alcuni Autori hanno infatti già dimostrato che le linee cellulari di melanoma BRAF mutate, e quindi con attivazione costitutiva del RAS/RAF/ERK pathway, producono maggiori quantità di metalloproteasi-1 (MMP-1), (159) la quale è in grado di

degradare l'IGFBP-3. Questo potrebbe creare una sorta di "circuito" a feedback positivo, in cui la riduzione di IGFBP-3 renderebbe maggiormente disponibili gli IGFs e promuoverebbe, attraverso l'attivazione del RAS/RAF/ERK pathway, l'ulteriore produzione di MMP-1, determinando una progressiva crescita del potenziale metastatico e la disseminazione della malattia. Molti autori sottolineano il ruolo svolto anche da altre MMP, come la 2 e la 9, nella progressione di malattia. Come descritto in letteratura, anche nel nostro studio l'immunoistochimica condotta su melanoma primitivo ha dimostrato la positività per la MMP-9. Inoltre è stato possibile valutare, attraverso il test della zimografia, la presenza di MMP 1, 2, 7 e 9 (che sono delle gelatinasi per cui il test è specifico) anche nel siero dei pazienti al IV stadio di malattia.

I nostri risultati suggeriscono che la frammentazione di IGFBP-3 rappresenti una delle vie attraverso le quali le cellule di melanoma possano acquisire una maggiore capacità invasiva, indicando, perciò, un possibile utilizzo terapeutico di questa proteina. È stato dimostrato, in linee cellulari provenienti da cancro del polmone, che la somministrazione esogena di IGFBP-3 riduce significativamente la migrazione e l'invasione delle cellule neoplastiche in vitro (160). Abbiamo pertanto voluto valutare l'effetto della somministrazione esogena di IGFBP-3 su linee cellulari di melanoma osservando che, nelle cellule addizionate di IGFBP-3, la motilità era fortemente ridotta. Somministrando invece, alle cellule un anticorpo specifico per IGFBP-3, queste non solo

riacquistano la motilità, ma perdono l'aderenza dal substrato, rimanendo comunque vitali, come dimostrato dal test del Trypan blue.

Il nostro studio, attraverso il test di invasività del Matrigel, ha inoltre dimostrato che la capacità migratoria delle cellule di melanoma diminuisce notevolmente in presenza di IGFBP-3 con un effetto correlato alla dose. Possiamo quindi ipotizzare che IGFBP-3 rivesta un ruolo fondamentale nel determinare le capacità di migrazione e quindi di invasione di cellule di melanoma.

Le prospettive future del nostro studio sono quelle di valutare in sistemi avanzati, come ad esempio quello murino, l'utilità della IGFBP-3 a scopo terapeutico nell'ipotesi che il ripristino dei livelli sierici fisiologici di IGFBP-3 possa avere un effetto inibitorio sul potenziale metastatico del melanoma.

BIBLIOGRAFIA

1. Dennis LK. Analysis of the melanoma epidemic, both apparent and real: data from the 1973 through 1994 surveillance, epidemiology, and end results program registry. *Arch Dermatol* 1999;135:275-80.
2. Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 2004;351:998-1012.).
3. P Carli, A Biggeri, B Giannotti. Malignant melanoma in Italy: risks associated with common and clinically atypical melanocytic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: pp 734-739
4. M Breitbart, C Garbe, P Buttner, J Weib, et al. Ultraviolet light exposure, pigmentary traits and the development of melanocytic naevi and cutaneous melanoma. *Acta Derm Venereol* 1997; 77: pp 374-378.
5. C Garbe, P Buttner, J Weib, H P Soyer, et al. Risk factor for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying person at risk: multicenter case-control study of the central malignant melanoma registry of the german dermatological society. *J Invest Dermatol* 1994; 102: pp 695-699
6. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1970 Nov;172(5):902-8

7. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 20;27(36):6199-206.
8. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2001 Aug 15;19(16):3635-48.
9. Pehamberger H, Steiner A, Wolff K. In vivo epiluminescence microscopy of pigmented skin lesions. I. Pattern analysis of pigmented skin lesions. *J Am Acad Dermatol* 1987;17:571-83
10. Stolz W, Riemann A, Cagnetta AB et al. ABCD rule of dermoscopy: a new practical method for early recognition of malignant melanoma. *Eur J Dermatol* 1994; 4: 521–527
11. Nachbar F, Stolz W, Merkle T et al. The ABCD rule of dermatoscopy. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 551–559
12. Abbasi NR, Shaw HM, Rigel DS, Friedman RJ, McCarthy WH, Osman I, Kopf AW, Polsky D. Early diagnosis of cutaneous

