



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**“IL SISTEMA DELLE AURORA CHINASI NEI CARCINOMI DIFFERENZIATI DELLA TIROIDE”**

**Relatore**

Prof. Massimino D’Armiento  
Dip. di Medicina Sperimentale

**Coordinatore**

Prof. Andrea Lenzi  
Dip. di Medicina Sperimentale

**Dottoranda**

Dott.ssa Anna Calvanese

**Dottorato di Ricerca in  
Scienze Endocrinologiche, Metaboliche e Andrologiche, XXIV Ciclo  
Anno Accademico 2010-2011**

## INDICE

<b>CAPITOLO 1: <i>Tumori della tiroide</i></b>	4
<b>1.1</b> Epidemiologia	3
<b>1.2</b> Caratteri generali ed aspetti isto-patologici	4
<b>1.3</b> Alterazioni molecolari implicate nella patogenesi dei tumori della tiroide	11
1.3.1 Oncogeni	12
1.3.2 Geni oncosoppressori	17
1.3.3 Anomalie genetiche nei tumori indotti da radiazioni	18
<b>CAPITOLO 2: <i>Le chinasi Aurora</i></b>	20
<b>2.1</b> Il ciclo cellulare	20
<b>2.2</b> Le chinasi Aurora	25
<b>2.2.1</b> Aurora-A	30
<b>2.2.2</b> Aurora-B	33
<b>2.2.3</b> Aurora-C	38
<b>2.3</b> Le chinasi Aurora nei tumori	40
<b>2.3.1</b> Cenni generali	40
<b>2.3.2</b> Aurora-A nei tumori	42
<b>2.3.3</b> Aurora-B nei tumori	46
<b>2.3.4</b> Aurora-C nei tumori	47
<b>2.4</b> Le chinasi Aurora nei tumori della tiroide	47
<b>CAPITOLO 3: <i>Possibili applicazioni terapeutiche in campo oncologico</i></b>	49
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	53

<b>MATERIALI E METODI</b>	54
<b>RISULTATI</b>	61
<b>DISCUSSIONE</b>	71
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	75

# CAPITOLO 1

## TUMORI DELLA TIROIDE

### *1.1 Epidemiologia*

Il cancro della tiroide rappresenta l'1,5% di tutti i tumori maligni, ma data la sua scarsa aggressività, causa lo 0,3% dei decessi per tumore.

Il carcinoma tiroideo è più comune neoplasia endocrina; la sua incidenza, che è di circa 9/100.000 casi per anno, aumenta con l'età con un plateau intorno ai 50 anni. La frequenza d'insorgenza è doppia nelle donne, anche se nell'uomo la prognosi è peggiore (1).

La varietà delle forme istologiche risulta associata all'apporto alimentare di iodio: nelle aree geografiche in cui questo è normale, più del 90% dei cancri della tiroide è rappresentato dai carcinomi differenziati, papilliferi e follicolari, con prevalenza dei primi rispetto ai secondi. Al contrario, nei paesi in cui vi è carenza alimentare di iodio, aumenta la percentuale del carcinoma follicolare rispetto al papillifero.

Negli ultimi anni si è rilevato un aumento dell'incidenza dei carcinomi differenziati, in particolare del carcinoma papillifero. Questo fenomeno è dovuto da un lato alla maggiore accuratezza diagnostica in virtù della migliore educazione sanitaria, dell'ampia diffusione dell'esame ecografico del collo e dell'uso della FNAC, ma anche verosimilmente all'aumentata esposizione alle radiazioni ionizzanti (2).

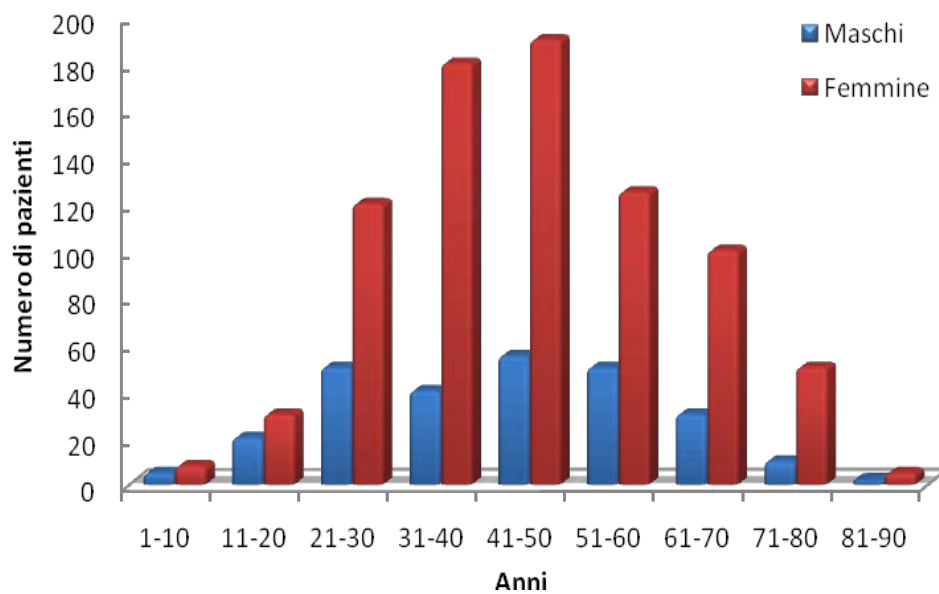
### *1.2 Caratteri generali ed aspetti isto-patologici*

La tiroide può essere sede di tumori benigni (90%) e maligni (5-10%) che originano dalle cellule follicolari o da quelle parafollicolari. Più raramente può essere interessata da neoplasie primitive di origine non epiteliale (sarcomi, linfomi, teratomi, carcinomi a cellule squamose) e, in ragione della sua ricca vascolarizzazione, può essere sede di metastasi provenienti da altri organi (melanoma, carcinoma del polmone, della mammella, dell'esofago).

Le neoplasie benigne sono rappresentate da adenomi di origine follicolare. Le neoplasie maligne possono essere suddivise in carcinomi differenziati (papillifero e follicolare) dell'epitelio follicolare, indifferenziati dell'epitelio follicolare e in carcinomi midollari che originano invece dalle cellule parafollicolari (2). Si manifestano ad ogni età con una

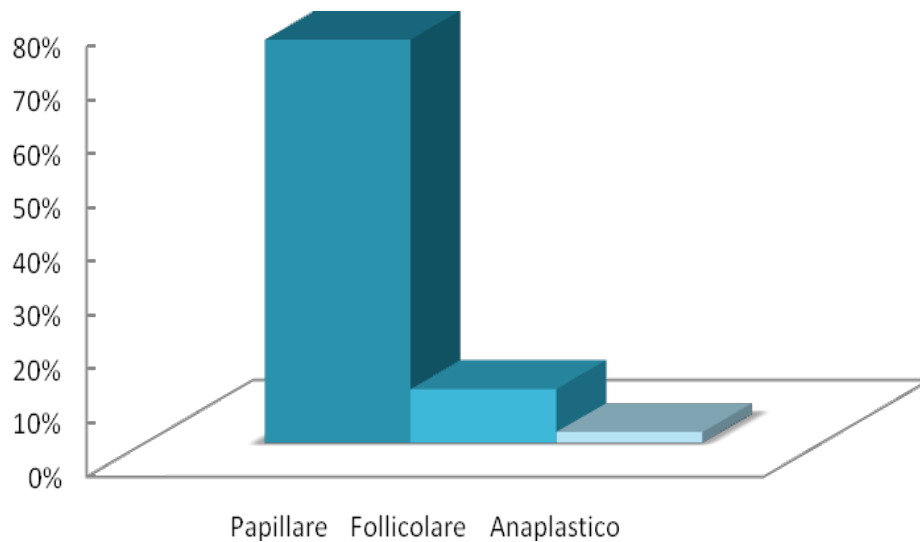
predilezione del papillifero per la terza-quarta decade di vita e del follicolare per la quinta-sesta decade. Il carcinoma papillifero rappresenta l'85-90% dei casi e il follicolare il 5%. Nelle aree a sufficiente apporto iodico si osserva una maggiore frequenza delle forme papillifere, mentre nelle zone iodo-carenti prevale l'istotipo follicolare (2).

Il carcinoma della tiroide rappresenta il 4% dei tumori nel sesso femminile e lo 0.7% nel sesso maschile. Si riscontra in tutte le età, con una maggiore frequenza delle forme papillari in età giovanile e delle forme follicolari ed indifferenziate tra i 40 e i 65 anni (Figura 1).



**Figura 1.** Incidenza del tumore tiroideo in funzione dell'età e del sesso.

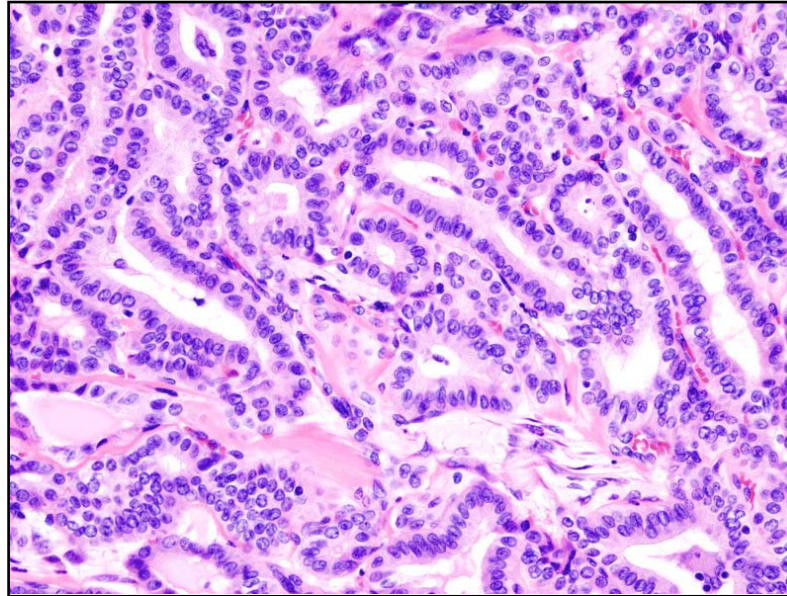
E' caratterizzato da una capsula incompleta o assente, le cellule crescono in modo disordinato con forma e dimensioni variabili, i nuclei appaiono grandi, polimorfi e ipercromatici, provvisti di nucleoli evidenti, le mitosi sono numerose ed atipiche e appare evidente l'invasione di vasi linfatici e/o ematici e di strutture anatomiche o organi contigui. In base alle caratteristiche citologiche e istologiche, come l'architettura tissutale, l'aspetto nucleare, la presenza o meno di capsula, i carcinomi della tiroide che originano dal tireocita vengono suddivisi in carcinoma papillare, follicolare e indifferenziato o anaplastico (Figura 2).



**Figura 2.** Distribuzione percentuale di carcinoma tiroideo per i diversi istotipi

Il *carcinoma papillare* è un carcinoma ghiandolare formante papille. Rappresenta circa l'80% di tutte le neoplasie tiroidee in età adulta ed il 70% in età pediatrica. Si tratta di

tumori non capsulati o solo parzialmente capsulati. Spesso i carcinomi papilliferi sono multifocali e coinvolgono uno o entrambi i lobi (Figura 3).



**Figura 3.** Carcinoma papillare (200X)

A livello microscopico il tumore è formato da papille, consistenti in un asse connettivo-vascolare coperto da un epitelio monostratificato o talvolta pluristratificato. I follicoli neoplastici possono contenere colloide eosinofila o essere vuoti. Una metà dei carcinomi contiene piccole formazioni sferiche, i corpi psammomatosi, formati da depositi di calcio. Sono caratteristici del carcinoma papillare e si ritrovano internamente all'asse delle papille o nello stroma tumorale. Queste caratteristiche morfologiche non sono affatto costanti e la loro assenza non esclude una diagnosi di carcinoma papillare. Al contrario, qualunque sia l'architettura del tumore, i nuclei sono caratteristici: la diagnosi del cancro papillifero è in effetti stabilita sulla base del tipico aspetto dei nuclei. Nel 60% dei tumori questi sono più

grandi che nelle cellule tiroidee normali e sono pallidi, con una membrana nucleare ispessita; il loro contorno è irregolare e a volte possono apparire come fessurati o a “chicco di caffè”; certi nuclei presentano una pseudo-inclusione di grosse dimensioni, rotonda, ben delimitata, che corrisponde ad una invaginazione intranucleare del citoplasma. L’invasione linfonodale è presente e precoce, mentre l’invasione vascolare è più rara. Le metastasi a distanza si osservano dal 5% al 7% dei casi e interessano principalmente i polmoni ma anche lo scheletro. La sintesi di tireoglobulina è conservata in molti casi e si può sfruttare nel corso della malattia come marker della ripresa della crescita o della metastatizzazione (3,4).

Oltre alla forma classica esistono altre varianti istologiche del carcinoma papillifero, che presentano un comportamento biologico e clinico specifico.

La *variante follicolare* presenta le alterazioni nucleari tipiche del carcinoma papillifero ma è caratterizzata da una struttura follicolare.

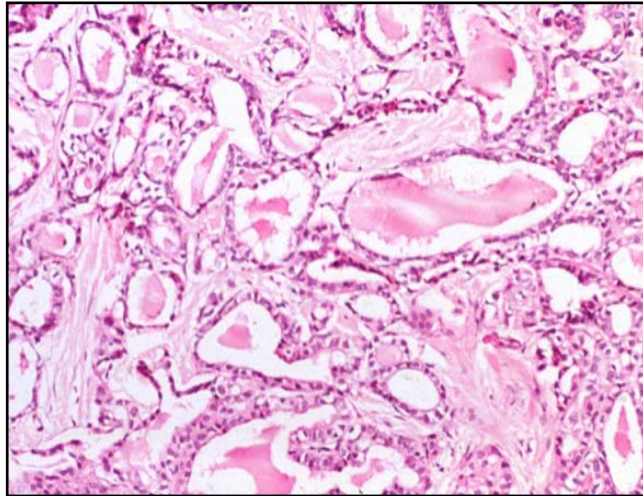
La *variante diffusa sclerosante* è rara e si osserva nei bambini e nei giovani adulti. Si presenta come un ingrandimento globale dei lobi tiroidei.

La *variante a cellule alte o cilindriche* è caratterizzata da cellule colonnari eosinofile che rivestono le papille. Sono neoplasie voluminose, tipiche dei soggetti anziani, con frequente invasione vascolare (5).

Il *carcinoma follicolare* E' un carcinoma ghiandolare formante follicoli. Rappresenta circa il 5-10% dei tumori tiroidei nelle aree geografiche con apporto di iodio alimentare normale e il 30-40% dei carcinomi tiroidei nelle aree povere di iodio. Esso è unifocale ed inizialmente sempre capsulato (Figura 4).

Ha un aspetto complessivamente carnoso con centri fibrosi, talvolta calcificati, simili a tessuto cicatriziale. Il fenotipo microscopico appare misto, comprendente follicoli di varia misura contenenti colloide, acini vuoti, cordoni solidi e alveoli di cellule neoplastiche, racchiusi in una capsula ben definita, ricca di arteriole e venule sinusoidali entro cui sono presenti foci di invasione capsulare che si estendono al lume dei sinusoidi.





**Figura 4.** Carcinoma follicolare (200X).

Quando la capsula è conservata appare morfologicamente molto simile all'adenoma follicolare, per cui la diagnosi istologica differenziale può risultare difficile. Nelle forme invasive, quando il tumore infiltra estesamente la tiroide, la capsula può non essere più visibile.

I 2/3 dei tumori mantengono la capacità di captare lo iodio, che rappresenta il requisito essenziale per la terapia con iodio radioattivo. Anche la sintesi di tireoglobulina è generalmente mantenuta e la sua secrezione può essere sfruttata per seguire il decorso della malattia; più raramente persiste la sintesi di  $T_3$  e  $T_4$  (3,4).

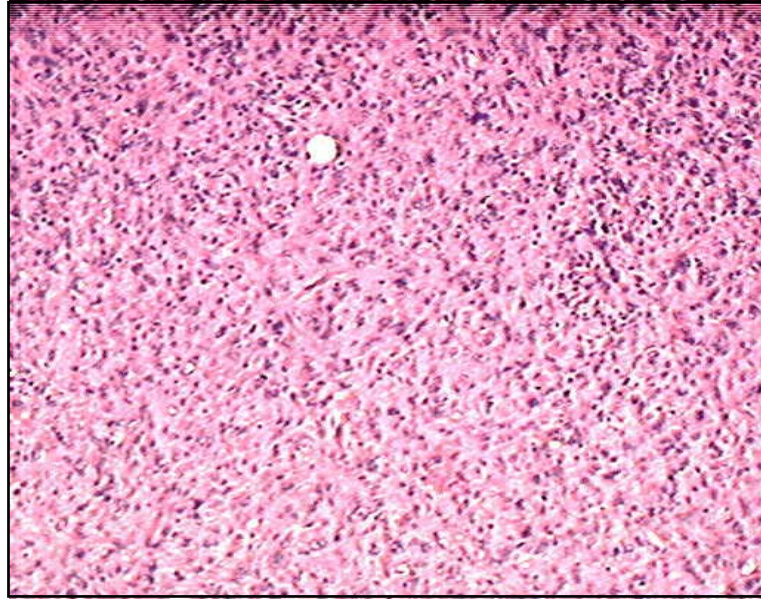
A seconda dell'invasione de parenchima tiroideo adiacente o dei tessuti extratiroidei si distinguono *carcinomi follicolari minimamente invasivi* e *carcinomi follicolari altamente invasivi*. Questi ultimi presentano nella maggior parte dei casi, a livello istologico una struttura di tipo solido trasecolare, una minore differenziazione follicolare e attività mitotica aumentata.

Il carcinoma follicolare tende a metastatizzare più frequentemente per via ematica, con diffusione al polmone, alle ossa, al cervello, e ad altre sedi. La prognosi è influenzata

dall'estensione dell'invasione al momento della diagnosi. I carcinomi follicolari altamente invasivi sviluppano spesso metastasi e la sopravvivenza a 10 anni è del 50%, mentre nel caso dei carcinomi follicolari minimamente invasivi la sopravvivenza a 10 anni è del 90% (5).

Il *carcinoma anaplastico* è un tumore indifferenziato dell'epitelio follicolare della tiroide. Il carcinoma anaplastico della tiroide è molto raro e rappresenta l'1-2% dei tumori della tiroide; è uno dei tumori umani più aggressivi e nella maggior parte dei casi rappresenta lo stadio terminale del processo di dedifferenziamento di un carcinoma follicolare o papillare preesistente (Figura 5).

Le cellule anaplastiche non producono tireoglobulina, non sono in grado di trasportare lo iodio e non esprimono il recettore dell'ormone tireotropo. Il sintomo di presentazione più comune è un rapido ingrandimento di una tumefazione del collo e, al momento della diagnosi, dal 20 al 50% dei pazienti hanno già metastasi a distanza, più frequentemente al polmone, poi all'osso, al cervello e al fegato.



**Figura 5.** Carcinoma anaplastico (200X)

I carcinomi anaplastici sono masse solide ed ipocaptanti all'esame scintigrafico. Le concentrazioni sieriche di tireoglobulina sono frequentemente elevate a causa della concomitante compressione e distruzione del parenchima tiroideo sano, invaso dalla neoplasia. Il tumore è tipicamente composto da cellule sottili, poligonali e giganti in varie proporzioni. Il marcatore epiteliale più utile e presente nel 40-100% dei casi è la cheratina, mentre la tireoglobulina è scarsa. La sopravvivenza è molto breve, 2-6 mesi, e non è migliorata da trattamento chirurgico, radioterapico e chemioterapico. Nella maggior parte dei pazienti la morte è causata dall'invasione tumorale locale (3,4).

### **1.3** *Alterazioni molecolari implicate nella patogenesi dei tumori della tiroide*

La proliferazione delle cellule follicolari normali è controllata da fattori di crescita extracellulari che, agendo tramite recettori di membrana, modulano le vie intracellulari della trasmissione del segnale. Nelle cellule follicolari il principale fattore di regolazione è il TSH.

