



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN DERMATOLOGIA, CHIRURGIA
PLASTICA, ANATOMIA UMANA NORMALE**

XXV CICLO

Tesi di Dottorato

**RUOLO DELL'INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR
BINDING PROTEIN 3 SUL CONTROLLO
DELL'ATTIVITA' MITOGENA E MIGRATORIA
MEDIATA DALLA β -CATENINA NELLE CELLULE DI
MELANOMA**

Relatore

Chiar. ^{mo} Prof. Stefano Calvieri

Dottorando

Dott. ssa Michela Curzio

Correlatore

Chiar. ^{ma} Prof.ssa Rita Clerico

Anno Accademico 2011 – 2012

INDICE

INTRODUZIONE	4
IL MELANOMA: EPIDEMIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO	4
TIPI DI MELANOMA	5
STADIAZIONE DEL MELANOMA	11
<i>Classificazione TNM</i>	12
<i>Stadi</i>	14
DIAGNOSI DEL MELANOMA	16
BIOLOGIA E GENETICA DEL MELANOMA	20
<i>Mutazioni germinali nel melanoma</i>	23
<i>Mutazioni somatiche del melanoma</i>	25
<i>Proliferazione cellulare</i>	25
<i>Segnali di sopravvivenza</i>	29
<i>Cooperazione tra le vie RAS-RAF-MAPK e PI3K/AKT</i>	32
<i>Alterazione di geni implicati nella differenziazione del melanocita</i>	32
<i>Invasione e adesione cellulare</i>	35
<i>Attivazione dei recettori per i fattori di crescita</i>	36
IL SISTEMA DEI FATTORI DI CRESCITA INSULINO-SIMILE	38
<i>I recettori degli IGFs e le vie di segnalazione</i>	40
<i>Le IGF-binding proteins</i>	47
<i>IGFBP-3</i>	50
<i>IGFBP3: un mediatore di apoptosi</i>	53
<i>Le proteasi che agiscono sulle IGFBPs</i>	54
<i>Il complesso ternario</i>	56
GLI IGF E IL CANCRO	57
<i>Ruolo dell'IGF2R nella tumorigenesi</i>	58
IGFBP-3 E MELANOMA	60
LE METALLOPROTEASI	63
<i>Collagenasi</i>	65
<i>Gelatinasi</i>	65
<i>Stromelisine</i>	65
<i>Matrilisine</i>	66
<i>MMP membrane type</i>	66
<i>Il gruppo delle "altre MMP"</i>	67
<i>Attivazione delle MMP</i>	67
<i>Attivazione "in vitro"</i>	68
<i>Attivazione "in vivo"</i>	68
<i>TIMP</i>	69
<i>Meccanismi molecolari dell'attività delle MMP</i>	69
<i>Rimodellamento della ECM</i>	70
<i>Degradazione di molecole di superficie</i>	71
<i>Regolazione di segnali paracrini</i>	72
LE METALLOPROTEASI E IL MELANOMA	74
IL SISTEMA WNT, GSK3 E β -CATENINA	75
<i>Il pathway WNT canonico</i>	78
MATERIALI E METODI	81
<i>Elisa</i>	84
<i>RIA</i>	85
<i>Saggio per le proteasi di IGFBP-3</i>	85
<i>Zimografia</i>	86
<i>Colture cellulari</i>	87
<i>Scratch test</i>	88
<i>Trypan blue test</i>	89