melanoma: revisiting the ABCD criteria JAMA,2004 Dec 8;292(22):2771-6

13. Menzies SW. A method for the diagnosis of primary cutaneous melanoma using surface microscopy. *Dermatol Clin* 2001;19:299–305
14. Argenziano G, Fabbrocini G, Carli P, et al. Epiluminescence microscopy for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions: comparison of the ABCD rule of dermoscopy and a new 7-point checklist based on pattern analysis. *Arch Dermatol* 1998;134:1563–70
15. V. Dal Pozzo, C. Benelli, E. Roscetti. The seven features for melanoma: a new dermoscopic algorithm for the diagnosis of malignant melanoma. *Eur J Dermatol* 1999 Jun; 9 (4): 303-8
16. M. J. Scott Henning, S. W. Dusza, S. Q. Wang, A. A. Marghoob, H. S. Rabinovitz, D. Polsky, A.W. Kopf. The CASH (color, architecture, symmetry, and homogeneity) algorithm for dermoscopy *J Am Acad Dermatol* 2007;56:45-52
17. Panasiti V, Devirgiliis V, Curzio M, Roberti V, Gobbi S, Masciangelo R, Mastrecchia B, Calvieri S, Bottoni U. The reticular point of view in dermoscopy. *J Am Acad Dermatol*. 2009 Aug 22
18. Amersi F, Morton DL. The role of sentinel lymph node biopsy in the management of melanoma. *Adv Surg*. 2007;41:241-56.

19. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg.* 1992 Apr;127(4):392-9
20. Balch C. M., Houghton A. N., Milton G. W.: Diagnosis of metastatic melanoma at distant sites. In: Balch C. M., Houghton eds. *Cutaneous melanoma.* 439-467, JB Lippincott, Philadelphia, 1992
21. Balch CM. Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. *Semin Surg Oncol.* 1992;8(6):400-14
22. Philip PA, Flaherty LE. Biochemotherapy for melanoma. *Curr Oncol Rep.* 2000;2(4):314-21
23. Dillman RO, Church C, Barth NM, Oldham RK, Wiemann MC. Long-term survival after continuous infusion interleukin-2. *Cancer Biother Radiopharm.* 1997 Aug;12(4):243-8
24. Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH Interferon Alpha-2b Adjuvant Therapy of High-Risk Resected Cutaneous Melanoma: The Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *Journal of Clinical Oncology*, vol 14, no 1 (Jan) 1996: pp 7-17
25. Moschos SJ, Kirkwood JM, Konstantinopoulos PA. Present Status and Future Prospects for Adjuvant Therapy of Melanoma: Time to

Build upon the Foundation of High-dose Interferon Alfa-2b *Journal of Clinical Oncology*, Vol 22, No 1 (January 1), 2004: pp. 11-14

26. Agarwala SS, Kirkwood JM Update on adjuvant interferon therapy for high-risk melanoma *Oncology (Williston Park)*. 2002 Sep;16(9):1177-87; discussion 1190-2, 1197
27. Miller DM, Jones D, Partin ML, Urist M, Ebbinghaus S, Mattar B, Redden D Effective interleukine-2 based adjuvant therapy for high risk malignant melanoma patients. *ASCO* 1998
28. Morton DL, Hsueh EC, Essner R, Foshag LJ, O'Day SJ, Bilchik A, Gupta RK, Hoon DS, Ravindranath M, Nizze JA, Gammon G, Wanek LA, Wang HJ, Elashoff RM. Prolonged survival of patients receiving active immunotherapy with Canvaxin therapeutic polyvalent vaccine after complete resection of melanoma metastatic to regional lymph nodes. *Ann Surg*. 2002 Oct;236(4):438-48
29. Eggermont AM, Testori A, Maio M, Robert C. Anti-CTLA-4 Antibody Adjuvant Therapy in Melanoma. *Semin Oncol*. 2010 Oct;37(5):455-9.
30. Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sondak VK, Richards J, et al. High-and low-dose interferon α -2b in high risk melanoma: first analysis of intergroup trial E 1690/S9111/C9190. *J Clin Oncol* 18: 2444-2458, 2000