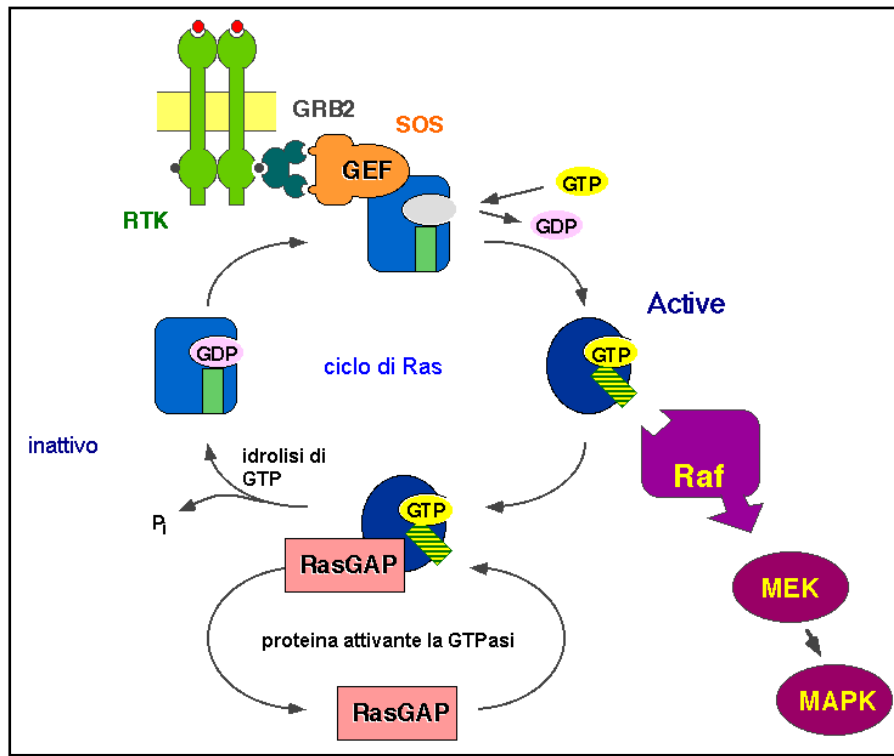
La crescita tumorale è legata ad uno squilibrio irreversibile di questi meccanismi di regolazione che può essere dovuto sia ad un'esaltata attività stimolatoria che ad una ridotta attività del controllo inibitorio. Il carattere monoclonale della maggior parte dei tumori benigni e maligni della tiroide suggerisce che la loro genesi sia dovuta ad anomalie genetiche. Molte di queste sono state descritte per i geni *ras*, *gsp*, *p53*, *ret*, *trk* e per il gene del recettore del TSH (4).

### **1.3.1. Oncogeni**

#### **1.3.1.a RAS**

La proteina RAS attivata stimola la divisione cellulare e inibisce la differenziazione delle cellule follicolari. L'attivazione dell'oncogene *ras* causata da mutazioni puntiformi è stata evidenziata in circa il 40% dei tumori tiroidei benigni e maligni. Mentre in altri tumori umani un solo gene *ras* è in genere mutato, nei tumori della tiroide sono state ritrovate mutazioni dei tre geni *ras* (*H-*, *Ki-*, *N-ras*) con una frequenza simile negli adenomi, nei carcinomi differenziati e nei carcinomi anaplastici.

La frequenza delle mutazioni *ras* nei carcinomi papillari varia, a seconda delle casistiche, dallo 0% al 60%. Questa variabilità non può essere attribuita a differenze metodologiche, ma molto probabilmente dipende da fattori ambientali come l'apporto di iodio. Gli argomenti a favore del ruolo del gene *ras* mutato nella tumorigenesi tiroidea derivano da esperimenti in cui il gene *ras* mutato è stato introdotto *in vitro* in cellule follicolari. In queste condizioni è stimolata la proliferazione cellulare e viene persa o attenuata l'espressione dei marcatori della differenziazione, quali la tireoglobulina, la tireoperossidasi, la captazione dello iodio.



**Figura 6.** Rappresentazione del pathway di trasduzione del segnale di RAS

### 1.3.1b Mutazioni del gene del recettore del TSH e della proteina $G_s\alpha$ (oncogene *gsp*)

Il TSH stimola la proliferazione e la differenziazione delle cellule follicolari della tiroide essenzialmente aumentando la produzione di cAMP e in ultimo attivando i fattori di trascrizione CREB (*cAMP Responsive Element Binding protein*), i quali si legano a determinate sequenze del DNA (*cAMP Responsive Element*) ed aumentano o diminuiscono la trascrizione dei geni a valle. Mutazioni attivanti il gene del TSH-R o della subunità  $G_s\alpha$

sono ritenute responsabili della formazione degli adenomi tossici e riscontrate, più raramente, sia negli adenomi che nei carcinomi follicolari ben differenziati.

### **1.3.1.c RET/PTC**

Il proto-oncogene *ret*, localizzato sul cromosoma 10, codifica per un recettore di membrana con attività tirosin-chinasica. La proteina RET è composta di un dominio extracellulare contenente una regione distale con quattro sequenze ripetute caderina-simili, una regione ricca in cisteine, un dominio transmembrana e un dominio intracellulare con attività tirosin-chinasica.

RET è il recettore della famiglia dei fattori di crescita neurotrofici derivanti dalle cellule gliali, comprendente il GDNF (*Glial-Derived Neurotrophic Factor*), la neurturina, l'artemina e la persefina (6). Il gene è espresso in una varietà di cellule neuronali, incluse la midollare del surrene e le cellule C della tiroide, mentre non è espresso nei tireociti.

Esistono diverse forme attivate del proto-oncogene *ret*, tutte risultanti da riarrangiamenti genici che portano alla fusione del dominio tirosin-chinasico del gene *ret* con il dominio 5' di diversi geni costitutivamente attivi, il quale agisce come promotore assicurando l'espressione permanente del gene *ret*. La proteina chimerica risultante dalla fusione è localizzata nel citoplasma e non nella membrana plasmatica. Tra i tumori tiroidei, riarrangiamenti dell'oncogene *ret* sono stati trovati esclusivamente nel carcinoma papillifero, da cui l'acronimo RET/PTC (*Papillary Thyroid Carcinoma*). Tre forme principali di riarrangiamento sono state descritte fino ad oggi: RET/PTC1, risultato di un'inversione nel cromosoma 10 che porta alla fusione del dominio tirosin-chinasico di *ret* con un gene ubiquitario chiamato *H4*, con funzione ancora ignota; RET/PTC2, risultato di una fusione del dominio tirosin-chinasico di *ret* con un gene codificante la subunità regolatoria R1 $\alpha$  della protein-chinasi A, localizzato nel cromosoma 17; RET/PTC3, risultato

di un'inversione nel cromosoma 10 con fusione del dominio tirosin-chinasico di *ret* con *ELE1*, un gene a funzione ignota. Inoltre, alcune varianti di RET/PTC3 sono state osservate in carcinomi papillari post-Chernobyl (4).

#### **1.3.1.d TRK**

Il proto-oncogene *trk* è localizzato sul cromosoma 1 e codifica per una proteina recettoriale transmembrana con un dominio tirosin-chinasico, normalmente espressa solo nei gangli nervosi, il cui ligando è l'NGF (*Nerve Growth Factor*).

L'attivazione di *trk* avviene attraverso un riarrangiamento genico che porta alla fusione del dominio carbossi-terminale di *trk* con la regione 5' di un gene non correlato, ad espressione ubiquitaria. Sono stati descritti vari riarrangiamenti, limitati ai carcinomi tiroidei papillari, con frequenze tra lo 0% e il 10%: TRK-T1 e TRK-T2, generati dalla fusione del dominio tirosin-chinasico di *trk* con la regione 5' del gene *trp* (*Traslocated Promoter Region*); TRK-T3, risultante dalla fusione del dominio tirosin-chinasico di *trk* con la regione 5' del gene *tag* (*Tumor Antigen Gene*).

#### **1.3.1.e MET**

Il proto-oncogene *met* codifica per un recettore di membrana con un dominio tirosin-chinasico. Il suo ligando è il fattore di crescita degli epatociti (HGF), un potente mitogeno per le cellule epiteliali capace di promuovere la motilità e l'invasività cellulare. L'iperpressione di *met* è stata riscontrata nel 50% dei carcinomi tiroidei, specialmente nei carcinomi papillari (4).

### **1.3.1.f BRAF**

BRAF è l'isoforma B della chinasi RAF, un componente della via di segnale di RAS (Figura 6) che gioca un ruolo centrale nella regolazione della crescita, della divisione e della proliferazione cellulare ed è il più forte attivatore del segnale delle chinasi a valle (7). L'attivazione costitutiva di questa cascata di attivazioni porta alla tumorigenesi. Mutazioni del gene *braf* sono state trovate in una gran varietà di neoplasie umane, soprattutto melanomi.

Studi recenti hanno dimostrato che la mutazione T1799A nell'esone 15 del gene *braf*, che porta alla sostituzione amminoacidica V600E e alla conseguente attivazione costitutiva della chinasi, è presente nei carcinomi papillari della tiroide con una prevalenza dal 29% all'83%. La mutazione T1799A si riscontra esclusivamente nei PTC e nei tumori anaplastici PTC-derivati, ma non nel tessuto tiroideo normale o nelle neoplasie benigne e nei carcinomi follicolari (8).

### **1.3.1.g PAX-8**

Uno dei più importanti fattori trascrizionali specifici della tiroide è Pax-8 (457 aa), che regola il differenziamento durante la vita embrionale, sia della ghiandola tiroidea che del rene e del cervello. Alterazioni del gene *pax-8*, durante l'embriogenesi, dovute sia ad aploinsufficienza che ad overespressione, possono causare rispettivamente ipoplasia tiroidea o tumore di Wilm.

Nella tiroide adulta Pax-8, insieme ai fattori trascrizionali TTF-1 (*Thyroid Transcription Factor 1*) e TTF-2 (*Thyroid Transcription Factor 2*), è responsabile del mantenimento del fenotipo differenziato, caratterizzato dall'espressione della Tg, della TPO, del NIS e del TSH-R. Infatti, mutazioni che colpiscono il gene *pax-8* e ne alterano l'espressione sono state riscontrate nei carcinomi della tiroide e si associano al dedifferenziamento cellulare (9).



In particolare, in più del 50% degli FTC si è trovato il riarrangiamento t(2;3)(q13;p25) che giustappone il gene *pax-8* al gene *PPAR $\gamma$ 1* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  1*). L'oncogene risultante dalla fusione accelera la crescita cellulare, riduce il tasso di apoptosi e conferisce alla cellula la capacità di replicarsi indipendentemente dall'ancoraggio e dal contatto.

### **1.3.2. Geni oncosoppressori**

I geni oncosoppressori codificano per proteine che normalmente inibiscono o arrestano la divisione delle cellule o ne limitano la sopravvivenza. Essi assumono le caratteristiche di oncogeni per perdita di funzione e agiscono in maniera recessiva. Un allele è in genere perduto tramite delezione di una porzione di materiale cromosomico, mentre l'altro allele è inattivato tramite mutazioni puntiformi.

#### **1.3.2a *Rb1***

Il gene *Rb1* è situato sul cromosoma 13q14.2 e il suo prodotto è la proteina RB1 (*RetinoBlastoma 1*), che regola la crescita cellulare esercitando un controllo negativo sulla proliferazione. Essa esercita la sua funzione legandosi al DNA e bloccando il passaggio delle cellule dalla fase G0 a quella G1 impedendo quindi la prosecuzione del ciclo replicativo (10).

Le mutazioni del gene *Rb1*, oltre ad intervenire nell'evoluzione del carcinoma papillare occulto della tiroide in carcinoma clinicamente manifesto, risultano associate a numerose altre neoplasie umane come il retinoblastoma, l'osteosarcoma, il carcinoma della mammella.

#### **1.3.2b *p53***

Il gene *p53* è localizzato sul cromosoma 17 e rappresenta una tra le sedi più frequenti di alterazioni genetiche nei tumori umani. In condizioni fisiologiche, la proteina p53 blocca il

ciclo cellulare attivando un gene che codifica per una proteina di 21kDa, la quale è in grado di legarsi ad una protein-chinasi ciclina-dipendente essenziale nel passaggio dalla fase G1 alla fase S, bloccandone l'attività.

La proteina p53 è localizzata nel nucleo ed esercita un controllo trascrizionale su diversi geni implicati nella risposta cellulare ad agenti mutageni, quali radiazioni ionizzanti, luce ultravioletta o sostanze chimiche.

Quando la cellula subisce un danno genetico si verifica un rapido aumento dei livelli di p53, la quale stimola l'espressione di alcuni geni che inducono l'arresto del ciclo cellulare, permettendo alla cellula di riparare il DNA prima della sua replicazione. Se il danno viene riparato con successo, la proteina p53 attiva un gene chiamato *mdm2*, il cui prodotto si lega a sua volta a p53 e la inattiva, sbloccando in questo modo il ciclo cellulare (11). Se, invece, durante l'arresto del ciclo il genoma non viene riparato in modo soddisfacente la p53 induce l'espressione della proteina BAX (*BCL2-Associated X protein*), che inattiva la proteina anti-apoptotica bcl-2 (*B-cell CLL/Lymphoma 2*), e della proteina IGF-BP3 (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3*), che si lega al recettore del fattore di crescita insulino-simile (IGF) e induce l'apoptosi. Mutazioni puntiformi inattivanti il gene *p53* sono state descritte con elevata frequenza (22-83%) nei carcinomi anaplastici della tiroide ma non in quelli ben differenziati (12).

### **1.3.3. Anomalie genetiche nei tumori tiroidei indotti da radiazioni**

La tiroide è molto sensibile agli effetti delle radiazioni ionizzanti, specialmente negli individui in giovane età. Studi epidemiologici hanno dimostrato che l'esposizione del collo a radiazioni esterne o interne, come nel caso della contaminazione con <sup>131</sup>I in seguito all'incidente nucleare di Chernobyl, sono associate allo sviluppo di PTC.

E' largamente dimostrato che le radiazioni possono indurre riarrangiamenti attivanti l'oncogene *RET/PTC* simili a quelle osservate nei carcinomi papillari spontanei, ma in percentuale molto più elevata.

*RET/PTC* è stato ritrovato nel 55-85% dei carcinomi papillari di bambini esposti alla contaminazione radioattiva post-Chernobyl, come pure in carcinomi papillari insorti in età adulta in soggetti che da bambini avevano ricevuto radiazioni esterne nella regione del collo.

Nel caso dei tumori post-Chernobyl la forma predominante di riarrangiamento è rappresentata da *RET/PTC-3* ed è associata a forme tumorali tendenzialmente più aggressive. Sporadicamente, anche mutazioni di *p53* sono state descritte in carcinomi tiroidei radioindotti.

## CAPITOLO 2

### LE CHINASI AURORA

#### 2.1 Il ciclo cellulare

Il ciclo cellulare è l'insieme di eventi ordinati che regolano la crescita e la divisione di una cellula in relazione a stimoli esterni. Nelle cellule somatiche esso consiste nell'alternanza tra interfase e divisione mitotica. L'interfase è caratterizzata da tre tappe successive, G1 (gap1, primo intervallo), S (sintesi) e G2 (secondo intervallo): nella fase G1 (fase di pre-sintesi) la cellula replica tutti i suoi organelli e si prepara alla replicazione del DNA e dei cromosomi che avviene nella fase S; nella fase G2 (fase post-sintesi) la cellula condensa il materiale genetico nelle strutture cromosomiali ovvero si prepara alla divisione cellulare che ha luogo durante la fase M.

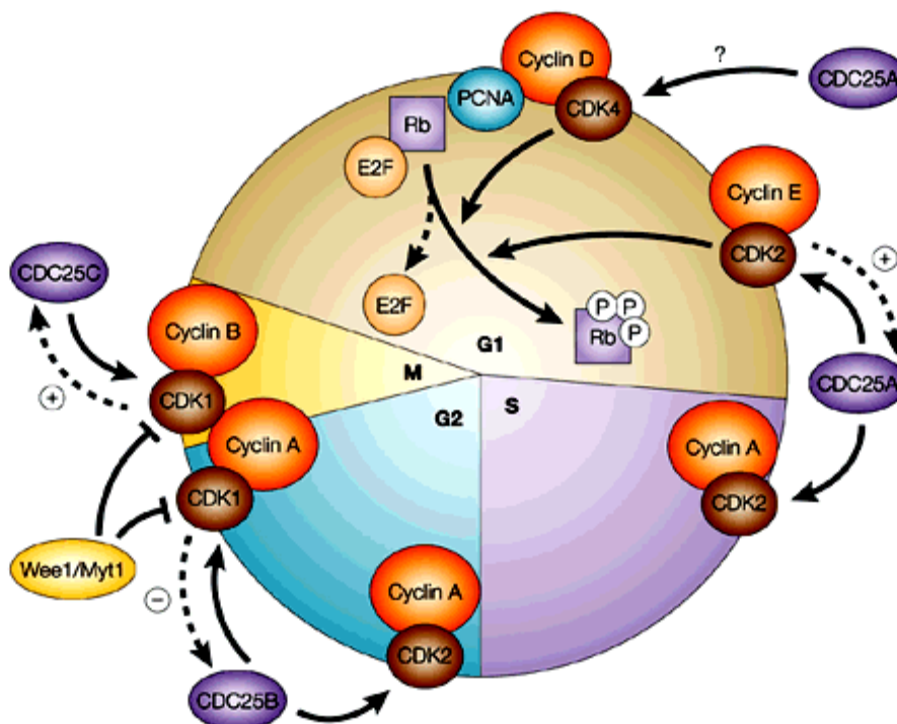


Figura 7. Ciclo cellulare e protein-chinasi mitotiche.

Nell'interfase, quindi, avviene la duplicazione esatta dei cromosomi e nella successiva mitosi si ottiene la distribuzione di un assetto cromosomico completo a ciascuno dei due nuclei figli. La maggior parte del ciclo cellulare è occupata dalla fase G1, anche se la durata relativa di ciascuna fase varia a seconda del tipo di cellula. Inoltre, in un dato organismo, le differenze nella lunghezza del ciclo cellulare dipendono essenzialmente dalla durata della fase G1, mentre la durata di S, G2 ed M è approssimativamente la stessa per tutti i tipi cellulari. Infine, alcune cellule escono dal ciclo cellulare ed entrano in uno stato di quiescenza chiamato G0; alcune cellule, come quelle nervose o quelle del muscolo scheletrico striato, rimangono in questo stadio per tutta la vita dell'organismo (13). La fase mitotica vera e propria è un evento continuo, che si può schematizzare in cinque fasi: profase, prometafase, metafase, anafase, telofase: essa porta al compimento della divisione cellulare, con formazione di due cellule figlie identiche. Il primo evento visibile della fase mitotica è rappresentato dalla condensazione della cromatina, con la quale i cromosomi acquisiscono la mobilità necessaria per la successiva ripartizione nelle cellule figlie. Un fattore importante per la formazione dei cromosomi mitotici è la fosforilazione delle code ammino-terminali degli istoni che formano il nucleosoma, e in particolare degli istoni H1 e H3.

In aggiunta, la fosforilazione della lamina nucleare in diversi siti delle catene polipeptidiche che la compongono favorisce la disintegrazione del cariolemma, il quale si frammenta in numerose piccole vescicole.

Nel corso della profase i singoli cromatidi divengono distinguibili al microscopio ottico come strutture progressivamente più corte e spesse, finché in tarda profase si osserva ciascun cromosoma, che si era duplicato durante la precedente fase S, costituito da due cromatidi fratelli. Inoltre, durante la profase si organizza al di fuori del nucleo il fuso mitotico o "apparato del fuso". La sua formazione ha inizio con la separazione dei

centrosomi o “centri di organizzazione dei microtubuli” (MTOC), strutture dense situate in prossimità del nucleo e costituite da una coppia di organelli cilindrici detti centrioli, i quali vengono duplicati durante la fase S e rimangono appaiati fino all’innesco della profase mitotica. Quando successivamente si separano migrando ai poli opposti della cellula, i centrosomi divengono i centri focali di assemblaggio dei microtubuli costituenti il fuso mitotico. Verso la fine della profase l’involucro nucleare si dissolve e scompare il nucleolo, consentendo al fuso di penetrare nella regione nucleare. Quindi i microtubuli si associano ai cromosomi legandosi ad un complesso multiproteico situato nella loro regione centrale, detto cinetocore. Il processo di attacco avviene tramite la connessione dei cromatidi fratelli a microtubuli derivanti da centrosomi diversi, in modo tale che ciascun cromosoma è posto in tensione tra i due poli del fuso.