<i>Test di invasività cellulare</i>	90
<i>Western Blot</i>	91
<i>Xenotrapianti di cellule Me501 in topi SCID</i>	91
<i>Saggio dell'attività tirosinasi</i>	93
<i>Immunoistochimica</i>	94
<i>Analisi statistica</i>	98
RISULTATI	101
<i>Le concentrazioni di IGFBP-3 misurate mediante ELISA sono risultate significativamente inferiori nei pazienti affetti da melanoma al IV stadio</i>	101
<i>La ridotta biodisponibilità di IGF-1 sierico è risultata correlata alla sopravvivenza dei pazienti</i>	104
<i>La progressione di malattia nei pazienti si accompagna a una riduzione dei livelli sierici di IGFBP-3 misurati mediante ELISA</i>	108
<i>L'espressione di IGFBP-3, valutata in immunoistochimica, è maggiore nei melanomi primitivi rispetto alle metastasi dermiche</i>	110
<i>Nel siero dei pazienti al IV stadio di malattia la riduzione dei valori di IGFBP-3 è mediata da specifici processi proteolitici assenti nel siero dei pazienti in stadio dallo 0 al III</i>	113
<i>Nel siero dei pazienti al IV stadio sono presenti metalloproteasi 1, 2, 7 e 9</i>	115
<i>Le linee cellulari di melanoma producono metalloproteasi che degradano IGFBP-3</i>	117
<i>L'espressione di metalloproteasi 9, valutata in immunoistochimica, è maggiore nelle metastasi dermiche rispetto ai melanomi primitivi</i>	120
<i>La differente espressione compartimentale di IGFBP-3 e di MMP-9 correla con la natura della lesione</i>	124
<i>L'aggiunta di IGFBP-3 ricombinante al terreno di cellule di melanoma in coltura (Me-501) riduce la motilità cellulare</i>	127
<i>L'aggiunta di IGFBP-3 ricombinante al terreno di cellule di melanoma in coltura (Me-501) riduce la capacità migratoria di tali cellule</i>	131
<i>IGFBP-3 aumenta la capacità di melanogenesi delle cellule Me501</i>	134
<i>La positività immunoistochimica per IGFBP-3 a livello tumorale correla con la pigmentazione del tumore primitivo</i>	137
<i>Influenza del trattamento con IGFBP-3 sul pathway dell'Akt</i>	141
<i>Studio su tumori xenotrapiantati in modelli murini: il volume tumorale nei topi trattati è risultato inferiore a quello del gruppo di controllo</i>	142
<i>Studio su tumori xenotrapiantati in modelli murini :la β-catenina gioca un ruolo importante nella capacità metastatica delle cellule di melanoma</i>	151
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	162
BIBLIOGRAFIA	178

INTRODUZIONE

IL MELANOMA: EPIDEMIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO

Il melanoma è un tumore maligno ad alta aggressività e rapida crescita cellulare che origina dal melanocita. Negli ultimi 50 anni è stata osservata un'incidenza raddoppiata ed uno sviluppo maggiore di qualsiasi altro tumore maligno, ad eccezione del cancro del polmone nella donna (1). Inoltre, nonostante i recenti progressi nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche, i pazienti affetti da malattia in stadio avanzato presentano comunque una prognosi infausta (2).

Negli Stati Uniti, il melanoma è al quinto posto nei maschi e al sesto nelle donne tra i tumori maligni più frequenti, con un'incidenza ed una mortalità per anno, rispettivamente, del 18,3 e del 2,7 ogni 100.000 abitanti (3); inoltre, rappresenta il 2-3% dei tumori maligni nel Nord dell'Europa e negli USA; il tasso di incidenza maggiore si osserva nella regione Australiana del Queensland.

Sebbene colpisca soggetti di ogni sesso ed età, il picco di incidenza è compreso tra i 35 ed i 50 anni. Prevale leggermente nel sesso maschile e diversa è la sede di origine del tumore primitivo tra i due sessi: nelle donne, infatti, è rappresentata dagli arti inferiori, negli uomini dal tronco.