31. Hauschild A, Weichenthal M, Rass K, Linse R, Berking C, Böttjer J, Vogt T, Spieth K, Eigentler T, Brockmeyer NH, Stein A, Näher H, Schadendorf D, Mohr P, Kaatz M, Tronnier M, Hein R, Schuler G, Egberts F, Garbe C. Efficacy of low-dose interferon α 2a 18 versus 60 months of treatment in patients with primary melanoma of ≥ 1.5 mm tumor thickness: results of a randomized phase III DeCOG trial. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 10;28(5):841-6
32. Rusciani L, Petraglia S, Alotto M, Calvieri S, Vezzoni G, Postsurgical adjuvant therapy for melanoma. *Cancer* 1997 ; 79: 2354-60
33. Grob JJ, Dreno B, De la Salmoniere P, Delaunay M, Cupissol D, et al. Randomised trial of interferon α -2 a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. *Lancet* 1998; 351: 1905-10
34. Cameron DA, Cornbleet MC, Macie RM, Hunter JAA., Gore M., et al. Adjuvant interferon alpha 2b in high risk melanoma- the scottish study. *Br J Cancer*, 2001 84 (9) pp 1146-1149
35. Pehamberger H, Soyer PH, Steiner A, Kofler R, Binder M, Misher P, et al. Adjuvant interferon alfa-2a treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 16: 1425-1429 1998
36. Bottoni U, Devirgiliis V, Masciangelo R, Del Giudice M, Dianzani C, Bianchini D, Richetta A, Innocenzi D, Calvieri S. *Terapia*

adiuvante con interferone α -2b a basse dosi nei pazienti con melanoma. *Giornale Italiano di Oncologia* 2003 anno XXIII, 1, 38-42

37. Becker JC, Kampgen E, Brocker EB Classical chemotherapy for metastatic melanoma *Clinical and Experimental Dermatology*, 2000; 25: 503-508
38. Eggermont AM, Kirkwood JM. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *Eur J Cancer*. 2004 Aug;40(12):1825-36.
39. Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, Begg CB, Agarwala SS, Schuchter LM, Ernstoff MS, Houghton AN, Kirkwood JM. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 1999 Sep;17(9):2745-51
40. Ahmann DL, Creagan ET, Hahn RG, Edmonson JH, Bisel HF, Schaid DJ. Complete responses and long-term survivals after systemic chemotherapy for patients with advanced malignant melanoma. *Cancer*. 1989 Jan 15;63(2):224-7
41. Khayat D, Giroux B, Berille J, Cour V, Gerard B, Sarkany M, Bertrand P, Bizzari JP. Fotemustine in the treatment of brain primary tumors and metastases. *Cancer Invest*. 1994;12(4):414-20

42. Falkson CI, Falkson G, Falkson HC. Phase II trial of fotemustine in patients with metastatic malignant melanoma. *Invest New Drugs*. 1994;12(3):251-4
43. Seigler HF, Lucas VS Jr, Pickett NJ, Huang AT. DTIC, CCNU, bleomycin and vincristine (BOLD) in metastatic melanoma. *Cancer*. 1980 Dec 1;46(11):2346-8
44. Bottoni U, Bonaccorsi P, Devirgiliis V, Panasiti V, Borroni RG, Trasimeni G, Clerico R, Calvieri S. Complete remission of brain metastases in three patients with stage IV melanoma treated with BOLD and G-CSF. *Jpn J Clin Oncol*. 2005 Sep;35(9):507-13
45. Del Prete SA, Maurer LH, O'Donnell J, Forcier RJ, LeMarbre P. Combination chemotherapy with cisplatin, carmustine, dacarbazine, and tamoxifen in metastatic melanoma. *Cancer Treat Rep*. 1984 Nov;68(11):1403-5
46. Legha SS, Ring S, Papadopoulos N, Plager C, Chawla S, Benjamin R. A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin, vinblastine, and dacarbazine (CVD) for metastatic melanoma. *Cancer*. 1989 Nov 15;64(10):2024-9
47. Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, Begg CB, Agarwala SS, Schuchter LM, Ernstoff MS, Houghton AN, Kirkwood JM. Phase III multicenter randomized

- trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 1999 Sep;17(9):2745-51
48. Kadison AS, Morton DL. Immunotherapy of malignant melanoma. *Surg Clin North Am*. 2003 Apr;83(2):343-70
49. Asadullah K, Sterry W, Trefzer U. Cytokines: interleukin and interferon therapy in dermatology. *Clin Exp Dermatol*. 2002 Oct;27(7):578-84
50. Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications and toxicities. *Oncologist* 2001; 6 (1): 34-55
51. Agarwala SS, Kirkwood JM. Temozolomide in combination with interferon alpha-2b in patients with metastatic melanoma: a phase I dose-escalation study. *Cancer*. 2003 Jan 1;97(1):121-7
52. Atkins MB, Hsu J, Lee S, Cohen GI, Flaherty LE, Sosman JA, Sondak VK, Kirkwood JM Phase III trial comparing concurrent biochemotherapy with cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interleukin-2, and interferon alfa-2b with cisplatin, vinblastine, and dacarbazine alone in patients with metastatic malignant melanoma (E3695): a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 10;26(35):5748-54
53. Khayat D, Borel C, Tourani JM, Benhammouda A, Antoine E, Rixe O, Vuillemin E, Bazex PA, Thill L, Franks R, et al. Sequential