Questi cambiamenti avvengono sotto lo stretto controllo delle protein-chinasi mitotiche: inizialmente le chinasi ciclina-dipendenti M-Cdk causano la fosforilazione di due classi di proteine, le proteine motrici dei microtubuli e le proteine associate ai microtubuli (MAP) che contrastano l’effetto delle catastrofine, proteine che destabilizzano il microtubulo (Figura 6). Durante la prometafase si rompe la membrana nucleare grazie alla fosforilazione diretta della lamina nucleare da parte di M-Cdk. Quindi inizia il processo di metafase: la membrana nucleare si è dissolta completamente ed i cromosomi incominciano a disporsi nella regione mediana della cellula, allineando i centromeri su un piano perpendicolare all’asse maggiore del fuso; l’ottenimento di questa disposizione è dovuto all’azione dei microtubuli sui cinetocori, ed il piano su cui si collocano i cromosomi prende il nome di “piastra metafasica” o “piastra equatoriale”. Il fuso di metafase è un complesso apparato sospeso in uno stato di equilibrio dinamico; infatti, prima dell’inizio dell’anafase, i cromosomi non sono semplici passeggeri in quanto creano un ambiente che favorisce la nucleazione e la stabilità dei microtubuli e quindi la formazione stessa del fuso. Questa

capacità dei cromosomi sembra dipendere da un fattore di scambio dei nucleotidi guaninici (GEF) legato alla cromatina, che stimola una piccola GTPasi nel citosol chiamata Ran, inducendola a scambiare GTP con GDP. Ran-GTP è attivata e rilascia le proteine stabilizzanti i microtubuli dai complessi proteici nel citosol, stimolando così la nucleazione locale dei microtubuli attorno i cromosomi.

L'anafase inizia con il rilascio delle coesine, proteine legate al DNA che tengono uniti i cromatidi fratelli. La transizione metafase-anafase è stimolata dall'attivazione del complesso promotore dell'anafase (APC). Questo complesso proteolitico attivato ha due funzioni cruciali: il taglio proteolitico e l'inattivazione delle cicline di fase M, tra cui M-Cdk, e il taglio proteolitico di una proteina inibitoria (securina) attivando così una proteasi chiamata separasi. La separasi, quindi, taglia una subunità nel complesso della coesina per staccare i cromatidi fratelli che iniziano a migrare ai poli opposti. Questo movimento sembra essere la risultante di due processi indipendenti e simultanei: l'accorciamento graduale delle fibre legate ai cinetocori, mediante depolimerizzazione dei microtubuli, e l'allontanamento dei due poli del fuso, prodotto dallo scorrimento reciproco delle fibre non legate ai cinetocori ad opera di proteine motrici.

La transizione dalla metafase all'anafase risulta associata alla defosforilazione di molte proteine, comprese quelle della lamina nucleare e l'istone H1. La telofase, ovvero l'ultima fase della mitosi, completa la migrazione dei cromosomi ai due poli. Successivamente le vescicole costituite dalla membrana nucleare si attaccano alla superficie dei cromosomi e si fondono tra loro ricostituendo il cariolemma, i microtubuli del fuso scompaiono e il nucleolo si riforma.

La citocinesi, ovvero la separazione delle due cellule figlie, generalmente inizia negli stadi tardivi dell'anafase e si completa nella telofase. Sebbene la divisione nucleare e quella citoplasmatica siano generalmente contemporanee, sono tuttavia fenomeni indipendenti;

durante l'anafase, molecole quali l'actina e la miosina si ridistribuiscono nella zona centrale tra i poli a formare un anello contrattile, che dà inizio al processo di citocinesi. L'anello è composto principalmente da filamenti di actina ed è legato al versante interno della membrana plasmatica, in cui produce una progressiva invaginazione della membrana, o "solco divisorio", tra le due cellule figlie. Prima di completare la divisione, queste rimangono unite per un certo intervallo di tempo da un sottile ponte citoplasmatico detto "corpo mediano", contenente i resti dei microtubuli polari e una densa matrice cellulare. Infine, la citocinesi si completa con la distruzione del ponte e il ripristino di una membrana cellulare completa intorno a ciascuna cellula.

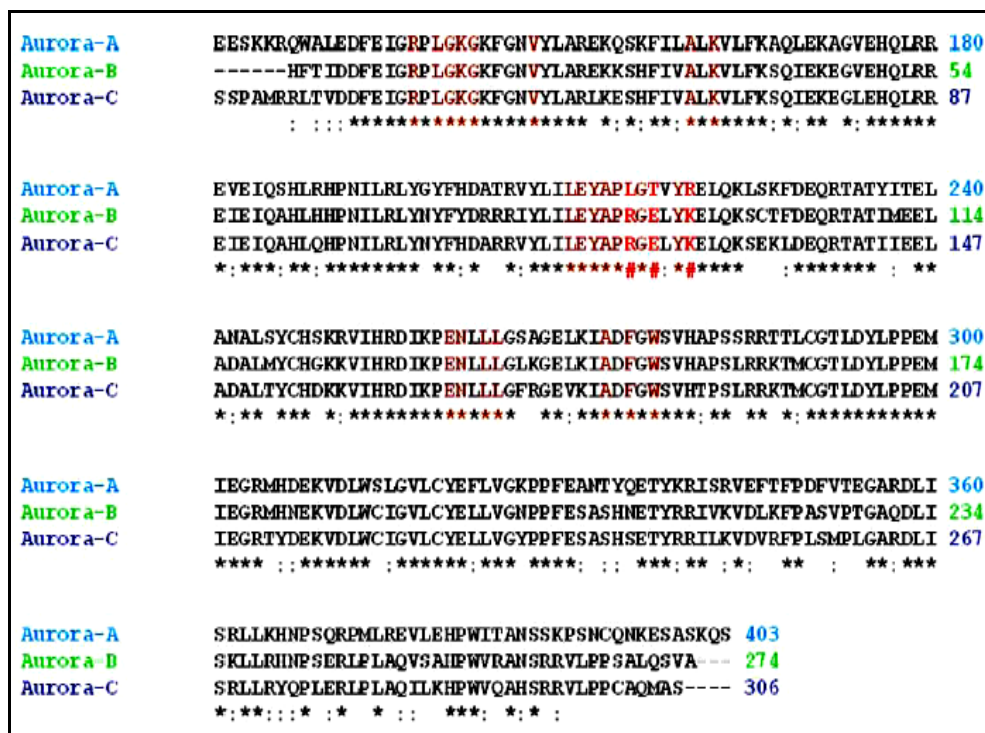
Come già accennato in precedenza, la fosforilazione reversibile delle proteine gioca un ruolo essenziale nel corretto svolgimento di tutti questi eventi; tali processi di attivazione-inibizione, infatti, regolano tutto il ciclo cellulare costituiscono punti di controllo (check-point) per quanto concerne la divisione e la regolazione della fisiologia cellulare. I principali regolatori della progressione del ciclo cellulare sono le chinasi ciclina-dipendenti (CDKs), una famiglia di protein-chinasi eterodimeriche la cui attività dipende dalla presenza di una subunità regolatoria denominata ciclina, che fosforilano una serie di effettori responsabili di molti processi cellulari, dalla replicazione del DNA alla mitosi. Tuttavia diverse altre proteine agiscono come importanti fattori mitotici, sia direttamente che in cooperazione con le CDKs. Tra queste, la famiglia delle chinasi PLK (Polo-Like Kinases), implicate nella maturazione dei centrosomi, nell'attivazione e nell'inattivazione di Cdk1 e nella citocinesi; le NIMA (Never In Mitosis A), famiglia di protein-chinasi coinvolte nella duplicazione dei centrosomi; le chinasi Bub1 e Mps1, presenti nei cinetocori e regolatrici del check-point anafasico; infine le chinasi Aurora/Ip11p, attive nella regolazione della segregazione cromosomica e della citocinesi (14).



## 2.2 Le chinasi Aurora

Le chinasi Aurora sono una famiglia di serin-treonin-chinasi implicate in numerosi processi durante la divisione cellulare, quali il corretto assemblaggio e la stabilità del fuso mitotico, la condensazione cromosomica, le interazioni cinetocori-microtubuli e l'orientamento dei cromosomi sul piano metafaseico (15). La prima chinasi Aurora è stata identificata nel 1995 in *Drosophila melanogaster*, nella quale si era osservato un arresto del processo mitotico dovuto ad un'errata separazione dell'apparato centrosomico, che aveva provocato un legame monotelico tra i cinetocori e il fuso mitotico (16, 17). Tale effetto era dovuto alla mutazione di un gene che fu chiamato Aurora, in quanto la proteina per cui esso codifica, localizzata ai poli del fuso mitotico, ricordava l'aurora boreale visibile al polo nord della terra (16,17). I genomi di *D. melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* codificano due diverse proteine Aurora, denominate A e B, mentre nei lieviti *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* è stato identificato un solo omologo Aurora. Invece, il genoma dei mammiferi codifica per tre chinasi Aurora: A, B, e C, e ciò suggerisce che i tre membri della famiglia si siano evoluti da un unico gene ancestrale. In particolare, gli studi filogenetici indicano che le chinasi Aurora dei vertebrati derivano da un singolo precursore presente negli urocordati. Inoltre, la divergenza tra le Aurora-B e -C, strutturalmente simili, si sarebbe verificata più recentemente nei mammiferi, dalla duplicazione di un gene ancestrale B/C, rinvenuto nei vertebrati a sangue caldo (18).

Questa famiglia di chinasi regola numerosi processi durante la divisione cellulare; è infatti coinvolta nel controllo del centrosoma e svolge un ruolo essenziale nei processi mitotici come la condensazione cromosomica, le interazioni cinetocori-microtubuli, l'orientamento dei cromosomi e la formazione del piano metafaseico (14, 19) (Figura 8).

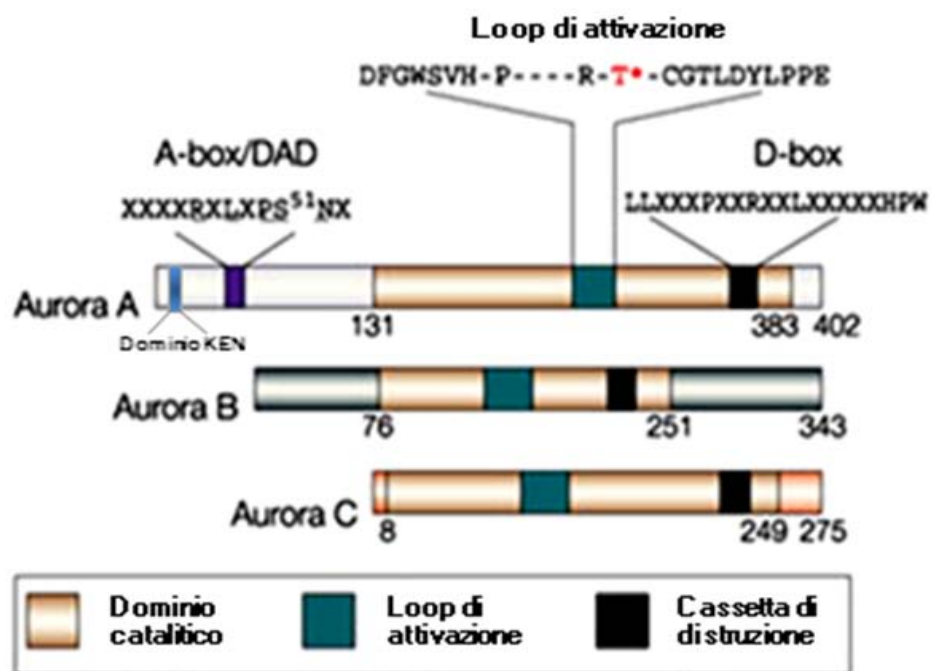


**Figura 8.** Allineamento della sequenza amminoacidica del dominio catalitico delle chinasi Aurora-A, -B e -C. I residui conservati nell'allineamento sono di colore marrone, mentre i tre residui non conservati sono in colore rosso. Questi ultimi sono particolarmente importanti per il disegno di inibitori specifici.

Le tre chinasi Aurora nell'uomo sono codificate da geni diversi, rispettivamente *stk6*, *stk12* e *stk13* (15). Le dimensioni delle rispettive proteine variano da 309 a 403 amminoacidi, con un'evidente divergenza di sequenza tra le specie.

Come mostrato in figura 8, le tre Aurora presentano un'organizzazione di sequenza simile: un dominio ammino-terminale, un dominio protein-chinasico ed un corto dominio carbossi-terminale di 15-20 residui amminoacidici. Il dominio catalitico è maggiormente conservato e come nelle altre serin-treonin-chinasi è composto da due lobi: lobo N e lobo C. Il lobo N è responsabile dell'interazione con l'ATP e il lobo C del legame con i substrati; allorquando i due lobi assumono determinate conformazioni le chinasi Aurora possono svolgere le loro funzioni (17).

Sebbene questa famiglia di proteine mostri un'elevata similitudine nella sequenza e nella struttura, le singole Aurora presentano distribuzioni sub-cellulari completamente diverse; tale divergenza è attribuibile al dominio ammino-terminale che codifica per una sequenza poco conservata responsabile delle differenti localizzazioni e specificità di substrato (14, 17). L'allineamento delle Aurora-A e -B ha permesso di identificare in questa regione un motivo conservato "KEN" che comprende 11-18 residui amminoacidici ed agisce come un segnale di riconoscimento del complesso promotore dell'anafase (APC) Cdh-1-dipendente (20).



**Figura 9.** Organizzazione dei domini delle chinasi Aurora-A, -B e -C.

Le chinasi Aurora presentano tre domini: il dominio N-terminale e C-terminale contengono la maggior parte dei domini regolatori delle Aurora, mentre la regione centrale contiene il dominio catalitico.

Il dominio C-terminale dell'Aurora-B presenta il 53% e il 73% di similarità di sequenza con Aurora-A e -C, rispettivamente; in esso è contenuto un elemento "D-box" o "destruction-box", che viene legato dalle proteine "Fizzy-related" facenti parte del complesso APC. Un secondo elemento di sequenza, detto "A Box" ovvero il "motivo attivante D-box" situato nella porzione ammino-terminale delle Aurora-A e -B, è necessario per la funzionalità del D-box (21, 17). Il complesso APC, interagendo con tali sequenze, indirizza le chinasi Aurora alla degradazione ubiquitino-mediata ad opera del proteasoma (17, 15).

Le tre chinasi Aurora sono collocate in diverse aree della cellula strettamente legate alla funzione svolta da ognuna di esse durante il ciclo cellulare. L'espressione dell'Aurora-A e la sua attività chinasica aumentano dalla tarda fase G2 a quella M del ciclo cellulare (22); essa è presente nell'area pericentrosomica a partire dalla tarda fase S, successivamente alla duplicazione centriolare, fino alla fine della mitosi.

L'Aurora-B appartiene ad un gruppo eterogeneo di proteine dette "passeggeri cromosomici", accomunate dalle caratteristiche localizzazioni che assumono durante la divisione mitotica. Nella fase G2 tali proteine sono intranucleari, durante la profase si associano ai cromosomi in maniera diffusa e in prometafase confluiscono sotto forma di complessi sui centromeri; infine, al principio dell'anafase, si staccano dai cromatidi in via di separazione e vanno a localizzarsi nella regione mediana del fuso, dove rimangono fino al completamento della citocinesi (23).

Oltre all'Aurora-B, fanno parte di questo gruppo la INCENP (INner CENTromere Protein), la survivina/IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein), la borealina/Dasra B, la TD-60 (Telomerase Disk), la ICIS (Inner Centromere kinesin I Stimulator) e l'Aurora-C (23, 24).

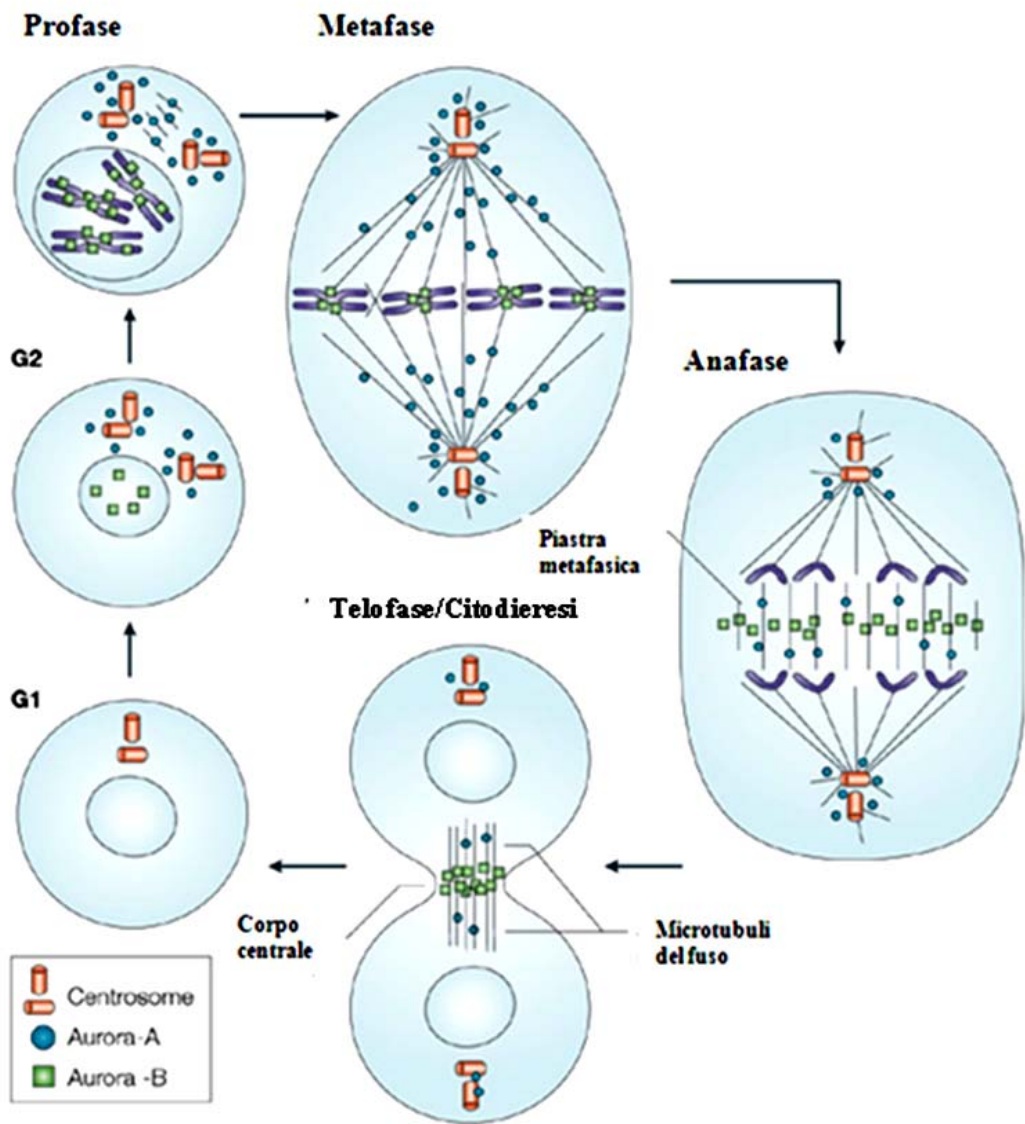


Figura 10. Localizzazione intracellulare delle chinasi Aurora

### 2.2.1 Aurora-A

L'Aurora-A è associata ai centrosomi e alle regioni dei microtubuli in prossimità del centrosoma e partecipa al reclutamento di varie componenti del fuso mitotico in formazione; si lega ai centrosomi che si separano durante la tarda fase S/precoce G2, e quindi viene degradata dal proteosoma in modo cdh1-dipendente (15, 25).

Uno dei ruoli della chinasi Aurora-A è la corretta separazione e maturazione dei centrosomi. Infatti, è stato dimostrato che la sua espressione ectopica nelle cellule in coltura produce amplificazione centrosomica e che tale condizione non dipende dalla sua attività enzimatica, poiché l'eccesso della proteina in forma inattiva genera un effetto analogo (26). Inoltre, alcuni mutanti Aurora-A *-/-* di *Drosophila melanogaster* mostrano un'alta frequenza di figure mitotiche monopolari; ciò indica un ruolo importante per la chinasi nella separazione del centrosoma (15, 27).