Secondo molti Autori, l'insorgenza del melanoma potrebbe essere messa in relazione al danno ossidativo indotto dall'esposizione ai raggi ultravioletti, in particolare se intensa ed intermittente e, soprattutto, alla sovraesposizione in età pediatrica, mentre l'esposizione cronica al sole sembra favorire l'insorgenza di

carcinomi cutanei. L'uso di lettini e lampade abbronzanti è associato ad un maggiore rischio di melanoma, specie se l'esposizione ai raggi ultravioletti artificiali è prolungata ed iniziata precocemente. Altri importanti fattori di rischio sono rappresentati dalle caratteristiche fenotipiche (carnagione chiara e capelli biondi o rossi, facilità alle scottature solari e difficoltà ad abbronzarsi), le lentiggini solari, il numero ed il tipo di nevi (ricordiamo, ad esempio, che i nevi congeniti giganti ed i nevi displastici comportano un rischio aumentato di sviluppare questa neoplasia), la storia familiare o personale di melanoma (4-6). La frequenza del melanoma familiare varia dal 5 al 10%.

TIPI DI MELANOMA

Il melanoma può insorgere sia su un nevo preesistente che su cute sana.

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

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

- 1) lentigo maligna melanoma (inizialmente a crescita orizzontale);
- 2) superficial spreading melanoma (inizialmente a crescita orizzontale);
- 3) melanoma acrale lentiginoso (inizialmente a crescita orizzontale);
- 4) melanoma nodulare (a crescita verticale fin dall'inizio).

La lentigo maligna melanoma (figura 1) coinvolge il volto, in particolare le regioni zigomatiche e riguarda soprattutto i pazienti anziani. Si presenta come una lesione pigmentata piana che si allarga gradualmente, con un colore che varia, nel contesto della lesione, dal marrone chiaro allo scuro o al nero; i margini sono irregolari, seghettati o intaccati. Viene denominata lentigo maligna quando la lesione è solo a crescita orizzontale. Nel caso in cui si ispessisca e diventi invasiva si definisce lentigo maligna melanoma. La lentigo maligna è anche denominata Hutchinson's melanotic freckle o melanosis circumscripta precancerosa di Dubreuilh, che è la forma che si può definire degenerativa, da mettere in relazione ai carcinomi cutanei sia per oncogenesi (danno cronico) sia per prognosi.

Istologia: è associata ai reperti tipici del danno attinico, quali l'atrofia epidermica e l'elastosi solare. La lesione è caratterizzata da iperproliferazione di melanociti atipici, situati prevalentemente lungo lo strato basale dell'epidermide che coinvolge, caratteristicamente, anche lo strato basale del follicolo pilifero; essi presentano nuclei irregolari ed ipercromici e mostrano tipicamente una marcata vacuolizzazione citoplasmatica. Con il progredire della lesione, nidi di

cellule atipiche si raccolgono a livello della giunzione dermo-epidermica, spesso assumendo forma fusata.

Il melanoma a diffusione superficiale o SSM (superficial spreading melanoma) (figura 2) colpisce in genere soggetti più giovani. Ha l'aspetto iniziale di una macula pigmentaria con margini irregolari, con sfumature di vario colore, marroni o nere, alternate ad aree di colorito bluastrò; successivamente può diventare invasivo, mostrando una nodulazione nel suo contesto.

La prognosi è migliore durante la fase di accrescimento orizzontale, peggiore nella successiva fase di sviluppo verticale.

Istologia: non è di solito associato a segni di grave danno attinico. Cellule anomale, isolate o raccolte in nidi, sono irregolarmente distribuite in tutta l'epidermide, spesso coinvolgendo gli strati superiori con aspetto simile al morbo di Paget (da cui la denominazione alternativa di melanoma pagetoide). Le cellule sono voluminose con abbondante citoplasma e nuclei vescicolari, pleomorfi, con nucleoli prominenti eosinofili. La pigmentazione è variabile, ma spesso marcata. In fase invasiva, l'infiltrazione neoplastica è, in genere, costituita da cellule epitelioidi.

Il melanoma acrale lentiginoso (figura 3) inizialmente ha un aspetto simile alla lentigo maligna, ma l'invasione e la nodulazione con conseguente metastatizzazione sono precoci. Si localizza elettivamente alle acrosedi (piedi), e può anche interessare il letto ungueale; in questo caso l'unghia si presenta

pigmentata, non cresce, la lamina ungueale mostra modificazioni di forma, si fessura e si possono osservare delle emorragie in trasparenza.