- chemoimmunotherapy with cisplatin, interleukin-2, and interferon alfa-2a for metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 1993 Nov;11(11):2173-80
54. Bernengo MG, Doveil GC, Bertero M, Quaglino P, Fierro MT, Savoia P, Appino A, Colonna S. Low-dose integrated chemoimmuno-hormonotherapy with cisplatin, subcutaneous interleukin-2, alpha-interferon and tamoxifen for advanced metastatic melanoma--a pilot study. *Melanoma Res.* 1996 Jun; 6 (3):257-65
55. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1998 Mar;4(3):328-32
56. Meyer LJ, Zone JH. Genetics of cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 1994;103(5 suppl):112S-116S.
57. Cannon-Albright LA, Meyer LJ, Goldgar DE, et al. Penetrance and expressivity of the chromosome 9p melanoma susceptibility locus (MLM). *Cancer Res.* 1994;54(23):6041-6044
58. Hussussian CJ, Struwing JP, Goldstein AM, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet.* 1994;8(1):15-21.
59. Sekulic A et al for the melanoma study group of the Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st century: the

- emerging molecular landscape. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(7):825-846
60. Zuo L, Weger J, Yang Q, et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet.* 1996;12(1):97- 99.
 61. Soufir N, Avril MF, Chompret A, et al; French Familial Melanoma Study Group. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma- prone families in France [published correction appears in *Hum Mol Genet.* 1998;7(5):941]. *Hum Mol Genet.* 1998;7(2):209-216.
 62. Wolfel T, Hauer M, Schneider J, et al. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science.* 1995;269(5228):1281-1284.
 63. Tsao H, Benoit E, Sober AJ, Thiele C, Haluska FG. Novel mutations in the p16/CDKN2A binding region of the cyclin-dependent kinase-4 gene. *Cancer Res.* 1998;58(1):109-113.
 64. Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma. *Curr Opin Oncol.* 2008;20(2):183-189.
 65. Braig M, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res.* 2006;66(6):2881-2884
 66. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D IV, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of

- superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol.* 1984;15(12):1147-1165.
67. Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, et al. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res.* 2002;8(12):3728-3733.
 68. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002 Jun 27;417(6892):949-954. Epub 2002 Jun 9.
 69. Gray-Schopfer VC, da Rocha Dias S, Marais R. The role of B-RAF in melanoma [published correction appears in *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24(2):367]. *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24(1):165-183.
 70. Ackermann J, Frutschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated NRasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res.* 2005;65(10):4005-4011.
 71. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature.* 2007;445(7130):851-857.
 72. Ball NJ, Yohn JJ, Morelli JG, Norris DA, Golitz LE, Hoeffler JP. Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *J Invest Dermatol.* 1994;102(3):285-290.
 73. Chin L, Tam A, Pomerantz J, et al. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature.* 1999;400(6743):468-472.

74. Glinsky GV, Glinsky VV. Apoptosis and metastasis: a superior resistance of metastatic cancer cells to programmed cell death. *Cancer Lett.* 1996; 101(1):43-51.
75. Glinsky GV, Glinsky VV, Ivanova AB, Hueser CJ. Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. *Cancer Lett.* 1997;115(2):185-193.
76. Valente P, Fassina G, Melchiori A, et al. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis [published correction appears in *Int J Cancer.* 1999;80(3):485]. *Int J Cancer.* 1998;75:246-253.
77. Stahl JM, Cheung M, Sharma A, Trivedi NR, Shanmugam S, Robertson GP. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res.* 2003;63(11):2881-2890.
78. Meier F, Schitteck B, Busch S, et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Front Biosci.* 2005;10:2986-3001
79. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene.* 2003;22(20):3113-3122.

80. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol.* 2004;122(2):337-341.
81. Zhuang L, Lee CS, Scolyer RA, et al. Progression in melanoma is associated with decreased expression of death receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Hum Pathol.* 2006 Oct;37(10):1286- 1294. Epub 2006 Jul 18
82. Tsao H, Zhang X, Fowlkes K, Haluska FG. Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer Res.* 2000;60(7):1800-1804
83. Lerner AB, Shiohara T, Boissy RE, Jacobson KA, Lamoreux ML, Moellmann GE. A mouse model for vitiligo. *J Invest Dermatol.* 1986;87(3): 299-304.
84. Steingrimsson E, Moore KJ, Lamoreux ML, et al. Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. *Nat Genet.* 1994;8(3):256-263.
85. Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol.* 2003;163(1):333-343.