Una volta duplicati, i centrosomi devono migrare attorno all'involucro nucleare per raggiungere posizioni opposte nella cellula, dalle quali in seguito si sviluppano i due poli del fuso mitotico. Questa migrazione è realizzata dai microtubuli associati ai centrosomi e dipende dall'attività di proteine motrici, principalmente KRP/KLP (Kinesin Related Protein/Kinesin Like Protein), che promuovono lo scorrimento reciproco dei microtubuli contigui mediante l'idrolisi di ATP o GTP. L'attività di tali proteine motrici è regolata da alcune protein-chinasi mediante la fosforilazione di specifici residui amminoacidici. Una di queste è la proteina Eg5, localizzata nell'area intermedia fra i due centrosomi duplicati e identificata quale substrato dell'Aurora-A (14, 28, 29); l'inibizione di Eg5 o di Aurora-A determinano in egual misura l'incapacità dei centrosomi a dividersi, con conseguente formazione di un fuso mitotico monopolare.

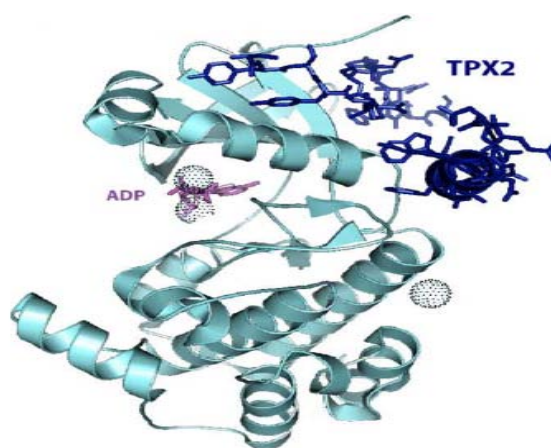
Per divenire completamente funzionali dopo la duplicazione e la separazione, i centrosomi devono richiamare un certo numero di proteine in un processo chiamato maturazione. In assenza di Aurora-A, il reclutamento di queste proteine diviene inadeguato e la quantità di microtubuli del fuso appare diminuita di circa il 60%, la morfologia dei microtubuli astrali risulta aberrante ed il fuso mitotico diventa instabile (14). Le proteine la cui localizzazione centrosomica dipende dall'Aurora-A sono: la  $\gamma$ -tubulina, essenziale per l'assemblaggio delle tubuline  $\alpha$  e  $\beta$  costituenti i microtubuli, la TACC3 (Transforming Acidic Coiled Coil) che si associa ai microtubuli e ne stabilizza l'assetto (15, 22), e la CPEB (Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein) che una volta fosforilata induce la poliadenilazione di vari mRNA, ne dirige la corretta localizzazione subcellulare e risulta essenziale per l'integrità dell'apparato mitotico.

La regolazione dell'attività enzimatica dell'Aurora-A è complessa e coinvolge reazioni sia di fosforilazione/defosforilazione che di degradazione. La fosforilazione stimola l'attività della chinasi Aurora-A, infatti nella proteina sono stati identificati tre siti di fosforilazione. Il sito principale è la Thr295 presente nel dominio catalitico (Figura 10); tale residuo è essenziale per l'attività della proteina e si trova in una porzione di sequenza riconosciuta dalla protein-chinasi A (PKA), la quale è in grado di fosforilare ed attivare Aurora-A in vitro. Un secondo residuo ammino-terminale, Ser53, è fosforilato durante la fase M e potrebbe avere un ruolo nella regolazione della degradazione della proteina. Sebbene sia stato identificato un terzo sito di fosforilazione, Ser349, questo non sembra essere essenziale per l'attività chinasi.

La fosfatasi PP1 inibisce l'Aurora-A rimuovendo il gruppo fosfato dalla treonina. In questo modo la proteina viene degradata in tarda fase M/precoce G1 attraverso il complesso ciclosoma/complesso promotore dell'anafase (APC/C). Recentemente è stata identificata un'altra proteina che regola negativamente l'Aurora-A: AIP (Aurora-A Interacting Protein),

la quale contrasta l'attività della chinasi inducendone la degradazione proteasoma-dipendente.

Un importante attivatore ed anche substrato dell'Aurora-A è la proteina TPX2 (Targeting Protein for Xenopus kinesin-like protein 2) (Figura 11); questa proteina viene rilasciata dal complesso con le importine  $\alpha$  e  $\beta$  ad opera della proteina Ran-GTP, una piccola GTPasi richiesta per il trasporto nucleare, l'assemblaggio della membrana nucleare e del fuso mitotico (14). La TPX2, una volta liberata dai complessi, si lega all'Aurora-A nel centrosoma e la guida verso i microtubuli prossimali al polo mitotico; inoltre, ne stimola l'autofosforilazione sulla Thr295 bloccando al contempo l'azione inibitoria della PP1 (14). Un simile meccanismo di attivazione dell'Aurora-A è riscontrabile anche nella fase G2 del ciclo cellulare ed avviene ad opera della proteina Ajuba, la cui forma fosforilata si lega ad Aurora-A e la attiva (22). La deplezione di Ajuba previene l'attivazione di Aurora-A nei centrosomi in tarda fase G2 e inibisce l'ingresso della cellula nella fase mitotica. E' interessante notare che affinché l'Aurora-A possa autofosforilarsi è necessario il legame con alcuni dei suoi substrati; tale associazione non solo attiva la chinasi, ma la protegge dalla defosforilazione ad opera della PP1 (15).

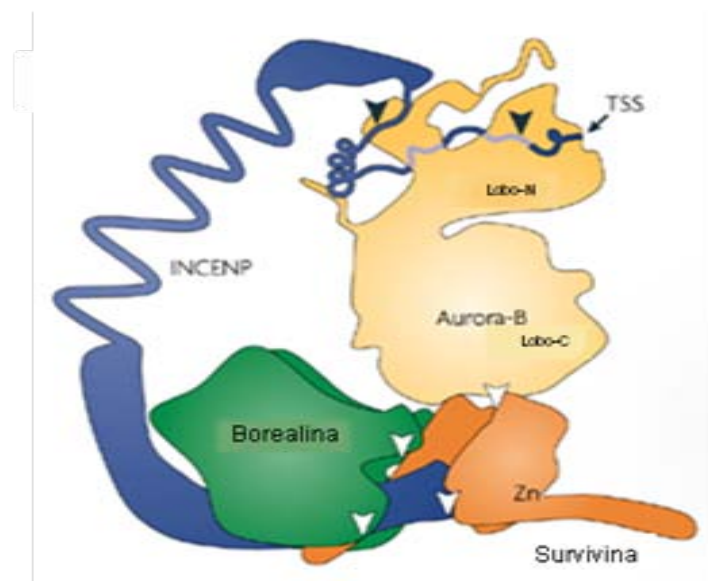


**Figura 11.** Struttura tridimensionale della chinasi Aurora-A in complesso con la proteina associata ai microtubuli TPX2.



### 2.2.2 Aurora-B

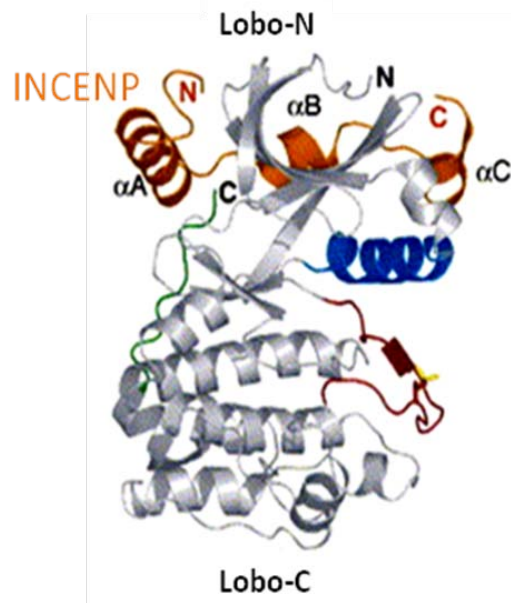
Come già anticipato precedentemente, l'Aurora-B fa parte di un gruppo di proteine eterogenee dette "passeggeri cromosomici". Nelle cellule di mammifero essa è un componente di un complesso più grande comprendente INCENP, survivina e borealina (15).



**Figura 12.** Complesso dell'Aurora-B con INCENP, survivina e borealina.

Come per Aurora-A, anche l'attivazione dell'Aurora-B è dovuta all'autofosforilazione in seguito all'associazione con il suo substrato INCENP (15). Inoltre, INCENP è necessaria per la localizzazione di Aurora-B sui cinetocori. Sebbene la survivina non sia un substrato di Aurora-B, essa si associa alla chinasi e ne stimola l'attività. La borealina, invece, è un substrato della chinasi ma non un suo attivatore (15, 30).

Questo complesso di proteine è responsabile di una modificazione peculiare, conservata dai lieviti ai vertebrati e correlata alla condensazione della cromatina, ovvero la fosforilazione dell'istone H3 sulla Ser10 (24).



**Figura 13.** Struttura tridimensionale della chinasi Aurora-B in complesso con la proteina INCENP.

L'Aurora-B è responsabile anche della fosforilazione, sempre sull'istone H3, della Ser28 dalla profase alla metafase (15). Inoltre, probabili substrati dell'Aurora-B sono anche alcune componenti cromosomiali non istoniche, come la topoisomerasi II $\alpha$  (18).

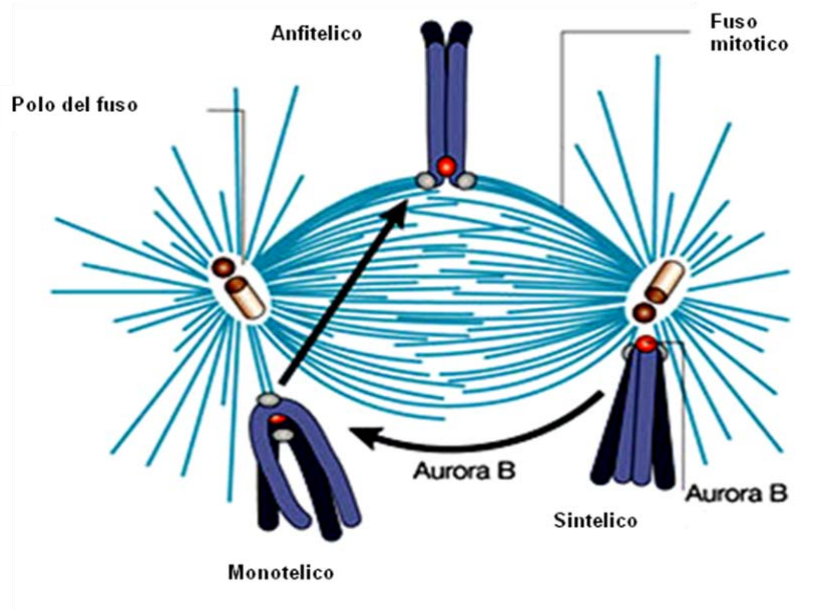
Tuttavia il ruolo di tali eventi nella condensazione è ancora controverso, in quanto la mancanza di Aurora-B non sembra influenzare il grado di compattamento della cromatina. La localizzazione del complesso della chinasi Aurora-B sui centromeri richiede l'interazione con altri passeggeri cromosomici, quali la TD-60 (23, 24) e la fosforilazione di almeno una proteina del cinetocore, la CENP-A (kinetochore-specific H3 histone variant CENtromer Protein) sulla Ser7.

La funzione centromerica del complesso dell'Aurora-B consiste nella correzione degli appaiamenti errati che si formano durante l'attacco dei microtubuli (23). Dopo la rottura della membrana nucleare in prometafase, i cromosomi stabiliscono rapidamente i contatti con i microtubuli del fuso creando inizialmente un attacco monotelico, ovvero il legame di

uno dei due cinetocori ad un singolo microtubulo. Successivamente, il cinetocore libero cattura un microtubulo del polo opposto creando un attacco bipolare, detto anfitelico, che porta al posizionamento del cromosoma tra i poli del fuso, sulla piastra metafasica. Tuttavia è possibile che si formino connessioni anomale, se entrambi i cromatidi fratelli si legano a microtubuli derivanti dallo stesso polo (attacco sintetico) oppure se un cinetocore si connette a fibre derivanti da poli opposti (attacco merotelico).

L'Aurora-B è ritenuta responsabile della rottura degli appaiamenti sintetici; il meccanismo di regolazione non è ben chiaro, ma si presume che la sua attività sia influenzata dallo stato di tensione tra i centromeri omologhi (24). E' stato ipotizzato che quando un cromosoma assume un corretto orientamento anfitelico, la trazione esercitata dai microtubuli sui centromeri determini la separazione fisica dell'Aurora-B dai suoi substrati o la disgregazione del complesso dei passeggeri cromosomici.

Nel caso di appaiamento merotelico, è stato invece proposto un meccanismo che prevede l'intervento delle proteine ICIS (Inner Centromere kinesin I Stimulator) e MCAK (Mitotic Centromere Associated Kinesin): ICIS è un fattore centromerico coinvolto nella rimozione dei microtubuli che si attaccano lateralmente e MCAK una chinesina I che promuove il disassemblaggio dei microtubuli, la cui attività viene stimolata da ICIS.



**Figura 14.** Attività dell'Aurora-B nella correzione degli appaiamenti errati durante l'attacco dei microtubuli.

MCAK è un substrato dell'Aurora-B e la sua fosforilazione determina l'inibizione dell'attività depolimerizzante, mentre ICIS è stata isolata sotto forma di complessi con INCENP e Aurora-B (17). Pertanto, la regolazione di entrambe le proteine da parte di Aurora-B potrebbe rappresentare un fattore importante nel processo di rottura degli appaiamenti merotelici (15).

Il complesso dell'Aurora-B è recentemente emerso come importante fattore per il superamento del check-point di assemblaggio del fuso, un circuito biochimico che permette la progressione mitotica solo dopo che tutti i cromosomi abbiano assunto un adatto orientamento bipolare sul fuso mitotico (15). Il check-point è attivato dai cinetocori che mancano di legami ai microtubuli e anche dalla mancanza di tensione nel fuso, sebbene il meccanismo di attivazione non sia ancora chiaro.

Le chinasi Aurora sono richieste per l'attivazione stabile del check-point come risultato della perdita di tensione del fuso. Nel lievito, durante l'anafase, si ha la separazione dei cromatidi fratelli grazie all'azione della separasi, un enzima che sembra avere una seconda

funzione, ovvero l'attivazione della protein-fosfatasi Cdc14. Uno dei bersagli di questa fosfatasi è INCENP, la cui defosforilazione è un evento necessario e sufficiente affinché abbia luogo la rilocalizzazione del complesso dell'Aurora-B dai cinetocori alla zona mediana del fuso. E' verosimile che una proteina analoga alla Cdc14 sia responsabile della rilocalizzazione del complesso nelle cellule umane.

Aurora-B è essenziale anche per la citocinesi, ed infatti è stato osservato che l'iperespressione di una sua forma cataliticamente inattiva nel ratto previene l'ultima fase della citocinesi (31). Un fenomeno simile è prodotto dall'espressione esogena di un mutante dominante di INCENP mancante del dominio di legame con l'Aurora-B, che determina la delocalizzazione di quest'ultima. Tali evidenze possono spiegare il fenomeno dell'aumento della ploidia nelle cellule che esprimono bassi livelli di Aurora-B (17).

Altri bersagli specifici di Aurora-B sono stati individuati nel solco di divisione tramite l'utilizzo di anticorpi specifici. Questi comprendono le subunità costituenti i filamenti intermedi e i microfilamenti, come la vimentina, la desmina, la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) e la catena leggera regolatoria della miosina II.

Durante l'anafase e la telofase, l'Aurora-B fosforila la Ser72 della vimentina, proteina importante per la formazione del solco divisorio (18); la mancanza di questa fosforilazione porta le due cellule figlie a restare legate attraverso i lunghi ponti citoplasmatici. Anche la fosforilazione della desmina da parte dell'Aurora-B contribuisce a destabilizzare i filamenti intermedi, evento essenziale negli ultimi stadi della citocinesi per permettere la destrutturazione del citoscheletro e l'introflessione della membrana plasmatica.

Inoltre, l'Aurora-B fosforila la proteina MgcRacGAP (Rac GTPase Activating Protein 1) modificandone la specificità di substrato, da attivatore della Rac GTPasi ad attivatore della chinasi Rho A, la quale regola la polimerizzazione dei microfilamenti di actina che compongono l'anello contrattile.

L'Aurora-B risulta necessaria anche per la localizzazione nell'area centrale della MKLP/ZEN4 (Mitotic Kinesin-Like Protein/ZygotiC epidermal ENclosure defective), una proteina implicata nell'assemblaggio e nella funzionalità delle fibre centrali del fuso.

### 2.2.3 Aurora-C

A differenza degli altri due membri della famiglia, si conosce ancora poco sulla funzione e sulla regolazione dell'Aurora-C. La sua struttura primaria mostra un'elevata omologia con quella dell'Aurora-B (83%), mentre l'identità di sequenza con l'Aurora-A è minore (71%) (15).

L'Aurora-C è stata individuata unicamente nei mammiferi, in cui viene espressa ad elevati livelli nel testicolo (32), mentre in altri tipi cellulari, come i fibroblasti, la sua espressione è di gran lunga inferiore rispetto quella di Aurora-B. Risulta, invece, iperespressa in alcuni tumori umani (15).

Il livello delle proteine Aurora-B e -C ha un picco durante il passaggio G2/M, ma i loro profili di espressione rivelano una regolazione differenziata nel tempo. Aurora-C, come Aurora-B, interagisce con la proteina INCENP all'estremità carbossi-terminale contenente il dominio conservato "IN box". Saggi di competizione di legame ed esperimenti di transfezione hanno rivelato che, rispetto ad Aurora-B, Aurora-C ha un'affinità di legame più bassa nei confronti di INCENP (33). Studi recenti hanno indicato la capacità dell'Aurora-C di associarsi con l'Aurora-B, la INCENP e la survivina a formare dei complessi in grado di fosforilare l'istone H3, contribuendo quindi alla regolazione della segregazione cromosomica e alla citocinesi. In esperimenti di siRNA con silenziamento di entrambe le Aurora-B e -C è stato osservato un effetto additivo nel generare il fenotipo multinucleato (32, 33). E' stato inoltre dimostrato che l'Aurora-C funzionante è in grado di revertire tale

fenotipo multinucleato: tale capacità indica che la sua funzione si sovrappone e completa quella di Aurora-B durante la mitosi (34).

	SUBSTRATO	LOCALIZZAZIONE CELLULARE	FUNZIONI
<b>AURORA-A</b>	PP1 P53 CDH-1 TPX-2 RAS-GAP	Poli del fuso Centrosomi	Assemblaggio del fuso; Citocinesi; Maturazione e separazione del centrosoma.
<b>AURORA-B</b>	ISTONE H3 DESMINA INCENP CENP-A REC-8 VIMENTINA M-CAK SURVIVINA	Cromosomi Solco mediano	Allineamento e segregazione del cromosoma; Citocinesi; Dinamismo dei microtubuli.
<b>AURORA-C</b>	AURORA-B INCENP	Cromosomi Solco mediano	Spermatogenesi; Segregazione Cromosomica; Citocinesi.

**Tabella 1.** Substrati, localizzazione e funzioni delle tre chinasi Aurora-A, -B e -C.

## 2.3 Le chinasi Aurora nei tumori

### 2.3.1. *Cenni generali*

La cancerogenesi consiste in un processo multifasico che inizia con l'insorgenza di mutazioni genomiche in una cellula, che consentono alla stessa di acquisire progressivamente nuove capacità di proliferazione, sopravvivenza e mobilità (35).

L'instabilità del genoma è una costante di tutte le classi di tumori solidi ed è un evento che favorisce grandemente l'accumulo di mutazioni successive, necessarie al completamento della trasformazione tumorale. Questa instabilità può assumere una varietà di forme, dalla frammentazione del DNA microsatellite che produce piccole alterazioni di oligobasi, specialmente all'interno di sequenze ripetute, ai fenomeni macroscopici di riarrangiamento genico (delezioni, inversioni, traslocazioni) (36).