Istologia: la variante più comune è caratterizzata dalla presenza di epidermide iperplastica e di melanociti atipici situati nello strato basale dell'epidermide, ma anche negli strati superiori, incluso il corneo. Si osserva pleomorfismo cellulare con nuclei ipercromici e nucleoli voluminosi, sono frequenti le mitosi. E' comune il reperto contemporaneo di nidi di cellule sia epitelioidi che fusate, mentre, nello stadio invasivo, si riscontrano prevalentemente cellule fusate.

Caratteristiche le creste epidermiche prominenti e spesso fuse.

Il melanoma nodulare (figura 4) può insorgere come una lesione primitiva o può svilupparsi da un nevo nevocitico pigmentato; non ha una fase di crescita orizzontale, ma cresce velocemente in senso verticale sin dall'inizio. Si presenta come una papula che gradualmente diventa nodulare e può successivamente sanguinare, ulcerarsi e, quindi, metastatizzare; può anche essere acromico fin dall'inizio.

Istologia: è associato ad attività giunzionale e a vari gradi di infiltrazione epidermica e dermica da parte di cellule tumorali pleomorfe. Queste ultime possono avere un abbondante citoplasma e nuclei voluminosi con nucleoli eosinofili (tipo epitelioidi) o assumere forma fusata. Si possono notare numerose mitosi spesso atipiche.

Figura 1: lentigo maligna melanoma



Figura 2: melanoma a diffusione superficiale



Figura 3: melanoma acrale lentiginoso



Figura 4: melanoma nodulare



STADIAZIONE DEL MELANOMA

Attualmente, il parametro prognostico maggiormente considerato e validato statisticamente è lo spessore di Breslow, ossia la profondità di invasione del melanoma, misurato in millimetri, a partire dalla strato granuloso dell'epidermide (7). Successivamente, a questo indice è stato aggiunto il parametro dell'ulcerazione, anch'esso valutato istologicamente ed inserito nella stadiazione del melanoma del 2002; infine, nell'ultima revisione della stadiazione da parte dell'AJCC (American Joint Committee on Cancer) del 2009 è stato introdotto un nuovo parametro istologico di grande rilievo quale il numero di mitosi, sostituendo il livello di Clark. (8) La stadiazione attuale non si discosta in modo sostanziale dalla precedente del 2002, introducendo come unica novità, la valutazione del numero di mitosi per definire la categoria T.

Pertanto i parametri considerati sono:

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

Classificazione TNM

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

M1a	metastasi a distanza a livello di cute, tessuto sottocutaneo o linfonodi normali livelli sierici di LDH
M1b	metastasi polmonari normali livelli sierici di LDH
M1c	ogni altra sede di metastasi viscerale normali livelli sierici di LDH qualsunque sede di metastasi a distanza elevati livelli sierici di LDH

Stadi

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

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

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

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

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

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

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

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

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

IV melanoma con metastasi a distanza (ogni T ogni N M1); la categoria M viene suddivisa in tre sottogruppi (M1a, M1b, M1c) in base alla sede delle metastasi e ai livelli sierici di LDH; tuttavia dal momento che le differenze di sopravvivenza tra queste tre categorie sono scarse, non esiste alcun sottogruppo nell'ambito del IV stadio (9).

DIAGNOSI DEL MELANOMA

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

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

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

Numerosi criteri dermoscopici e metodi semiquantitativi sono stati valutati per discriminare tra lesioni pigmentarie benigne e maligne, allo scopo di porre diagnosi di melanoma sempre più precocemente (10-18), il che rimane l'obiettivo fondamentale da perseguire, dal momento che il melanoma si può considerare complessivamente non chemioresponsivo né radioresponsivo. La strategia terapeutica, pertanto, prevede di base il trattamento chirurgico, il più

possibile tempestivo e radicale. Si procede, quindi, all'allargamento della precedente cicatrice chirurgica, il quale dovrà essere condotto in modo che i margini di cute indenne siano sufficientemente ampi, ovviamente in base allo spessore della neoplasia.