86. Banerjee D. Genasense (Genta Inc). *Curr Opin Investig Drugs*. 2001; 2(4):574-580.
87. Hsu M, Andl T, Li G, Meinkoth JL, Herlyn M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci*. 2000;113(pt 9):1535-1542.
88. Danen EH, de Vries TJ, Morandini R, Ghanem GG, Ruiter DJ, van Muijen GN. E-cadherin expression in human melanoma. *Melanoma Res*. 1996;6(2):127-131.
89. Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 1996;1(2):188-194.
90. Scott RA, Lauweryns B, Snead DM, Haynes RJ, Mahida Y, Dua HS. Ecadherin distribution and epithelial basement membrane characteristics of the normal human conjunctiva and cornea. *Eye*. 1997;11(pt 5):607-612.
91. Satyamoorthy K, Li G, Gerrero MR, et al. Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res*. 2003;63(4):756-759.
92. Liu J-P, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A: Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth

- factor I (IGF-I) and type 1 IGF receptor (IGF-I-R). *C e l l* 1993;75:59–72
93. DeChira TM, Efstratiadis A, Robertson EJ: A growth deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 1990;296:78–80 G.
94. Fürstenberger, H. J Senn. Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol* 2002; 3: 298–302
95. W.H. Daughaday, D. M. Kipnis, The growth promoting and anti-insulin actions of somatotropin, *Recent Prog Horm Res* (1966) 22: 49-99
96. E. R. Froesch, H. Buergi, Antibody-suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity, *J Clin. Invest.*(1963) 42:1816-34
97. A. Jakob, C. Hauri, Nonsuppressible insulin-like activity in human serum 3. Differentiation of two distinct molecules with nonsuppressible IL A, *J Clin. Invest.*(1968) 47(12):2678-88
98. Jones JI, Clemmons DR: Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3–34
99. Wajapeyee, N., Serra, R.W., Zhu, X., Mahalingam, M., and Green, M.R. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through

pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* 2008 Feb 8;132(3):363-74

100. H. Yu, T. Rohan, Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression, *Journal of the National Cancer Inst.*(2000) 92 (18): 1472-89
101. P. Singh, Il sistema dei fattori di crescita insulino-simili nella crescita, nello sviluppo e nella carcinogenesi, *Journal of clinical ligand assay (Ed. Italiana)* (2000) 23: 210-228
102. C. Lalou, S. Sawamura, B. Segovia, Y. Ogawa, M. Binoux, Proteolytic fragments of insulin-like growth factor binding protein-3: N-terminal sequences and relationships between structure and biological activity, *Life Sciences* (1997) 320: 621-628
103. N. Bhattacharyya, K. Pechhold, H. Shahjee, G. Zappala, Nonsecreted insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) can induce apoptosis in human prostate cancer cells by IGF-independent mechanisms without being concentrated in the nucleus, *The Journal of Biological Chemistry* (2006) Vol. 281 (34): 24588-24601
104. Singh P, Rubin N. Insulin-like growth factors & binding proteins in colon cancer. *Gastroenterology* 1993;105:1218–1237
105. Blum WB, Albertsson-Wikland K, Rosbert S, Ranke MB: Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding

- protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1610–1616
106. Grinspoon S, Clemmons D, Swearingen B, Klibanski A: Serum insulin-like growth factor-binding protein-3 levels in the diagnosis of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metal* 1999;80:927–932
 107. Kristrom B, Jansson V, Rosbert S, Albertsson-Wikland K: Growth response to growth hormone (GH) treatment relates to serum insulinlike growth factor-1 (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in short children with various GH secretion capacities. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2889–2898
 108. Gelande L, Blum WF, Larsson L, Rosberg S, Albertsson-Wikland K: Monthly measurements of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in healthy prepubertal children: characterization and relationship with growth: The 1-year growth study. *Pediatric Research* 1999;45:377–383 10
 109. J. Massague, M. P. Czech, The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factor I-II and their relationship to the insulin receptor, *J Biol Chem* (1982) 257 (9): 5038- 45 11
 110. K. M. Kelley, Y. Oh, S. E. Gargosky, Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (1996) 28: 619-637 6.