La manifestazione più frequente di instabilità genomica in una cellula tumorale è l'aneuploidia, aberrazione cromosomica dovuta alla presenza di un numero di cromosomi che non è un multiplo esatto del corredo aploide. Nel corso del ciclo cellulare, la condizione aneuploide può instaurarsi in seguito a diversi eventi, quali la duplicazione abnorme dei centrioli nell'interfase con conseguente formazione di fusi mitotici multipolari, la non separazione dei centrosomi, il mancato allineamento dei cromosomi sulla piastra metafasica o il fallimento nella citocinesi (17). L'evidenza che la velocità della progressione tumorale rifletta il grado d'instabilità genomica costituisce un prerequisito all'utilizzo di quest'ultima come fattore di discriminazione tra tumori benigni e maligni.

Il meccanismo regolatorio che assicura che i centrosomi si dividano una sola volta ad ogni ciclo cellulare è una condizione essenziale per l'assemblaggio del fuso bipolare e la stabilità mitotica. Inoltre, lo stesso processo assicura ad ogni divisione il passaggio di un singolo centrosoma in ciascuna cellula figlia. Mutazioni o alterazioni dell'espressione dei geni



responsabili del controllo numerico dei centrosomi potrebbero determinare l'annullamento del check-point che impedisce il ripetersi delle duplicazioni centrosomiche; i centrosomi sovranumerari funzionerebbero quindi anch'essi come MTOC, dando origine a fusi mitotici aberranti (15). I fusi multipolari sono generalmente antagonisti della vitalità e della crescita cellulare provocando mitosi abortive e generazione di cellule figlie con squilibri genetici letali. Pertanto, la progenie cellulare derivante da tali divisioni dovrebbe in gran parte andare incontro ad apoptosi: tuttavia è ragionevole ipotizzare che una cellula figlia, qualora dotata di un apparato cromosomico e di un dosaggio genico sufficienti alla sua vitalità, potrebbe dare origine, tramite selezione clonale, ad una popolazione di cellule aneuploidi. La sopravvivenza, comunque, dipenderebbe dalla capacità di tali cellule di accumulare mutazioni ulteriori che le rendano capaci di dividersi efficientemente nonostante l'eccesso numerico dei centrosomi.

Diverse anomalie del numero, dimensione e/o morfologia dei centrosomi sono state osservate in molti tipi di tumori umani, inclusi quelli della mammella, colon, fegato, midollo, cervice, prostata e tiroide (17). Le anomalie cromosomiche delle cellule tumorali sono spesso associate ad alterazioni dell'espressione e/o attività di enzimi che giocano un ruolo chiave nella progressione del ciclo cellulare, e in modo particolare nella mitosi (35).

La scoperta del ruolo antioncogenico di proteine regolatrici delle chinasi ciclina-dipendenti, quali p53, p21 o p16, ha suggerito l'ipotesi che una deregolazione dell'apparato di proteine coinvolte nel ciclo cellulare abbia un impatto enorme sull'integrità della segregazione cromosomica e possa giocare un ruolo diretto o indiretto nella trasformazione cellulare (37, 38). In molti casi, tali proteine risultano essere protein-chinasi implicate nelle varie fasi della divisione mitotica, il cui svolgimento è strettamente regolato da un equilibrio di reazioni di fosforilazione e defosforilazione.

In particolare, numerose evidenze sperimentali mostrano come alterazioni dell'espressione delle chinasi Aurora siano associate alla progressione tumorale. I geni codificanti le tre chinasi mappano in regioni che risultano affette da anomalie cromosomiche in diversi tipi di cancro e la sovraespressione di ciascuno di essi è stata individuata in linee cellulari tumorali (18, 39).

### **2.3.2. Aurora-A nei tumori**

La chinasi Aurora-A fu inizialmente chiamata BTAK (Breast Tumor Activated Kinase) perché identificata come una proteina iperespressa nel carcinoma mammario, laddove il suo aumento di espressione costituiva un indicatore di prognosi sfavorevole (17). In seguito, numerosi studi hanno riportato l'iperespressione di Aurora-A in diversi tipi di tumori umani, associata a difetti nella mitosi e aneuploidia. AURKA, il gene codificante per l'Aurora-A, è localizzato sulla regione cromosomica 20q13.2-13.3 che risulta amplificata in diversi tipi di neoplasie, come il cancro della mammella (94%), del colon (50%), dello stomaco, della vescica e dell'ovaio. Esperimenti effettuati sia in vitro che in vivo hanno mostrato che un eccesso di Aurora-A nella cellula determina amplificazione centrosomica indipendentemente dalla sua funzionalità, mentre la trasformazione tumorale del fenotipo richiede la presenza dell'attività chinasica (19, 22, 26). Tuttavia, l'esatto meccanismo con cui l'iperespressione di Aurora-A provoca una divisione irregolare non è ancora noto.

Recentemente è stato evidenziato che l'attività della proteina BRCA1 (BRCA1), soppressore tumorale specifico del carcinoma mammario ed ovarico, è regolata da Aurora-A tramite fosforilazione. BRCA1 è una ubiquitino-ligasi presente nei centrosomi, implicata nel controllo numerico degli stessi e nella regolazione della nucleazione dei microtubuli. L'inibizione della funzione centrosomica richiede l'attività ubiquitino-ligasica di BRCA1, in quanto mutazioni geniche che compromettono tale funzione danno origine a un fenotipo

dominante negativo di amplificazione e iperattività dei centrosomi. BRCA1 localizza sui centrosomi in tutte le fasi del ciclo cellulare, durante cui la sua attività è regolata mediante fosforilazione/defosforilazione; è stato dimostrato che l'Aurora-A modula l'inibizione della funzione centrosomica da parte di BRCA1 fosforilando la proteina sulla Ser308 e riducendone l'attività ligasica, mentre invece la sua defosforilazione ad opera di PP1a (Protein Phosphatase 1 ) produce l'effetto contrario. Pertanto, un eccesso di Aurora-A potrebbe portare alla replicazione incontrollata dei centrosomi e ad anomalie della nucleazione dei microtubuli in conseguenza dell'inibizione di BRCA1, compromettendo l'integrità del fuso mitotico.

Inoltre, l'Aurora-A è in grado di interferire con il check-point di arresto della mitosi "p53-Rb-dipendente" (17, 22). In cellule normali, difetti del fuso attivano il check-point mitotico che determina l'arresto del ciclo cellulare in metafase; tuttavia, cellule che iperesprimono l'Aurora-A superano tale check-point e vanno incontro a una mitosi abortiva. Se in queste cellule, divenute tetraploidi, il sistema p53-Rb è intatto, successivamente si innesca il check-point post-mitotico che le indirizza all'apoptosi o alla senescenza. In caso contrario le cellule tetraploidi tendono ad avere amplificazione centrosomica che a sua volta genera squilibri nell'assetto cromosomico. Il check-point indotto in G2 dal danno al DNA è anch'esso inattivo in cellule iperesprimenti l'Aurora-A e contribuisce ulteriormente all'instabilità genomica.

Un recente studio in vitro ha dimostrato che la sola iperespressione di Aurora-A non è sufficiente a provocare la formazione di colonie tumorali, per la quale è altresì necessario un blocco concomitante della funzione di p53 (26, 15). Analogamente, studi condotti in vivo su topi transgenici caratterizzati dall'iperespressione di Aurora-A nelle cellule mammarie hanno evidenziato la formazione di cellule tetraploidi a livello dell'epitelio mammario, ma

non lo sviluppo di tumori. Il modello animale dimostra quindi chiaramente come sia necessario un ulteriore effetto oncogenico in aggiunta all'iperespressione di Aurora-A (22).

L'interazione tra p53 e Aurora-A è stata oggetto di svariati studi. La p53 è in grado di sopprimere l'amplificazione centrosomica e la trasformazione tumorale indotte da Aurora-A; d'altro canto, quest'ultima inibisce la p53 mediante fosforilazione e ne promuove la degradazione. Sono stati identificati due siti di fosforilazione per Aurora-A in p53 che producono effetti distinti: la fosforilazione della Ser215 determina l'abrogazione del legame al DNA e della funzione transattivante di p53, mentre la fosforilazione della Ser315 aumenta l'affinità di p53 per la proteina Mdm2 (transformed Mouse 3T3 cell Double Minute 2), una ubiquitino-ligasi nucleare che lega p53, la inibisce funzionalmente e ne promuove la degradazione (40).

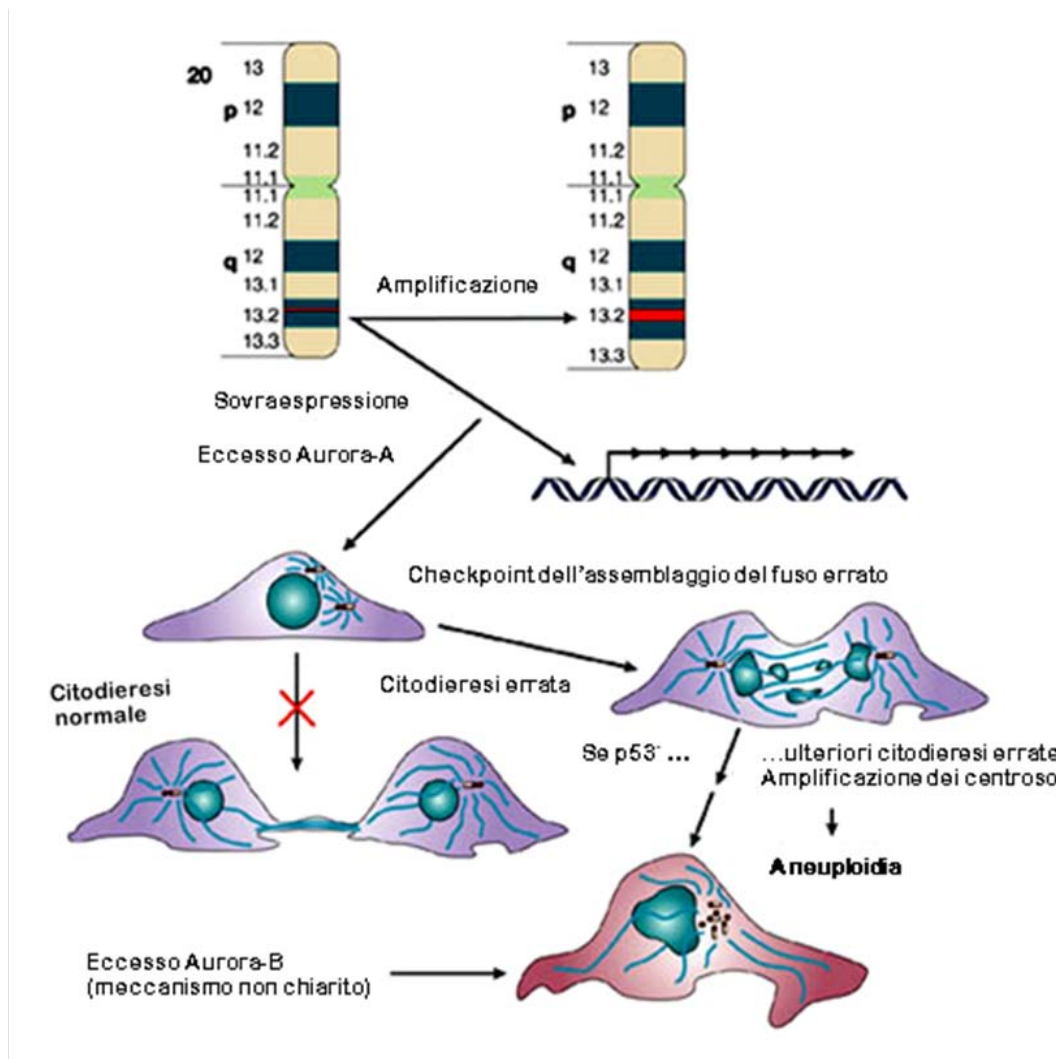
Nelle cellule che mancano di p53 funzionale, le anomalie mitotiche causate dall'Aurora-A sono esacerbate in quanto p53, pur legandosi al dominio catalitico dell'Aurora-A, non può più bloccare l'attività chinasi (12, 30, 41). È stato infatti osservato che l'accumulo di copie extra di centrosomi è fortemente amplificato in cellule p53<sup>-/-</sup> (26).

A parte il processo mitotico, l'Aurora-A partecipa alla cascata di segnale delle protein-chinasi Ras/Raf/MEK/ERK/MAP, induce l'attività delle telomerasi ed incrementa la migrazione cellulare indotta dal collagene-I. Pertanto, l'espressione di forme mutate di Aurora-A e l'inappropriata fosforilazione dei substrati costituiscono altre modalità potenziali con cui l'Aurora-A potrebbe favorire la trasformazione tumorale (42).

Oltre all'amplificazione genica, un polimorfismo T/A risultante nella sostituzione della fenilalanina 31 con isoleucina (F31/I), è stato osservato nel gene dell'Aurora-A e risulta associato al grado di aneuploidia del tumore del colon umano. Il polimorfismo F31/I è anche presente nel carcinoma a cellule squamose dell'esofago, in cui si correla ad un aumento del

grado di aneuploidia (22). Tuttavia, nel cancro della mammella, la presenza di tale mutazione ha un ruolo attualmente ancora incerto (43, 44).

Nel complesso, tutte queste evidenze confermano che l'Aurora-A svolge un ruolo fondamentale nella progressione tumorale.



**Figura 15.** Effetti dell'iperpressione di Aurora-A e -B sul corretto svolgimento del ciclo cellulare

### **2.3.3. Aurora-B nei tumori**

L'Aurora-B è anch'essa associata alla progressione tumorale. Contrariamente al gene AURKA, il gene AURKB localizza in una regione (17p13.1) non frequentemente amplificata nei tumori umani; ciononostante, elevati livelli dell'mRNA di Aurora-B sono stati identificati in almeno 25 linee cellulari trasformate derivanti da tumori diversi (19). Inoltre, sia l'mRNA che la proteina Aurora-B risultano iperespressi in molti tipi di cancro rispetto alle controparti normali, ed i livelli di espressione spesso correlano con il grado di malignità e la prognosi tumorale.

Uno studio condotto sul cancro del colon-retto ha rilevato un aumento di espressione dell'Aurora-B parallelamente ad un'iperfosforilazione dell'istone H3, con conseguenti difetti nella segregazione cromosomica e nella citocinesi. A tale proposito, gli Autori hanno proposto un possibile meccanismo di azione: studi precedenti avevano evidenziato che la metilazione della Lys9 dell'istone H3 da parte della metiltransferasi SUV39H1, specifica per tale residuo, è sensibilmente ridotta dalla pre-fosforilazione della Ser10 da parte di Aurora-B. La metilazione della Lys9 è implicata nel reclutamento della proteina eterocromatinica di tipo I (HP1), la quale si associa con i centromeri dove, interagendo con INCENP, favorisce la migrazione dei cromosomi verso la regione centrale del fuso durante l'anafase. L'iperespressione di Aurora-B, congiuntamente all'iperfosforilazione dell'istone H3 nella Ser10, comporterebbe una sostanziale riduzione di tale meccanismo, con conseguente alterazione della segregazione cromosomica e della citocinesi (15, 39).

Benché il gene AURKB non sia considerato un oncogene secondo i criteri standard, l'espressione esogena di Aurora-B in cellule embrionali di criceto cinese (CHE) deficitarie di p53 genera difetti nella segregazione cromosomica e conferisce alle cellule la capacità di formare metastasi in vivo (45).

Ciò suggerisce che l'iperespressione di Aurora-B possa essere un evento secondario che si manifesta nelle cellule tumorali difettive di p53, incrementandone la malignità.

In generale, la sovraespressione di questa serin-treonin-chinasi è stata collegata a condizioni di alta instabilità genomica, tipica della progressione tumorale: tale evidenza suggerisce l'ipotesi che l'Aurora-B contribuisca all'acquisizione, da parte della cellula, di gravi alterazioni critiche nella progressione tumorale (16).

#### **2.3.4. Aurora-C nei tumori**

Il gene di Aurora-C mappa in una regione cromosomica (19q13.43) che spesso risulta traslocata o assente nei tessuti cancerosi (46). Al contrario, un aumento dell'espressione di Aurora-C è stato osservato solo in un ristretto numero di cellule cancerose, in particolare derivanti dal tumore del testicolo, e nel tumore del colon-retto (32). Esperimenti di immunofluorescenza indiretta hanno suggerito che l'Aurora-C partecipi alla regolazione delle funzioni del centrosoma, sebbene il suo ruolo specifico, non associato con le chinasi Aurora-A e -B, non sia ancora noto (15, 33).

#### **2.4 Le chinasi Aurora nei tumori della tiroide**

Ad oggi, le conoscenze in merito all'espressione delle chinasi Aurora nei tumori della tiroide sono ancora molto scarse. Un lavoro eseguito su colture primarie di tireociti umani normali e linee cellulari di carcinomi tiroidei papilliferi, follicolari, scarsamente differenziati e anaplastici ha riferito un aumento dell'espressione di Aurora-B nelle cellule tumorali, e maggiormente nelle linee anaplastiche, rispetto ai tireociti normali (39). Gli Autori hanno inoltre dimostrato che l'inibizione di tale chinasi mediante "RNA interference" determinava

una sensibile diminuzione della proliferazione delle cellule anaplastiche in vitro e una crescita più lenta del tumore prodotto dalle stesse cellule inoculate in topi immunodeficienti (39).

Nel complesso, le evidenze sperimentali suggeriscono un ruolo importante delle chinasi Aurora nella progressione del carcinoma della tiroide; tali proteine potrebbero quindi rappresentare un nuovo bersaglio terapeutico nel trattamento di questi tumori e in modo particolare degli istotipi indifferenziati, resistenti a tutti agenti chemioterapici attualmente in uso.



## CAPITOLO 3

### POSSIBILI APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DEGLI INIBITORI DELLE CHINASI

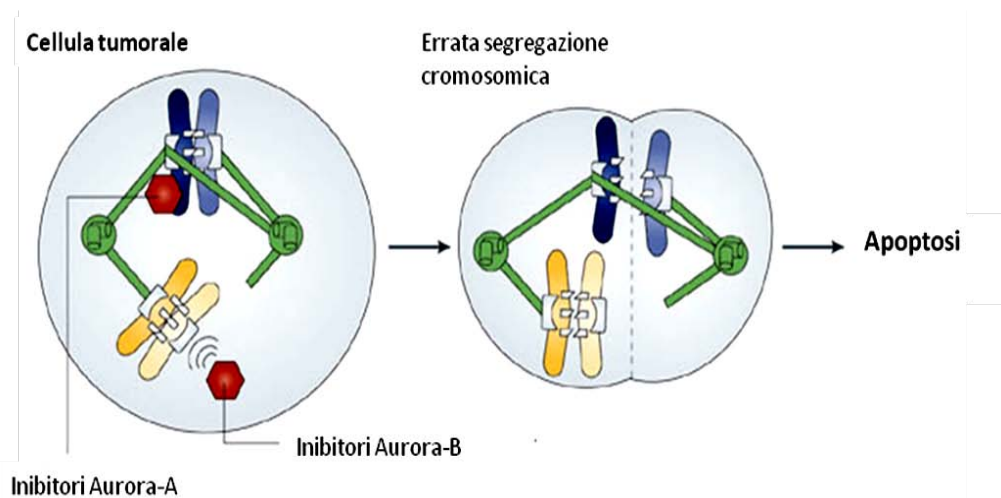
#### AURORA IN CAMPO ONCOLOGICO

Le terapie tradizionali contro il cancro si basano su agenti chimici o fisici, ovvero farmaci e radiazioni ionizzanti, la maggioranza dei quali sono mirati a produrre nelle cellule cancerose un danno al DNA o l'inibizione della sua replicazione. Conseguentemente, tali agenti risultano tossici non soltanto per le cellule tumorali, ma anche per quelle normali che vanno incontro a proliferazione. La tossicità sulle cellule cancerose è alquanto maggiore in virtù del ritmo proliferativo più rapido, tuttavia l'instabilità genetica della maggior parte delle popolazioni cellulari maligne può rendere l'eliminazione del cancro più difficile, poiché esse diventano progressivamente eterogenee e difficilmente sensibili ai trattamenti costituiti da farmaci singoli. Inoltre tale mutabilità permette a molti cancri di sviluppare rapidamente una resistenza alle sostanze terapeutiche in uso.

In considerazione del ruolo che svolge nel controllo della corretta segregazione cromosomica e della sua associazione con la progressione tumorale, la famiglia delle chinasi Aurora è attualmente considerata un potenziale bersaglio terapeutico.