111. C. L. Neudauer, J. B. McCarthy, Insulin-like growth factor-1 stimulated melanoma cell migration requires phosphoinositide 3-kinase but not extracellular-regulated kinase activation, *Experimental Cell Res.* (2003) 286: 128-137
112. Valentinis B, Baserga R. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2001; 54: 133–37
113. Werner H, LeRoith D. The role of insulin-like growth factor system in human cancer. *Adv Cancer Res* 1996 68: 183–223.- 2
114. Baserga R, Sell C, Porcu P, Rubini M. The role of IGF-I receptor in the growth and transformation of mammalian cells. *Cell Proliferation* 1994; 27: 63–71
115. Baserga R. The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumour growth? *Cancer Res* 1995; 55: 249–52
116. Morrione A, DeAngelis D, Baserga R. Failure of the bovine papillomavirus to transform mouse embryo fibroblasts with a targeted disruption of the insulin-like growth factor receptor gene. *J Virol* 1995; 69: 5300–03.—2
117. Sell C, Dumenil G, Devaud C, et al. Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 3604–12

118. Sell C, Rubini M, Rubini R, et al. Simian virus 40 large tumour antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type I insulin-like growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11217–21
119. Harrington EA, Bennett MR, Fanidi A, Evan GI. c-Myc induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *EMBO J* 1994; 13: 3286–95
120. Rodriguez-Tarduchy G, Collins MKL, et al. Insulin-like growth factor-I inhibits apoptosis in IL-3-dependent hemopoietic cells. *J Immunol* 1992; 149: 535–40
121. Resnicoff M, Burgaud JL, Rotmann HL, et al. Correlation between apoptosis, tumorigenesis and levels of insulin-like growth factor I receptors. *Cancer Res* 1995; 55: 3739–41 13.
122. R. H. McCusker, W. H. Busby, Insulin-like growth factor (IGF) binding to cell monolayers is directly modulated by the addition of IGF-binding proteins, *Endocrinology* (1991) 129 (2): 939-49 14
123. Peruzzi F, Prisco M, Dews M, Salmoni P, Grassilli E, Romano G, Calabretta B, Baserga R: The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:166–173.

124. Prisco M, Romano G, Peruzzi F, Valentinis B, Baserga R: Insulin and IGF-I receptors signaling in protection from apoptosis. *Horm Metab Res* 1999;31:80–89.
125. Peruzzi F, Prisco M, Dews M, Salomoni P, Grassilli E, Romano G, Calabretta B, Baserga R: Multiple signaling pathways of the insulinlike growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999;19:7203–7215.
126. Baserga R, Hongo A, Rubini M, Prisco M, Valentinis B: The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1997;1332:F105–126
127. Valentinis B, Romano G, Peruzzi F, Morionne A, Prisco M, Soddu S, Cristofanelli B, Sacchi A, Baserga R: Growth and differentiation signals by the insulin-like growth factor 1 receptor in hemopoietic cells are mediated through different pathways. *J Biol Chem* 1999;274:12423–12430
128. Coppola D, Saunders B, Fu L, Mao W, Nicosia SV: The insulin-like growth factor 1 receptor induces transformation and tumorigenicity of ovarian mesothelial cells and down-regulates their Fas-receptor expression. *Cancer Res* 1999;59, 3264–3270
129. Harrison M, Dunger AM, Berg S, et al: Growth factor protection against cytokine-induced apoptosis in neonatal rat islets of Langerhans: Role of Fas. *FEBS Lett* 1998;435:207–210

130. O'Connor R, Kauffmann-Zeh A, Liu Y, et al: Identification of domains of the insulin-like growth factor I receptor that are required for protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997;17:427–435
131. Reiss K, Ferber A, Travali S, Porcu P, Phillips PD, Baserga R: The proto-oncogene *c-myc* increases the expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor I receptor messenger RNA by a transcriptional mechanism. *Cancer Res* 1991;51:5997–6000
132. Pietrzkowski Z, Sell C, Lammers R, Ullrich A, Baserga R: The role of IGF-I and the IGF-I receptor in epidermal growth factor-stimulated growth of 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 1992;12:3883–3889
133. Villaudi J, Delbe J, Blat C, Deasuty G, Golda A, Harel L: An IGF binding protein is an inhibitor of FGF stimulation. *J Cell Physiol* 1991;149:492–496
134. Stewart AJ, Johnson MD, May FEB, Westley BR: Role of insulinlike growth factor and the type 1 insulin-like growth factor receptor in the estrogen-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1990;265:21172–21178
135. Sell C, Rubini M, Rubin R, Liu J-P, Efstratiadis A, Baserga R: Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:11217–11221

136. Baserga R: The IGF-1 receptor in cancer research. *Exp Cell Res* 1999;253, 1–6.
137. W. G. Hoeck, V. R. Mukku, Identification of the major sites of phosphorylation in IGF binding protein-3, *J Cell Biochem* (1994) 56 (2): 262-73 15
138. S. M. Firth, R. C. Baxter, Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins, *Endocr. Rev.* (2002) 23 (6): 824-854 16.
139. H. Shahjee, N. Bhattacharyya, G. Zappala, M. Wiench, S. Prakash, M.M. Rechler, An N-terminal fragment of insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP) induces apoptosis in human prostate cancer cells in an IGF-independent manner, *Growth Hormone & Research* (2008) 18: 188-197
140. A. G. Renehan, M. Zwahlen, C. Minder, S. T O’Dwyer, S. M. Shalet, M. Egger, Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis, *Lancet* (2004) 363: 1346-53
141. A. J. Butt, A. C. Williams. IGFBP-3 and apoptosis—a licence to kill? *Apoptosis* 2001; 6: 199–205
142. Oh Y, Muller HL, Lamson G, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 14964–14971

143. Rajah R, Valentinis B, Cohen P. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor- β 1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* 1997; 272: 12181–12188
144. Leal SM, Liu Q, Huang SS, Huang JS. The type V transforming growth factor β receptor is the putative insulin-like growth factor-binding protein 3 receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 20572–20576
145. Valentinis B, Bhala A, DeAngelis T, Baserga R, Cohen P. The human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the growth of fibroblasts with a targeted disruption of the IGF-I receptor gene. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 361–367
146. Oh Y. IGF-independent regulation of breast cancer growth by IGF binding proteins. *Breast Cancer Res. Treat* 1998; 47: 283–293
147. Ferry RJ, Katz LEL, Grimberg A, Cohen P, Weinzimer SA. Cellular actions of insulin-like growth factor binding proteins. *Horm Metab Res* 1999; 31: 192–202
148. Knabbe C, Lippman ME, Wakefield LM, et al. Evidence that transforming growth factor-beta is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell* 1987; 48: 417–428
149. Fontana JA, Burrows-Mezu A, Clemmons DR, LeRoith D. Retinoid modulation of insulin-like growth factor-binding proteins and

- inhibition of breast carcinoma proliferation. *Endocrinology* 1990; 128: 1115–1122
150. Besset V, Margueresse-Battistoni B, Collete J, Benahmed M. Tumor necrosis factor alpha stimulates insulin-like growth factor binding protein-3 expression in cultured porcine sertoli cells. *Endocrinol* 1996; 137: 296–303
151. Huynh H, Yang X, Pollack M. Estradiol and anti-estrogens regulate a growth inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3 autocrine loop in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 1016–1021
152. Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, et al. Induction of the growth inhibitor IGF binding protein 3 by p53. *Nature* 1995; 377: 646–649
153. Huynh H, Pollak M, Zhang JC. Regulation of insuline-like growth factor (IGF) II and IGF binding protein 3 autocrine loop in human PC-3 prostate cancer cells by vitamin D metabolite 1, 25(OH) 2D3 and its analog EB1089. *Int J Oncol* 1998; 13: 137–143
154. Butt AJ, Firth SM, Baxter RC. The IGF axis and programmed cell death. *Immunol Cell Biol* 1999; 77: 256–262
155. Resnicoff M, Abraham D, Yutanawiboonchai W, et al. The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo. *Cancer Res* 1995; 55: 2463–2469

156. Rajah R, Valentinis B, Cohen P. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor- α 1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* 1997; 272: 12181–12188
157. Martin JL, Baxter RC. Oncogenic ras causes resistance to the growth inhibitor insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) in breast cancer cells. *J Biol Chem* 1999;274:16407–11
158. Nickerson T, Huynh H, Pollak M. Insulin-like growth factor binding protein-3 induces apoptosis in MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237: 690–3
159. Gill ZP, Perks CM, Newcomb PV, et al. Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-3) predisposes breast cancer cells to programmed cell death in a non-IGFdependent manner. *J Biol Chem* 1997;272:25602–7
160. Baxter RC. Signalling pathways involved in antiproliferative effects of IGFBP-3: a review. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2001; 54: 145–48
161. Hoeflich A, Fettscher O, Lahm H, et al. Overexpression of insulinlike growth factor-binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumour cells. *Cancer Res* 2000; 60: 834–38