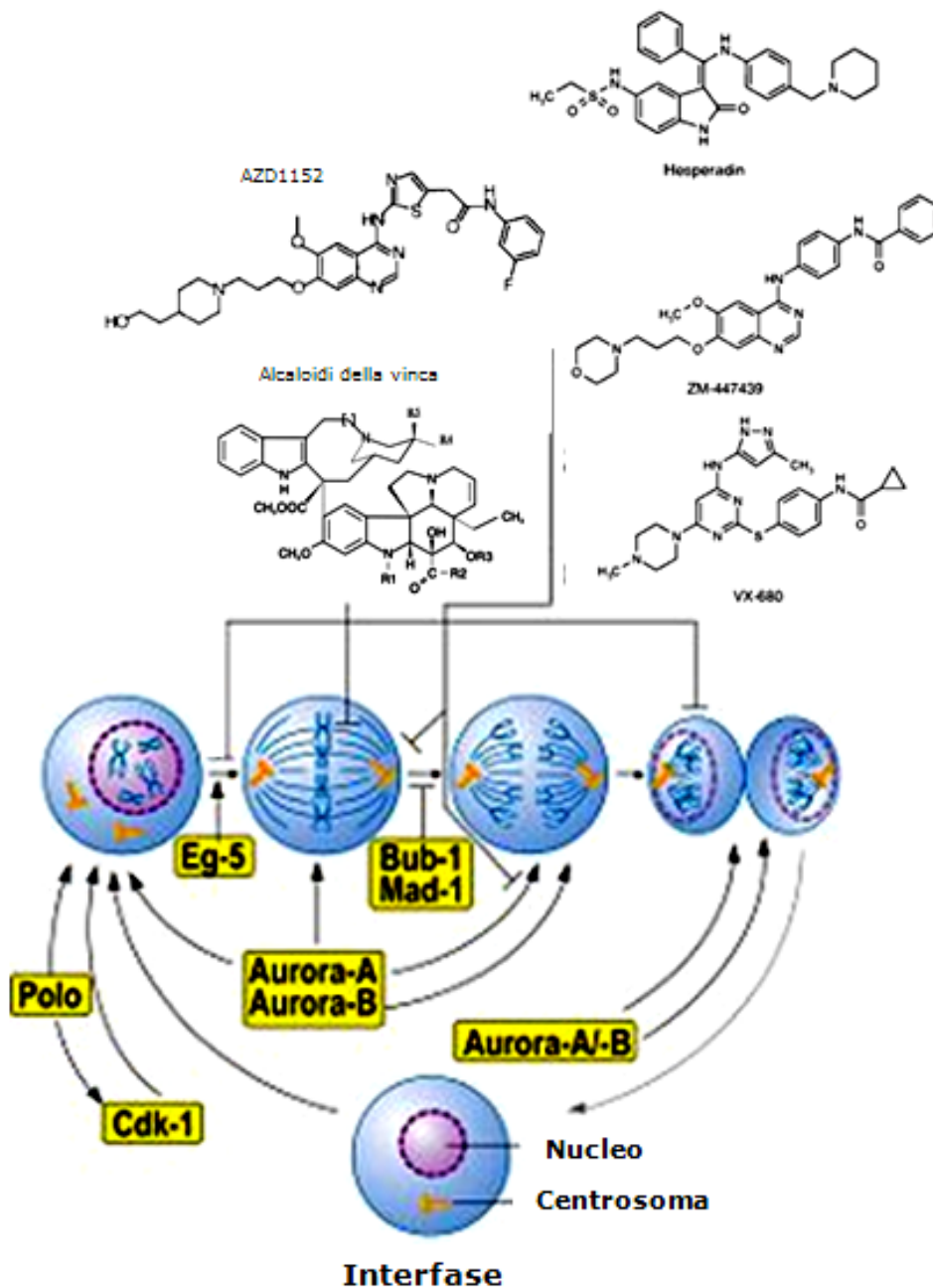
Negli ultimi anni sono stati identificati alcuni inibitori selettivi delle chinasi Aurora che potrebbero aprire un nuovo scenario nella terapia oncologica, specialmente contro quei tumori che non rispondono efficacemente agli agenti antimitotici attualmente in uso, tra cui il carcinoma tiroideo anaplastico (Figura 16).

Ad oggi, i principali inibitori utilizzati sono: VX-680, in grado di inibire tutte e tre le chinasi (47), ZM447439 attivo su Aurora-A e Aurora-B (48), MLN8054, inibitore selettivo di Aurora-A, AZD1152 e l'esperadina che inibiscono selettivamente l'Aurora-B (16).



**Figura 16.** Effetti dell'inibizione delle chinasi Aurora

Sebbene solo l'Aurora-A sia considerata una vera oncoproteina, anche l'inibizione di Aurora-B sembra indurre un effetto analogo di regressione tumorale. Gli inibitori delle chinasi Aurora ZM447439, AZD1152, esperadina e VX-680 causano tutti l'inibizione della fosforilazione dell'istone H3 e il blocco della divisione cellulare. Gli effetti di un'esposizione prolungata dipendono dalle singole linee cellulari, alcune delle quali mostrano una poliploidia massiva, altre si arrestano in fase pseudo-G1 ed altre ancora vanno incontro ad apoptosi (27).



**Figura 17.** Principali farmaci inibitori delle chinasi Aurora e rispettivi campi d'azione

Studi effettuati con l'inibitore ZM447439 su cellule somatiche in coltura (16, 18) hanno evidenziato che il farmaco non impedisce l'entrata delle cellule in mitosi; tuttavia, esso determina la disorganizzazione del fuso, la morfologia aberrante e il non corretto allineamento dei cromosomi, ed il blocco del processo di citocinesi. Inoltre, malgrado la

presenza di cromosomi non allineati, sono state riscontrate la perdita di coesione dei cromatidi fratelli e la degradazione della ciclina B, indicativa dell'inizio dell'anafase, a dimostrazione del fatto che ZM447439 è in grado di compromettere il check-point mitotico.

## **SCOPO DELLA TESI**

Le chinasi della famiglia Aurora svolgono un ruolo essenziale nella maturazione dei centrosomi, nell'assemblaggio del fuso mitotico, nella segregazione dei cromosomi e nella divisione cellulare. Si tratta di importanti proteine mitotiche la cui disregolazione è responsabile di instabilità genomica, un aspetto fondamentale della tumorigenesi.

Numerose evidenze sperimentali hanno mostrato come alterazione dell'espressione delle chinasi Aurora siano associate alla progressione di diversi tipi di tumori umani; tuttavia, allo stato attuale, le informazioni riguardo la loro espressione nei tumori della tiroide sono molto scarse.

Pertanto l'obiettivo della ricerca è l'indagine dell'espressione e della localizzazione subcellulare delle tre chinasi Aurora nei carcinomi differenziati della tiroide attraverso lo studio di linee cellulari derivanti da tireociti normali (HTU5), adenoma follicolare (HTU42), carcinomi differenziati della tiroide di istotipo follicolare (FTC-133) e papillare (B-CPAP), e carcinoma anaplastico (8305C). Successivamente, lo studio dell'espressione di tali enzimi è stato esteso ai tessuti tiroidei normali e derivanti da carcinomi papillari ottenuti in seguito a tiroidectomia.

## MATERIALI E METODI

### *Linee cellulari e materiali*

Le linee cellulari B-CPAP (44) e 8305C (45) provengono da German Collection of Microorganism and cell cultures (DMSZ, Germania) mentre le FTC-133 (46) dalla Interlab Cell Line Collection (ICLC, Italia).

I terreni di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), RPMI 1640 e HAM'S F-12, il siero bovino fetale (FBS), la tripsina, l'EDTA, la L-glutamina, la penicillina/streptomina sono stati acquistati dalla EuroClone (paignton-Devon, UK). RNAzol<sup>TM</sup> Bee è stato fornito dalla Biotech Italia (Roma, Italia). L'oligo(dT)<sub>12-18</sub> primer, i dNTP e la M-MLV Reverse Transcriptase sono state acquistate dalla Invitrogen (Carlsbad, CA). La HotMaster<sup>TM</sup> Taq DNA polimerasi e il Perfectprep<sup>®</sup> Gel Cleanup Kit sono stati ottenuti dalla Eppendorf (Amburgo, Germania). Tutti i primers provengono dalla Eurogentec (Seraing, Belgio) e il 100 bp DNA ladder dal New England BioLabs (Beverly, MA). Il deossicolato sodico, l'aprotinina, la leupeptina, 4-(2-amminoetil) benzen-sulfonil fluoruro cloridrato (AEBSF), l'ortovanadato di sodio, il pirofosfato di sodio e l'anticorpo anti-actina umana provengono dalla Sigma Chemical Co.(St Louis, MO). Il Nonidet P-40 viene dalla Calbiochem (La Jolla, CA). La soluzione Bradford e i reagenti per l'elettroforesi sono stati ottenuti dai Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Gli anticorpi monoclonali anti-Aurora-A sono stati prodotti nel nostro laboratorio. Gli anticorpi policlonali contro Aurora-B e Aurora-C sono stati ottenuti rispettivamente da Abcam (Cambridge, UK) e Abgent (San Diego, CA).

Gli anticorpi secondari coniugati alla perossidasi di rafano sono stati ottenuti da Jackson Immuno-Research laboratories (Baltimore, MD).

### *Colture cellulari e tessuti tiroidei umani*

Le linee cellulari 8305C e B-CPAP sono state coltivate in terreno di coltura RPMI 1640 al 5% di siero fetale bovino (FBS), mentre la linea FTC-133 in DMEM miscelato ad HAM'S/F-12 in rapporto 1:1, supplementato con 5% FBS e 2mM L-glutamina. A tutti i terreni sono stati aggiunti 100 U/L penicillina, 100 µ/ml di streptomina. Le linee cellulari derivanti da tireociti normali umani (HTU5) e da adenoma follicolare (HTU42) sono state cresciute come descritto in precedenza (49, 50). Tutte le cellule sono state mantenute in coltura a 37<sup>0</sup>C e 5% CO<sub>2</sub> in atmosfera umidificata, espanse fino al 70-80% di confluenza e quindi impiegate negli esperimenti come descritto in seguito. Per studiare gli effetti che il siero ha sulla proliferazione dei tireociti normali e sull'espressione delle Aurora chinasi le cellule sono state coltivate per quattro giorni in presenza di FBS al 5% o FBS al 0,3%. Successivamente, le stesse cellule sono state trattate per ventiquattro ore in terreno di coltura contenente FBS al 5%. Le cellule sono state quindi utilizzate per l'analisi al FACS, per preparare RNA totale e per estrarre proteine cellulari.

Frammenti di tessuto tiroideo umano normale e tumorale sono stati prelevati da pezzi chirurgici ottenuti da 7 pazienti di sesso femminile, di età compresa tra 36 e 76 anni, affette dalla variante classica di carcinomi papilliferi. I campioni di tessuto sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80<sup>0</sup>C.

### *Isolamento e analisi dell'm-RNA*

L'RNA totale è stato estratto dalle differenti linee cellulari attraverso il metodo del guanidinio tiocianato-fenol-cloroformio di Chomczynsky e Sacchi (51). Lo stesso protocollo è stato anche utilizzato per estrarre RNA totale da tessuti tiroidei umani normali e tumorali, dopo omogeneizzazione dei campioni con Ultra-Turrax in guanidinio tiocianato per 30". Cinque µg di RNA totale sono stati retrotrascritti utilizzando oligo(dT)<sub>12-18</sub> primers

e M-MLV trascrittasi inversa. Il cDNAs è stato utilizzato come template per la successiva amplificazione in *real time* PCR (qPCR) delle chinasi Aurora-A, -B e -C e della  $\beta_2$ -microglobulina come controllo interno.

Nel presente studio è stato utilizzato il termociclatore LightCycler (Roche Applied Science), munito di una camera di reazione che amplifica il template all'interno di tubi capillari. I campioni sono stati allestiti con il LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I Kit (Roche Applied Science). Ciascuna miscela di reazione prevedeva un volume finale di 20  $\mu$ l con la seguente composizione: una "master mix" contenente FastStart Taq DNA Polymerase, SYBR Green I, dNTP mix (con dUTP anziché dTTP) e  $MgCl_2$ , specifici primers 0,5  $\mu$ M (Tab.4), ~ 12,5 ng di cDNA ed acqua priva di DNA-asi. Il programma di PCR del LightCycler è stato impostato in tre fasi sequenziali: denaturazione preliminare del template a 95<sup>0</sup>C per 10', 40 cicli di amplificazione (denaturazione a 95<sup>0</sup>C per 10'', appaiamento delle sequenze alle temperature ottimali per ciascuna coppia di primers per 10'' ed estensione a 72<sup>0</sup>C per 25'') e creazione delle curve di melting (denaturazione a 95<sup>0</sup>C per 0'', appaiamento delle sequenze a 65<sup>0</sup>C per 15'' e denaturazione lenta [0,1<sup>0</sup>C/sec] fino a 95<sup>0</sup>C. Il SYBR Green I è un fluoruro che si lega specificamente al DNA duplex durante la fase di appaiamento e tale interazione provoca un incremento della sua fluorescenza intrinseca che viene misurato nella fase di estensione. Nei primi 10-15 cicli la macchina rileva generalmente un segnale di fondo, mentre nei successivi compare un segnale di emissione che aumenta in modo direttamente proporzionale alla quantità delle doppie eliche amplificate. Il primo incremento significativo della fluorescenza viene definito *crossing point* ( $C_T$ ) e rappresenta il valore di riferimento per la quantificazione del campione. Per tutti i geni sono state prodotte delle curve standard utilizzando diluizioni seriali di un campione di riferimento esprimente tutti i cDNA in esame, e i valori ottenuti per ciascun amplificato sono stati normalizzati rispetto a quelli della  $\beta_2$ -microglobulina, mediante il



Relative Quantification Software (Roche Applied Science). La specificità delle sequenze ottenute è stata verificata inizialmente con la determinazione delle curve di denaturazione e l'osservazione degli amplificati su gel di agarosio al 2% contenente bromuro di etidio, quindi i cDNA sono stati eluiti dal gel, purificati con un Perfectprep® Gel Cleanup Kit (Eppendorf) e sottoposti al sequenziamento in presenza di nucleotidi marcati con fluoresceina tramite l'ABI Prism 377™ DNA sequenze (Perkin Elmer); infine, le sequenze così ottenute sono state confrontate con quelle attese.

Gene	Primers	Esone	Dim. (bp)	$T_{ann}$
Aurora-A	Forward 5'-CTGCATTTTCAGGACCTGTTAAGG-3'	1	150	60°C
	Reverse 5'-AACGCGCTGGGAAGAATTT-3'	2		
Aurora-B	Forward 5'-CGACATCTTAACGCGCGGCAC-3'	3-4	50	60°C
	Reverse 5'-GGACGCCCAATCTCAAAGTC-3'	4		
Aurora-C	Forward 5'-TATAACTATTTCCATGATGATGCACGC-3'	4	167	60°C
	Reverse 5'-ACTTTCTTGTCATGGCAGTAGGTC-3'	5		
$\beta_2$ -microglobulina	Forward 5'-TGACTTTGTACAGCCCAAGATA-3'	3	75	60°C
	Reverse 5'-CGGCATCTTCAAACCTCCA-3'	3-4		

**Tabella 2.** Sequenze dei primers, posizione all'interno degli esoni, dimensioni degli amplificati e temperature di appaiamento utilizzati nelle reazioni di qPCR per i geni della famiglia delle chinasi Aurora e della  $\beta_2$ -microglobulina

#### WESTERN BLOT

La prima fase dell'estrazione delle proteine da tessuto è consistita nell'omogeneizzazione in ghiaccio con l'Ultra-Turrax del campione chirurgico in un tampone di lisi (Tris-HCL pH 7.5 50mM, EDTA 2mM, SDS 0,25%, NaCl 50mM, Nonidet P40), con l'aggiunta di inibitori

delle proteasi (PMSF 1mM, Aprotinina 1µg/ml, Pepstatina 1µg/ml, Leupeptina 1µg/ml, NaVO<sub>4</sub> 10mM, NaF 10mM). In seguito i campioni sono stati sonicati in ghiaccio, quindi centrifugati per 15' a +4<sup>0</sup>C a 15000 g e il supernatante è stato trasferito in nuovi tubi. Per estrarre le proteine da colture cellulari le cellule sono state dapprima staccate dalla fiasca con EDTA 0,02% e tripsina 0,05%, centrifugate a 1200 rpm per 5', lavate in PBS e nuovamente centrifugate. Il pellet è stato quindi risospeso nel tampone di lisi (vedi sopra), con l'aggiunta di inibitori delle proteasi. Si è quindi proceduto all'estrazione utilizzando il procedimento precedentemente descritto.

La quantità di proteine presente nei lisati cellulari o tissutali è stata determinata mediante il metodo Bradford (52). Tale metodo si basa sulle proprietà del Comassie Brilliant Blue di reagire in ambiente acido con le proteine, virando da un colore bruno ad un blu la cui intensità è proporzionale alla quantità di proteine presenti ed è determinabile spettrofotometricamente leggendo l'assorbanza  $\lambda = 595$  nm. La concentrazione proteica totale di ogni campione è stata valutata per interpolazione dei valori di assorbanza ottenuti su una retta di riferimento costruita con quantità note di una soluzione stock di BSA 1 mg/ml (albumina di siero bovino).

Aliquote di 50 µg di estratti cellulari o tissutali sono state miscelate al tampone di corsa Laemmli 5x (Tris-HCl 120 mM pH 6.8, SDS 2%, Glicerolo 10%, Blu di bromo fenolo 0,01%) contenente 5% di β-mercaptoetanololo, scaldate a 95<sup>0</sup>C per 5', e sottoposte ad elettroforesi su un gel di poliacrilamide 12,5%. In seguito le proteine sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa mediante l'apparato Biorad Mini TransBlot Cell; quindi le membrane sono state lavate con TBS-T (50 mM Tris\_HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) e saturate con latte non grasso al 5% in TBS-T per 2 ore a temperatura ambiente. Poi le membrane sono state lavate tre volte con una soluzione TBS-T e latte non grasso al 2.5% e incubate per una notte a +4<sup>0</sup>C nella stessa soluzione con aggiunta degli anticorpi

anti-actina, anti-Aurora-A, -B e -C nelle rispettive diluizioni 1:1000, 1:250, 1:500, 1:200.

Successivamente, le membrane sono state lavate tre volte in TBS-T con latte non grasso al 2,5% per rimuovere l'anticorpo non legato ed incubate per due ore nella stessa soluzione con anticorpi secondari coniugati alla perossidasi di rafano (1:1000).

Dopo ripetuti lavaggi, le bande immunoreattive sono state rilevate tramite chemiluminescenza con il Super Signal kit (Pierce, Rockford,IL). La proteina Aurora-C ricombinante è stata prodotta tramite il plasmide BL21 (DE3)-pLysS dopo il clonaggio del DNA codificante Aurora-C nel vettore pET29 (Norvegen). In seguito le proteine ricombinanti sono state purificate attraverso cromatografia ad affinità Ni-NTA-agarosio.

### *Immunofluorescenza*

Le diverse linee cellulari sono state coltivate su vetrini, fissate con metanolo freddo, risciacquate due volte in PBS ed immerse per tre minuti in PBS con Triton-X100 0,1% a temperatura ambiente. I vetrini sono stati incubati in PBS con 3% BSA per 2 ore e poi lavati tre volte con PBS. I vetrini sono stati incubati per 1 ora con i diversi anticorpi anti-Aurora-A (1:500), Aurora-B (1:300) e Aurora-C (1:400). Dopo essere stati lavati due volte con PBS, i vetrini sono stati incubati con anticorpi anti-mouse coniugato al FITC (fluorescein isothiocyanate) (1:200) o anti-rabbit coniugato al TRITC (etramethyl Rhodamine Isothiocyanate) (1:200) per un'ora a temperatura ambiente, quindi lavati con PBS. Infine, i vetrini sono stati montati con Vectashied contenente 1µg/ml DAPI. Tutti i vetrini sono stati osservati con un microscopio leica-DMRXA (IFR 140 GFAS-Rennes).

### *Analisi del ciclo cellulare*

Le cellule in coltura sono state marcate con bromo-deossiridina (BrdU) 30 mM a 37<sup>0</sup>C per 2 h, sono state quindi raccolte, fissate con etanolo freddo 70% e colorate con anticorpo anti-

BrdU FITC-coniugato e ioduro di propidio. Tutti i campioni sono stati analizzati per il loro contenuto in BrdU utilizzando il citometro EPICS Elike Flow (Coultronics, Hialeah, FL) equipaggiato di un laser ad argon (488nm). L'analisi dei dati è stata effettuata mediante il Multicycle software (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA).

#### *Analisi statistiche*

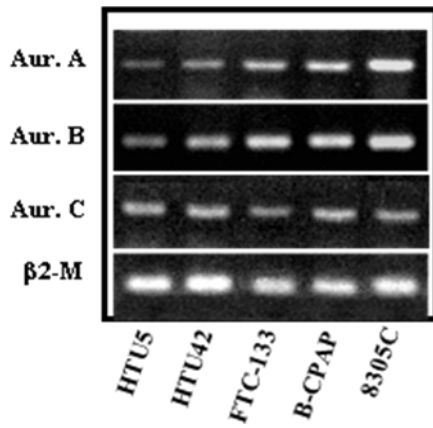
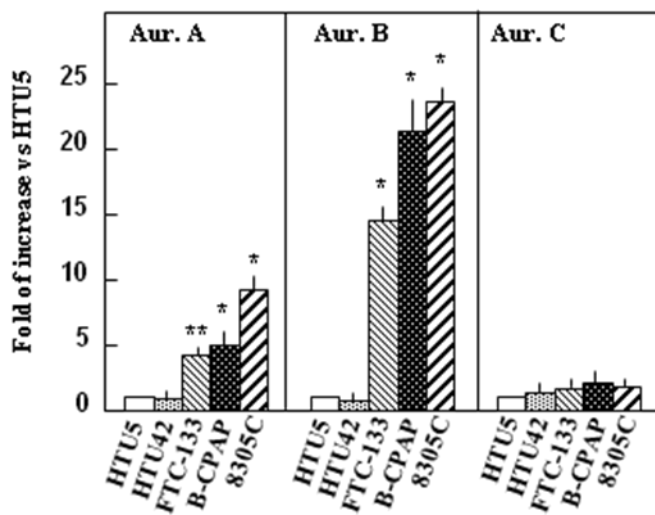
Tutti i risultati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard di almeno tre esperimenti indipendenti; I valori sono stati comparati statisticamente mediante il test *t di Student* o il *test di Wilcoxon* e considerati significativamente differenti qualora la probabilità di uguaglianza risultasse inferiore a 0,05 (53).

## RISULTATI

### *Espressione delle chinasi Aurora nei tireociti umani normali e trasformati*

In questo studio è stata analizzata l'espressione di tutti e tre i membri della famiglia delle Aurora chinasi in tireociti umani normali ed è stato analizzato se vi siano cambiamenti nella loro espressione che possano essere associati a fenomeni di trasformazione maligna. A questo scopo sono stati utilizzati come modello sperimentale una linea di tireociti umani normali (HTU5) e diverse linee cellulari tumorali derivanti da adenoma follicolare (HTU42), carcinoma follicolare (FTC-133), carcinoma papillifero (B-CPAP) e carcinoma anaplastico (8305C). L'analisi del ciclo cellulare è stata eseguita su tutte le linee cellulari ed è stata determinata la percentuale delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare.

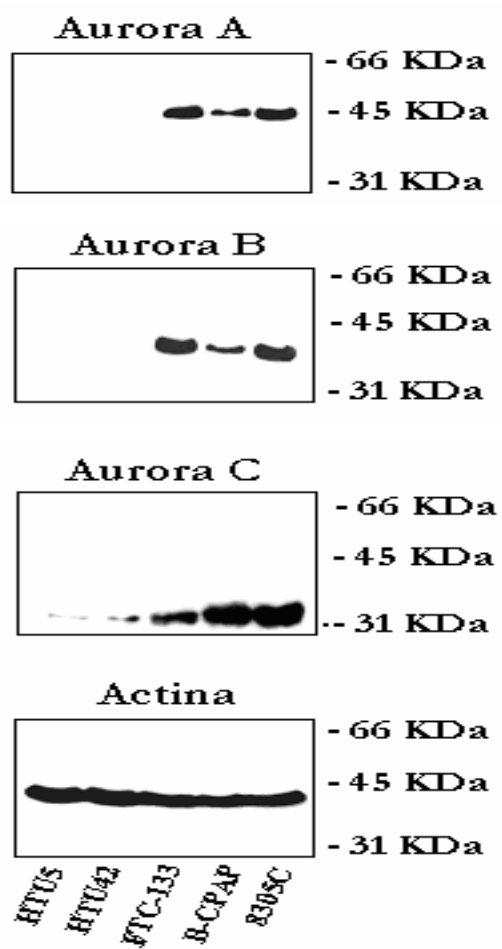
Inizialmente, su queste cellule è stata valutata l'espressione dell'm-RNA delle chinasi Aurora attraverso l'analisi di *real-time* RT-PCR. Come riportato in Figura 18 a e b, tutte e tre le chinasi risultano espresse nei tireociti normali; tale espressione non appare modificata nella linea di adenoma HTU42.

**A****B**

**Fig.18-A:** Analisi dell'espressione delle chinasi Aurora A, B e C mediante RT-PCR quantitativa in linee cellulari derivate da tireociti normali (HTU5), da un adenoma follicolare (HTU42) e da carcinoma papillifero (B-CPAP), follicolare (FTC-133) e anaplastico (8305C). **-B:** Analisi quantitativa tramite real time PCR dei livelli di mRNA per le chinasi Aurora A, B e C nelle diverse linee cellulari. Le variazioni di mRNA sono state calcolate considerando uguale a 1 il rapporto Aurora/ $\beta$ 2-microglobulina ottenuto per i tireociti umani.

Un aumento dei livelli di mRNA delle Aurora-A e -B, rispettivamente di oltre 3 e 10 volte, stato riscontrato in tutte le linee cellulari derivanti dai carcinomi ovvero FTC-133, B-CPAP e 8305C; l'm-RNA dell'Aurora-C non presenta invece variazioni significative in alcuna linea tumorale, rispetto ai tireociti normali (Figura 18B).

L'analisi di western blot mostra chiaramente che in tutti i carcinomi, ma non nella linea tumorale benigna, si ha un aumento statisticamente significativo ( $p < 0,01$ ) dei livelli di proteine di tutte e tre le chinasi; le proteine Aurora-A e -B risultano assenti o appena individuabili sia nei tireociti normali che in quelli derivanti da adenoma follicolare, notevolmente indotte nelle linee cellulari FTC-133 e 8305C e meno nella linea B-CPAP. L'aurora-C è presente nei tireociti normali e risulta aumentata di  $17.45 \pm 1.6$  volte nelle FTC-133, di  $32.27 \pm 2.1$  volte nelle B-CPAP e di  $31.45 \pm 2.7$  volte nelle 8305C (Figura 19).



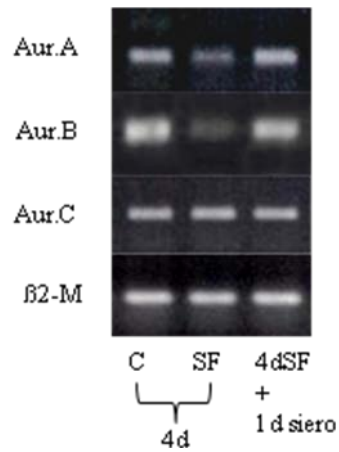
**Fig.19-** Western blot per le chinasi Aurora con proteine cellulari estratte dalle diverse linee cellulari tiroidee umane, normali e tumorali



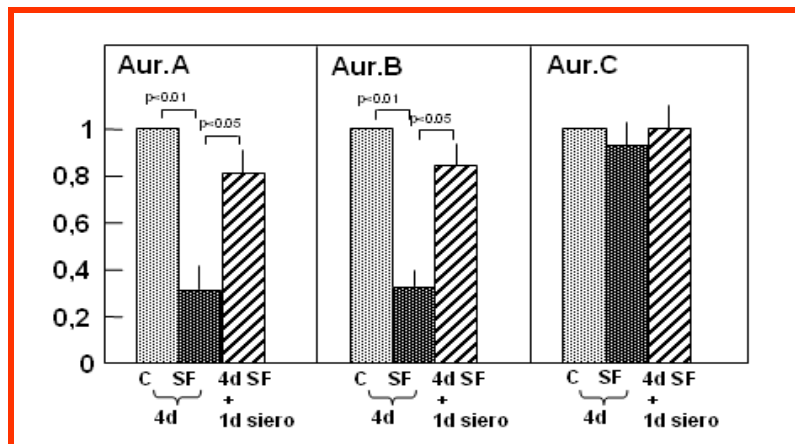
*Effetti del siero sulla proliferazione dei tireociti umani normali e sull'espressione delle chinasi Aurora*

Al fine di stimare se l'espressione delle chinasi Aurora sia regolata o meno dal ciclo cellulare, le cellule HTU5 sono state poste in coltura con una concentrazione di siero normale o ridotta (0,3%). Coltivando le cellule in terreno a bassa concentrazione di siero per 4 giorni, la quota di cellule in fase S+G2/M, indicativa della proliferazione cellulare, è stata ridotta del  $48,5 \pm 2,7\%$  all' $11,8 \pm 2,4\%$  ( $p < 0,01$ ). Le cellule sono quindi state esposte ad un terreno di coltura fresco contenente 5% di siero per 24 h; questo ha aumentato il numero di cellule proliferanti del  $36,3 \pm 6,9\%$  ( $p < 0,005$ ). L'espressione delle chinasi Aurora-A, -B e -C, sia a livello di proteina che di mRNA, è stata analizzata prima, durante e 24 ore dopo la deprivazione dal siero. La coltura in basso siero per 4 giorni induceva un decremento dei livelli di mRNA sia per l'Aurora-A (70%) che per l'Aurora-B (60%). Come previsto, l'aggiunta di siero al terreno di coltura riportava entrambi gli mRNA a livelli comparabili alle cellule di controllo; al contrario non sono stati osservati cambiamenti nell'mRNA dell'Aurora-C (Figura 20A e 20B).

A



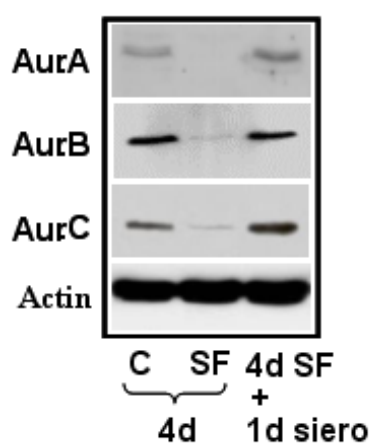
B



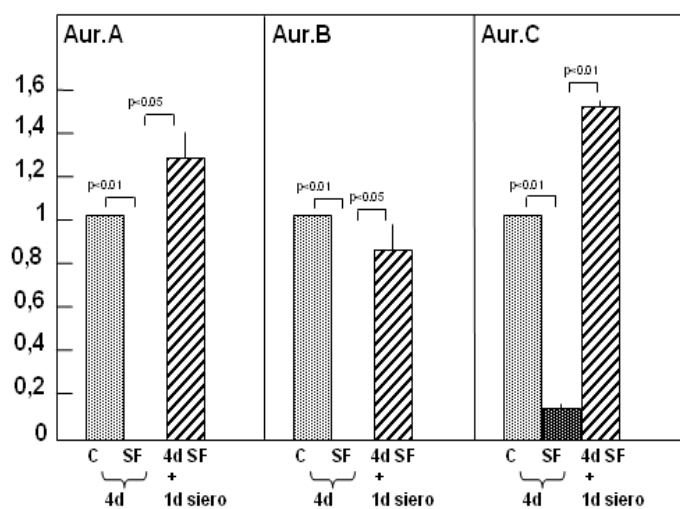
**Fig. 20- A** Effetto della deprivazione di siero sull'espressione delle chinasi aurora nei tireociti umani normali. Le cellule sono state coltivate per quattro giorni in 5% (4dC) o 0.3% (4dSF) di siero. Un'aliquota delle cellule coltivate in SF è stata trattata per ulteriori 24 ore in terreno al 5% di siero (4dSF+24h siero). RT-PCR quantitativa A) elettroforesi degli amplificati su gel d'agarosio; **-B** Real-time RT-PCR: gli incrementi degli mRNA sono stati calcolati considerando uguale a 1 il rapporto chinasi Aurora/ $\beta_2$ -microglobulina ottenuta per i tireociti 4dC.

L'analisi western blot ha dimostrato una concomitante diminuzione dei livelli di proteina sia per l'Aurora-A che per l'Aurora-B in seguito alla deprivazione di siero. Tuttavia anche il livello dell'Aurora-C segue un andamento analogo (Figura 21A e B). Analogamente a quanto osservato per l'mRNA, i livelli proteici delle tre chinasi erano ripristinati dall'aggiunta di terreno fresco contenente il 5% di FSB. Successivamente l'analisi del ciclo cellulare è stata eseguita su tutte le altre linee cellulari ed è stata determinata la percentuale delle cellule nelle diverse fasi del ciclo.

A



B

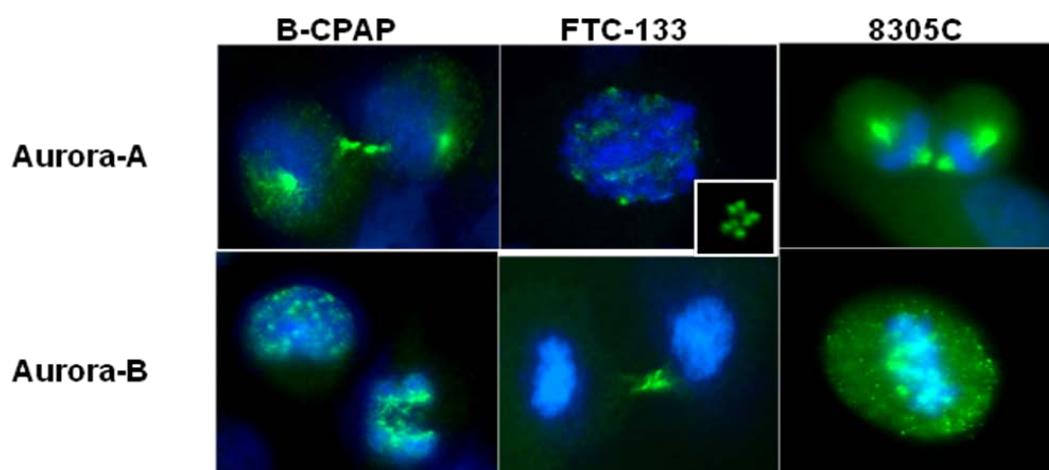


**Fig. 21-A** Western blot; **-B** Analisi densitometrica dei livelli di proteina relativi al western blot

*Localizzazione subcellulare delle chinasi Aurora nelle linee cellulari derivate dai carcinomi tiroidei*

Allo scopo di documentare l'espressione delle chinasi Aurora nei tireociti trasformati, ne è stata determinata la localizzazione subcellulare nelle tre linee derivanti da carcinoma utilizzando il microscopio ad immunofluorescenza indiretta. I risultati ottenuti dimostrano che l'Aurora-A è localizzata nell'area pericentrosomica, ai poli del fuso mitotico (Figura 22A) e nella regione centrale del fuso durante la citocinesi. Inoltre nelle FTC-1333, sono presenti amplificazioni centrosomi che nelle cellule sia interfasiche che mitotiche. L'Aurora-B risulta localizzata nei centromeri durante la metafase, nell'area mediana del fuso mitotico durante l'anafase e nel ponte citoplasmatico residuo durante la citocinesi (Figura 22B)

A



B

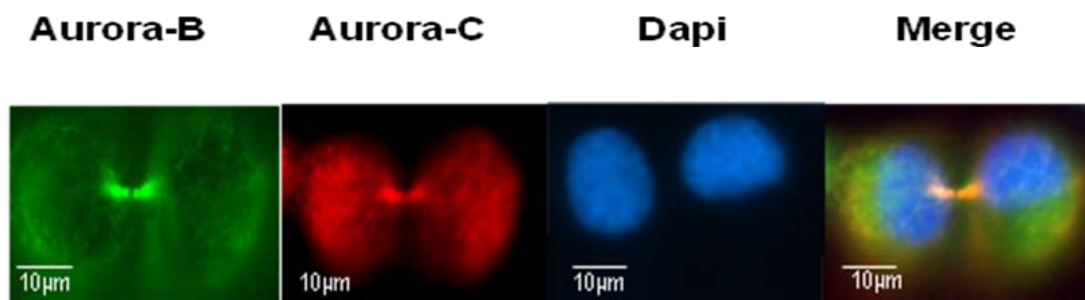


Fig. 22A e B.

*Espressione delle chinasi Aurora nei tessuti tiroidei normali e derivanti da carcinoma papillifero*

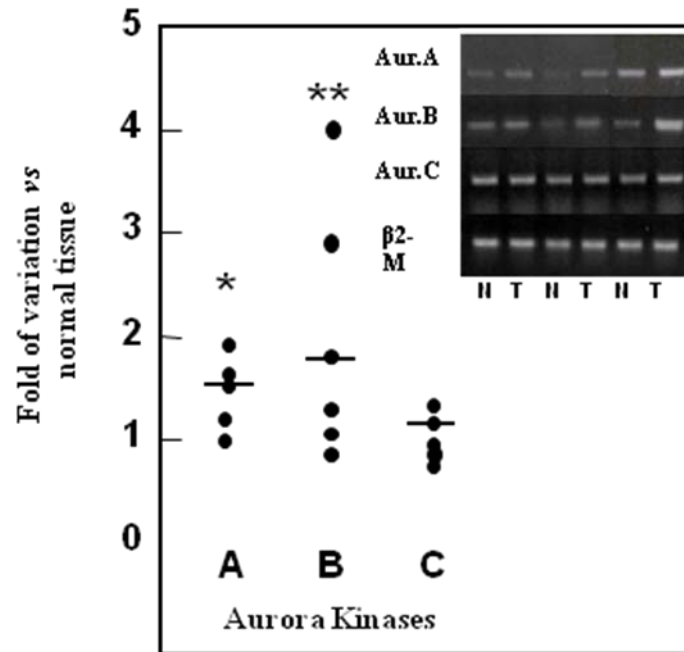
Infine, l'espressione delle chinasi Aurora è stata studiata in tessuti tiroidei umani normali e derivanti da carcinomi papilliferi (PTC). Come mostrato in Fig.23A, i livelli di mRNA delle chinasi Aurora-A risultano aumentati nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale in quattro campioni, nei quali il tasso di incremento è compreso tra 1,5 e 2 volte. In tre casi, invece, si riscontrano livelli di mRNA sostanzialmente invariati rispetto a quelli del tessuto normale. In media, l'mRNA dell'Aurora-A risulta aumentato di  $1.46 \pm 0.13$  volte ( $p < 0.01$ ).

Per quanto riguarda la chinasi Aurora-B nei tessuti tumorali, quattro campioni mostrano un incremento delle chinasi (Figura 23A), mentre rimangono simili rispetto ai valori osservati nel tessuto normale i livelli di mRNA di due campioni, e uno solo campione tumorale risulta avere una riduzione dell'mRNA di Aurora-B rispetto alla controparte normale. In media, l'mRNA dell'Aurora-B è aumentato di  $1.94 \pm 0.42$  ( $p < 0.05$ ).

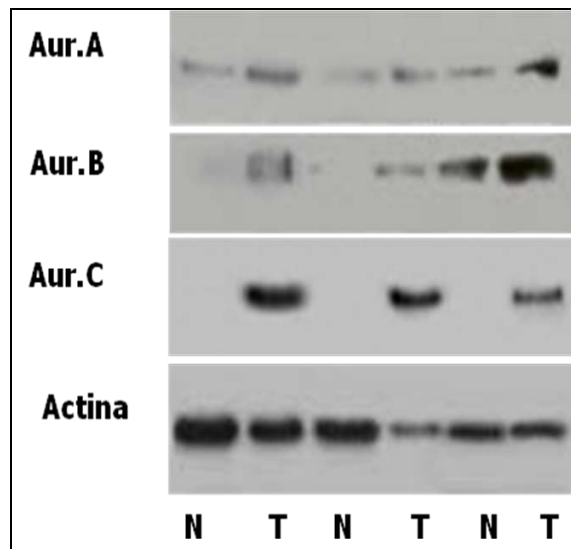
Non sono state evidenziate variazioni significative nell'espressione dell'mRNA dell'Aurora-C rispetto ai tessuti sani.