162. Buckbinder L, Talbott R, Velasco MS, et al. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* 1995;377:646–9
163. Butt AJ, Firth SM, King MA, et al. Insulin-like growth factor-binding protein-3 modulates expression of Bax and Bcl-2 and potentiates p53-independent radiation-induced apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2000; 275:39174–81
164. S. Rajaram, D. J. Baylink, S. Mohan, Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions, *Endocr. Rev.* (1997) 18 (6): 801-831
165. Rechler MM, Nissley SP: Insulin-like growth factors, in Sporn MB, Roberts AB (eds): *Peptide Growth Factors & Their Receptors*, I Secaucus, NJ, Springer-Verlag 1990;263–367
166. Toretsky JA, Helman LJ: Involvement of IGF-II in human cancer. *J Endocrinol* 1996;149:367–372.
167. Werner H, LeRoith D: The role of the IGF system in human cancer, in Vande Woude GF, Klein G (eds): *Advances in Cancer Research* San Diego, Academic Press 1996;68:168–223.
168. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FE, Pollak M: Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 1998;351:1393–1396

169. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, Hennekens CH, Pollak M: Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 1998;279:563–566
170. Adesanya OO, Zhou J, Samathanam C, Powell-Braxton L, Bondy CA: Insulin-like growth factor I is required for G-2 progression in the estradiol-induced mitotic cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3287–3291
171. Lee AV, Jackson JG, Gooch JL, Hilsenbeck SG, Coronado Heinsohn E, Osborne CK, Yee D: Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Molecular Endocrinology* 1999;13:787–796
172. Brulke T: Type-2 IGF receptor: A multi-ligand binding protein. *Horm Metab Res* 1999;31:242–246
173. Byrd JC, Devi GR, DeSouza AT, Jirtle RL, MacDonald RG: Disruption of ligand binding to the insulin-like growth factor II/Mannose 6-phosphate receptor by cancer-associated missense mutations. *J Biol Chem* 1999;274:24408–24416
174. Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R: Insulin receptor isoform A, a

- newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* 1999;19:3278–3288
175. Moller DE, Yokota A, Caro JF, Flier JS: Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol Endocrinol* 1989;3:1263–1269
176. Kanter-Lewensohn L, Dricu A, Wang M, Wejde J, Kiessling R, Larsson O. Expression of the insulin-like growth factor-1 receptor and its anti-apoptotic effect in malignant melanoma: a potential therapeutic target. *Melanoma Res* 1998;8:389
177. Satyamoorthy K, Li G, Vaidya B, Patel D, Herlyn M. Insulin-like growth factor-1 induces survival and growth of biologically early melanoma cells through both the mitogen-activated protein kinase and beta-catenin pathways. *Cancer Res* 2001;61:7318-24
178. Xi Y, Nakajima G, Hamil T, Fodstad O, Riker A, Ju J. Association of insulinlike growth factor binding protein-3 expression with melanoma progression. *Mol Cancer Ther* 2006;5:3078-84
179. Yu JZ, Warycha MA, Christos PJ, Darvishian F, Yee H, Kamino H, Berman RS, Shapiro RL, Buckley MT, Liebes LF, Pavlick AC, Polsky D, et al. Assessing the clinical utility of measuring Insulin-like Growth Factor Binding Proteins in tissues and sera of melanoma patients. *J Transl Med* 2008;6:70

180. Oy GF, Slipicevic A, Davidson B, Faye RS, Mælandsmo GM, Flørenes VA. Biological effects induced by insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) in malignant melanoma. *Int J Cancer*. 2009 Jul 8
181. Chan JM, Stampfer MJ, Ma J, Gann P, Gaziano JM, Pollak M, Giovannucci E. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-3 as predictors of advanced-stage prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1099-106
182. Ju J, Rastelli L, Malyanker U, et al. The melanoma vascular mimicry phenotype defined in gene expression and microsome sequencing analysis. *Cancer Genomics Proteomics* 2004;1:355–62
183. Goldstein S, Moerman EJ, Jones RA, Baxter RC. Insulin-like growth factor binding protein 3 accumulates to high levels in culture medium of senescent and quiescent human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9680–4
184. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463-516.
185. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003 May 2;92(8):827-39.

186. Kleiner DE Jr, Stetler-Stevenson WG. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr Opin Cell Biol.* 1993 Oct;5(5):891-7
187. Bourdreau N, Bissell MJ: Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr Opin Cell Biol* 1998, 10: 640-646
188. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997, 91: 439-442
189. Fowlkes JL, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H: Matrix metalloproteases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem* 1994, 269: 25742-25746
190. Friedrich N, Alte D, Völzke H, Spilcke-Liss E, Lüdemann J, Lerch MM, Kohlmann T, Nauck M, Wallaschofski H. Reference ranges of serum IGF-1 and IGFBP-3 levels in a general adult population: results of the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Growth Horm IGF Res.* 2008 Jun;18(3):228-37. Epub 2007 Nov 7