Su 3 PTC è stata inoltre eseguita un'analisi western blot che ha mostrato un chiaro aumento di tutte le chinasi Aurora nei tumori rispetto ai tessuti normali (Figura 23B). In particolare, l'Aurora-A è aumentata di  $3.2 \pm 0.4$  volte ( $p < 0.01$ ) e l'Aurora-B di  $7.1 \pm 0.2$  volte ( $p < 0.01$ ), mentre l'Auroa-C, indosabile nel tessuto normale, risulta chiaramente indotta in tutti e tre i PTC (53).

A



B



**Fig.23** Espressione delle chinasi Aurora in tessuti tiroidei normali e tumorali. **A)** Real-time RT-PCR di 7 campioni tissutali derivanti da carcinomi tiroidei papilliferi in confronto con campioni di tessuto normale ottenuto dagli stessi pazienti. Gli incrementi di mRNA sono stati calcolati considerando uguale a 1 il rapporto chinasi Aurora/ $\beta_2$ -microglobulina ottenuto per i tessuti tiroidei normali. L'inserto mostra i livelli di mRNA delle Aurora chinasi ottenuti per tre dei sette campioni analizzati. **B)** Western blot degli estratti proteici di tre carcinomi papilliferi in confronto con i tessuti normali prelevati dagli stessi pazienti

## DISCUSSIONE

Nonostante il ruolo della famiglia delle Aurora Chinasi nei differenti tipi di neoplasia sia ben noto, le informazioni riguardanti la loro espressione nei tessuti tiroidei sani e neoplastici sono piuttosto limitate. Uno studio precedente ha dimostrato l'iperespressione dell'Aurora-B nei carcinomi non differenziati della tiroide (39).

Nel presente studio è stato dimostrato che i tireociti normali umani oltre all'Aurora-B esprimono anche le Aurora-A e -C. Inoltre tale espressione, come già dimostrato in altre cellule, è dipendente dal ciclo cellulare; appare down-regolata in seguito alla deprivazione di siero ed invece indotta dal trattamento con siero.

Le tre chinasi Aurora risultano iperesprese in tutte le linee cellulari di carcinomi tiroidei analizzate eccezione di quelle derivate dall'adenoma follicolare.

In aggiunta, è stato osservato un aumento di espressione di tutte e tre le chinasi in 7 PTC, in rapporto ai tessuti normali. Nel precedente lavoro di Sorrentino et al è stato dimostrato un incremento dell'Aurora-B unicamente nei carcinomi anaplastici, ma non nei carcinomi papilliferi. Questa discrepanza di risultati potrebbe essere spiegata dal fatto che il range dell'aumento dell'espressione dell'mRNA dell'Aurora-B è fortemente variabile; comprende infatti incrementi di 4 volte. Quindi è possibile che l'iperespressione dell'Aurora-B non venga apprezzata quando si analizzi un piccolo numero di PTC.

I dati ottenuti mostrano che l'espressione dell'Aurora-A e dell'Aurora-B sono regolati soprattutto a livello trascrizionale; i livelli di Aurora-C sono modulati invece a livelli post-trascrizionali. Le variazioni dei livelli di concentrazione dell'Aurora -A e-B corrispondono a cambiamenti nei rispettivi livelli di mRNA. Al contrario nelle condizioni in cui le proteine Aurora-C sono up-regolate, ad esempio in cellule o tessuti derivanti da carcinomi tiroidei, o

down-regolate, come nel caso di deprivazione di siero di normali tireociti in coltura, non ci sono modificazioni della quota di mRNA. La possibile causa dell'accumulo della proteina Aurora-C potrebbe essere una alterazione del sistema ubiquitina-proteosoma che controlla la sua degradazione. I livelli proteici dell'Aurora-A e dell'Aurora-B chinasi sono regolati da proteolisi periodica ubiquitino-dipendente al termine della mitosi (54, 55). Nonostante l'Aurora-C chinasi condivida un sito catalitico comune con l'Aurora-A e -B, nessuno studio ha ancora dimostrato una regolazione proteolitica dipendente dal ciclo cellulare per queste chinasi. Ci si potrebbe aspettare che la D-box presente nel sito catalitico della Aurora chinasi normalizzi la quota delle proteine in vitro; in realtà i meccanismi molecolari che controllano l'espressione dell'Aurora-C nelle cellule tiroidee umane sono ancora da dimostrare.

Recentemente è stato dimostrato che l'Aurora-C fa parte delle proteine *chromosomal passenger* assieme all'Aurora-B a INCENP e survivina, contribuisce quindi alla corretta segregazione cromosomica ed alla citocinesi (32,34). Aurora-B ed Aurora-C condividono l'83% della sequenza, mentre le chinasi Aurora-A e -C solo il 71% (19). Basandosi sul livello di identità presumibilmente le chinasi Aurora-C sono più vicine alle Aurora-B che alle -A. in accordo con queste osservazioni gli studi di immunofluorescenza hanno mostrato che le Aurora-C e -B sono localizzate assieme a livello del ponte citoplasmatico. L'Aurora-A è localizzata invece a livello dei centrosomi e del fuso mitotico, come dimostrato nelle osservazioni successive.

Pertanto tali evidenze pongono la questione se le tre chinasi svolgano in questa fase funzioni più o meno analoghe oppure se ciascuna abbia un ruolo distinto e substrati specifici.

Le neoplasie delle cellule follicolari della tiroide sono spesso caratterizzate da instabilità genomica; ciononostante i processi biologici che ne sono all'origine restano ancora largamente sconosciuti. In questo ambito l'aumento di espressione dell'Aurora-A nei



tireociti maligni osservata in questo lavoro potrebbe avere un ruolo importante nella patogenesi tumorale del tireocita. Infatti è stato dimostrato che l'iperespressione dell'Aurora-A potenzia l'azione oncogenica di RAS, notoriamente coinvolto nella trasformazione dei tireociti umani e nell'instabilità cromosomica del tumore tiroideo (42).

Inoltre, è stato dimostrato come la proteina p53 legghi il dominio catalitico dell'Aurora-A bloccando la capacità di amplificare i centrosomi (30). Inoltre è stato dimostrato che la p53 è un substrato dell'Aurora-A, la cui fosforilazione a livello della Ser 215 determina l'inibizione della sua azione trans-attivante su diversi geni (40). Quindi alterazioni nel cross-talk tra Aurora-A e p53 attraverso la compromissione della fedeltà della segregazione cromosomica nelle cellule tiroidee potrebbe avere un'importanza rilevante nella progressione tumorale (12, 41).

Infine, l'iperespressione delle chinasi Aurora nei tumori della tiroide potrebbe avere anche implicazioni importanti a livello terapeutico. Negli ultimi anni sono stati identificati specifici inibitori di questi enzimi che potrebbero aprire un nuovo scenario nella terapia oncologica, specialmente contro quei tumori che non rispondono efficacemente agli agenti antimitotici attualmente in uso, come il carcinoma tiroideo anaplastico (47, 56).

Infatti è stato documentato recentemente che bloccando l'attività enzimatica dell'Aurora-B o inibendo la sua espressione tramite RNA interference, viene ridotta significativamente la crescita delle cellule di carcinoma tiroideo anaplastico (39, 57).

In conclusione, gli esperimenti effettuati nel presente studio hanno dimostrato che i tireociti normali umani esprimono tutti e tre i membri della famiglia delle chinasi Aurora e che tale espressione è dipendente dal ciclo cellulare. Inoltre, le chinasi Aurora risultano overesprese sia nelle linee cellulari che nei tessuti derivanti da carcinomi tiroidei, tra cui i carcinomi

differenziati della tiroide. È stato infine dimostrato che tali variazioni per l'Aurora -A e -B sono regolate a livello trascrizionale, mentre meccanismi post-trascrizionali sono responsabili delle variazioni di espressione dell'Aurora-C (53). Questi risultati hanno un ruolo rilevante nella patogenesi dei carcinomi tiroidei e possono pertanto rappresentare un nuovo bersaglio terapeutico.

## BIBLIOGRAFIA

1. Kasper D.L., Braunwald E., Fauci A.S., Hauser S.L., Longo D.L., Jameson J.L.: *Harrison's Principles Of Internal Medicine*. McGraw-Hill, 2005.
2. D'Armiento M., Dondero F., Lenzi A.: *Guida allo studio dell'endocrinologia*. I edizione, Edizioni Internazionali, 2007.
3. D'Armiento M: *Carcinomi della tiroide*. In: *Manuale di Endocrinologia e Metabolismo*. Il pensiero scientifico Editore 196-05, 2000.
4. Pacini F., Pinchera A., Elisei R.: *Tumori della tiroide*. Mediserve Editore 2003.
5. Kumar V, Abbas A.K., Fausto N.: *Robbins, Cotran Le basi patologiche delle malattie*. VII Edizione, Elsevier 2005
6. Boulay A., Breuleux M., Stephan C., Fux C., Brisken C., Fiche M., Wartmann M., Stumm M., Lane H.A., Hynes N.E.. *The Ret receptor tyrosine kinase pathway functionally interacts with the ERalpha pathway in breast cancer*. *Cancer Res.* 68: 3743-51, 2008.
7. Fugazzola L, Mannavola D, Cirello V, Vannucchi G, Muzza M, Vicentini L, Beck-Peccoz P. BRAF mutations in an Italian cohort of thyroid cancers. *Clin Endocrinol* 61: 239-243, 2004
8. Sedliarou I, Saenko V, Lantsov D, Rogounovitch T, Namba H, Abrosimov A, Lushnikov E, Kumagai A, Nakashima M, Meirmanov S, Mine M, Hayashi T and Yamashita S *The BRAFT1796A transversion is a prevalent mutational event in human thyroid microcarcinoma*. *Int J Oncol* 25(6):1729-35, 2004.
9. Nikiforow Y.E. *Anaplastic carcinoma of the thyroid-wil Aurora B light a path for treatment?* *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90:1243-45, 2005.
10. Pontieri G.M. *Patologia generale*, Ed. Piccin, 1987.
11. Kojima K., Konopleva M., Tsao T., Nakakuma H., Andreeff M. *Concomitant inhibition of Mdm2-p53 interaction and Aurora kinases activates the p53-dependent postmitotic checkpoints and synergistically induces p53-mediated mitochondrial apoptosis along with reduced endoreduplication in acute myelogenous leukemia*. *Blood.* 112: 2886-95, 2008.

12. Shahedian B., Shi Y., Zou M. & Farid N.R. *Thyroid carcinoma is characterized by genomic instability: evidence from p53 mutations*. Mol. Genet. Metab. 72: 155-63, 2001.
13. Russel P.J. *Genetica*, EDISES 2003.
14. Carmena M. & Earnshaw W.C. *The cellular geography of aurora kinases*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 4: 842-54, 2003.
15. Giet R., Petretti C., Prigent C. *Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link?* Trends Cell Biol. 15: 241-50, 2005.
16. Mountzios G., Terpos E., Dimopoulos M.A. *Aurora kinases as targets for cancer therapy*. Cancer Treat Rev. 34:175-82, 2008.
17. Fu J., Bian M., Jiang Q., Zhang C. *Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis*. Mol Cancer Res. 5: 1-10, 2007.
18. Matthews N., Visintin C., Hartzoulakis B., Jarvis A. & Selwood D.L. *Aurora A and B kinases as targets for cancer: will they be selective for tumors?* Expert. Rev. Anticancer Ther., 6: 109-20, 2006.
19. Bischoff J.R., Plowman G.D. *The Aurora/IplIp kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis*. Trends Cell Biol. 9: 454-9, 1999.
20. Castro A., Arlot-Bonnemains Y., Vigneron S., Labbé J.C., Prigent C., Lorca T. *APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis*. EMBO Rep. 3: 457-62, 2002
21. Brown J.R., Koretke K.K., Birkeland M.L., Sanseau P., Patrick D.R. *Evolutionary relationships of Aurora kinases: implications for model organism studies and the development of anti-cancer drugs*. BMC Evol. Biol. 4: 39, 2004.
22. Marumoto T., Zhang D., Saya H. *Aurora-A - a guardian of poles*. Nat. Rev. Cancer. 5: 42-50, 2005.
23. Higuchi T., Uhlmann F. *Cell cycle: passenger acrobatics*. Nature. 426: 780-81, 2003.
24. Vagnarelli P. & Earnshaw W.C. *Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events*. Chromosoma 113: 211-22, 2004.
25. Dutertre S., Prigent C. *Aurora-A overexpression leads to override of the microtubule-kinetochore attachment checkpoint*. Mol. Interv. 3: 127-30, 2003.
26. Meraldi P., Honda R., Nigg E.A. *Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells*. EMBO J. 21: 483-92, 2002.

27. Bedrick B. Gadea and Joan V. Ruderman, *Aurora Kinase Inhibitor ZM447439 Blocks Chromosome-induced Spindle Assembly, the Completion of Chromosome Condensation, and the Establishment of the Spindle Integrity Checkpoint in Xenopus Egg Extracts*. Mol. Biol. Cell. 16: 1305-18, 2005.
28. Conte N., Delaval B., Ginestier C., Ferrand A., Isnardon D., Larroque C., Prigent C., Séraphin B., Jacquemier J., Birnbaum D. *TACCI-chTOG-Aurora A protein complex in breast cancer*. Oncogene. 22: 8102-16, 2003.
29. Bellanger J.M., Gönczy P. *TAC-1 and ZYG-9 form a complex that promotes microtubule assembly in C. elegans embryos*. Curr. Biol.13: 1488-98, 2003.
30. Chen S.S., Chang P.C., Cheng Y.W., Tang F.M. & Lyn Y.S. *Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function*. EMBO J. 21: 4491-99, 2002.
31. Zhang Y., Nagata Y., Yu G., Nguyen H.G., Jones M.R., Toselli P., Jackson C.W., Tatsuka M., Todokoro K., Ravid K. *Aberrant quantity and localization of Aurora-B/AIM-1 and survivin during megakaryocyte polyploidization and the consequences of Aurora-B/AIM-1-deregulated expression*. Blood. 103: 3717-26, 2004.
32. Yan X., Cao L., Li Q., Wu Y., Zhang H., Saiyin H., Liu X., Zhang X., Shi Q. & Yu L. *Aurora C is directly associated with Survivin and required for cytokinesis*. Genes Cells 10: 617-26, 2005.
33. Li X., Sakashita G., Matsuzaki H., Sugimoto K., Kimura K., Hanaoka F., Taniguchi H., Furukawa K., Urano T. *Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C*. J. Biol. Chem. 279: 47201-11, 2004.
34. Sasai K, Katayama H, Stenoiien DL, Fujii S, Honda R, Kimura M, Okano Y, Tatsuka M, Suzuki F, Nigg EA, Earnshaw WC, Brinkley WR, Sen S. *Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells*. Cell Motil Cytoskeleton. 2004 Dec;59(4):249-63.
35. Woolf, *Patologia Generale*, Idelson-Gnocchi 2003.
36. Katayama H., Sasai K., Kloc M., Brinkley B.R., Sen S. *Aurora kinase-A regulates kinetochore/chromatin associated microtubule assembly in human cells*. Cell Cycle. 7: 2691-704, 2008.

37. Stewart Z.A., Leach S.D., Pietsenpol J.A. *p21Waf1/Cip1 inhibition of cyclin E/Cdk2 activity prevents endoreduplication after mitotic spindle disruption*. Mol. Cell Biol. 19: 205–15, 1999
38. Gizatullin F., Yao Y., Kung V., Harding M.W., Loda M. & Shapiro G.I. *The Aurora kinase inhibitor VX-680 induces endoreduplication and apoptosis preferentially in cells with compromised p53-dependent postmitotic checkpoint function*. Cancer Res. 66: 7668-77, 2006.
39. Sorrentino R., Libertini S., Pallante P.L., Troncone G., Palombini L., Bavetsias V., Spalletti-Cernia D., Laccetti P., Linardopoulos S., Chieffi P., et al. *Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation*. J Clin Endocrinol Metab. 90: 928-35, 2005.
40. Liu Q., Kaneko S., Yang L., Feldman R.I., Nicosia S.V., Chen J. & Cheng J.Q. *Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215*. J. Biol. Chem., 279: 52175-82, 2004.
41. Parry E.M., Ulucan H., Wyllie F.S., Wynford-Thomas D. & Parry J.M. *Segregational fidelity of chromosomes in human thyroid tumour cells*. Chromosoma, 107: 491-97, 1998.
42. Tatsuka M., Sato S., Kitajima S., Suto S., Kawai H., Miyauchi M., Ogawa I., Maeda M., Ota T. & Takata T. *Overexpression of Aurora-A potentiates HRAS-mediated oncogenic transformation and is implicated in oral carcinogenesis*. Oncogene, 24: 1122-27, 2005.
43. Miao X., Sun T., Wang Y., Zhang X., Tan W., Lin D. *Functional STK15 Phe31Ile polymorphism is associated with the occurrence and advanced disease status of esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer Res. 64: 2680-3, 2004.
44. Sun T., Miao X., Wang J., Tan W., Zhou Y., Yu C., Lin D. *Functional Phe31Ile polymorphism in Aurora A and risk of breast carcinoma*. Carcinogenesis. 25: 2225-30, 2004.
45. Ota T., Suto S., Katayama H., Han Z.B., Suzuki F., Maeda M., Tanino M., Terada Y. & Tatsuka M. *Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability*. Cancer Res. 62: 5168-77, 2002.

46. Bernard M., Sanseau P., Henry C., Couturier A., Prigent C. *Cloning of STK13, a third human protein kinase related to Drosophila aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter*. Genomics. 53: 406-9, 1998.
47. Harrington E.A., Bebbington D., Moore J., Rasmussen R.K., Ajose-Adeogun A.O., Nakayama T., Graham J.A., Demur C., Hercend T., Diu-Hercend A. et al. *VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo*. Nat. Med. 10: 262-67, 2004.
48. Ditchfield C., Johnson V.L., Tighe A., et al. *Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores*. J. Cell Biol.; 161: 267–80, 2003.
49. Curcio F., Ambesi-Impiombato F.S., Perrella G. & Coon H.G.. *Long-term culture and functional characterization of follicular cells from adult normal human thyroids*. P. Natl. Acad. Sci. U.S.A USA, 91: 9004-08, 1994.
50. Perrella G., Fabbro D., Damante G., Di Loreto C., Beltarmi C. A., Curcio F., Ambesi-Impiombato F.S. *Expression of differentiation markers in cultured cells from various thyroid diseases*. Thyroid 7: 817-21, 1997.
51. Chomczynsky P., Sacchi P. *Single step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem 162: 156-159, 1987.
52. Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem 72: 248-254, 1976.
53. Ulisse S., Delcros J.C., Baldini E., TYoller M., Curcio F., Giacomelli R., Prigent C., Ambesi-Impiombato F.S., D'Armiento M., Arlot-Bonnemains Y. *Expression of Aurora kinase in human thyroid carcinoma cell lines and tissues*. Int J Cancer 119 (2): 275-82, 2006.
54. Arlot-Bonnemains Y., Klotzbucher A., Giet R., Uzbekov R., Bihan R. & Prigent C. *Identification of a functional destruction box in the Xenopus laevis aurora-A kinase pEg2*. FEBS Lett. 508: 149-52, 2001.
55. Littlepage L. E., Ruderman J.V. *Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit*. Gene Dev 16: 2274-85, 2002.
56. Hata T., Furukawa T., Sunamura M., Egawa S., Motoi F., Ohmura N., Marumoto T., Saya H., Horii A. *RNA interference targeting aurora kinase suppresses tumor*

*growth and enhances the taxane chemosensitivity in human pancreatic cancer cells.*  
Cancer Res 65(2): 2899-905, 2005.

57. Zhou H., Kuang J., Zhong L., Kuo W.L., Gray JW., Sahin A., Brinkley B. R., Sen S.  
*Tumor amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy  
and transformation.* Nat Genet 20 (2): 189-93, 1998.



## **RINGRAZIAMENTI**

*Grazie al Chiar.mo Pof. MAssimino D'Armiento per avermi guidato durante il percorso  
formativo e aver arricchito ogni giorno il mio sapere.*

*Ad Angelo, che è stato da sempre il mio ... "custode": grazie Amore mio.*

*A papà, mamma, Maria e Giovanni,*

*guida della mia vita.*