Per i pazienti con malattia allo stadio IA (spessore <1mm e assenza di fattori prognostici negativi), l'escissione chirurgica sembra essere sufficiente. Per i pazienti con malattia allo stadio IB-II, oltre all'exeresi è necessario effettuare anche l'esame del linfonodo sentinella: si definisce linfonodo sentinella (LS), il linfonodo che per primo drena la linfa di un certo territorio cutaneo. La valutazione del LS consentirebbe di predire con buona accuratezza se il melanoma abbia metastatizzato o meno nel bacino linfonodale di pertinenza, in quanto la diffusione metastatica ai linfonodi non sarebbe un evento casuale ma procederebbe in modo sequenziale, interessando dapprima il/i linfonodo/i sentinella e successivamente quelli a livello più alto. L'ipotesi è che, se il LS è indenne, lo saranno anche gli altri linfonodi della stessa stazione; al contrario, se nel LS sono presenti cellule metastatiche, esse dovrebbero essere presenti anche negli altri linfonodi della stazione indagata: in tal caso si dovrà procedere ad una linfadenectomia elettiva del bacino linfonodale interessato (19). Questa tecnica è stata introdotta da Morton nel 1992 (20). Tuttavia, è riportata in letteratura la possibilità di un linfonodo sentinella falso negativo, cioè la prima ripetizione di malattia proprio nello stesso bacino linfonodale sede della biopsia del LS che era

risultato negativo. Questa possibilità si osserva maggiormente in caso di presenza di ulcerazione del melanoma primitivo (21).

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

Un numero significativo di pazienti, tuttavia, nonostante un corretto e puntuale trattamento chirurgico, progredisce comunque dallo stadio iniziale di malattia verso stadi più avanzati. La metastatizzazione può avvenire per contiguità, per via linfatica (satellitosi, metastasi in transit, metastasi ai linfonodi locoregionali) e per via ematica. I siti più comunemente colpiti dalle metastasi sono, nell'ordine, cute, sottocute, linfonodi (42-59%), polmoni (18-36%), fegato (14-20%), encefalo (12-20%), ossa (11-17%) e apparato digerente (1-7%) (22). Nelle fasi avanzate di malattia gli indici di sopravvivenza sono particolarmente deludenti: infatti, il melanoma allo stadio IV (AJCC 2001) (9) presenta una sopravvivenza globale a 5 anni inferiore al 10%, con tempo medio di sopravvivenza valutato intorno a 5-7 mesi (23).

Il melanoma metastatico è una malattia sistemica e come tale il suo trattamento elettivo è quello medico per via generale. Purtroppo, attualmente le percentuali di risposta completa e parziale dopo trattamento medico, non superano il 40-50 %, con durata di risposta valutata intorno ai 10-12 mesi. Alcuni pazienti, però,

presentano risposte complete di lunga durata (“long responders”) (24, 25). Pertanto, pur con tutte le limitazioni sopraesposte, la terapia medica del melanoma nelle fasi avanzate di malattia resta un’arma terapeutica importante da conoscere ed utilizzare.

BIOLOGIA E GENETICA DEL MELANOMA

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

Affinché l'informazione genetica venga correttamente trasmessa dalla cellula madre alle cellule figlie, il genoma deve essere prima duplicato durante il periodo di tempo denominato fase S e, in seguito, i cromosomi devono essere segregati nelle due cellule figlie durante la fase M. La fase M è, a sua volta, composta da due processi strettamente collegati: la mitosi, durante la quale i cromosomi della cellula sono divisi tra le due cellule figlie e la citodieresi, che comporta la divisione fisica del citoplasma della cellula. Esiste una fase chiamata G₀ in cui la cellula arresta il proprio ciclo cellulare.

Nel ciclo cellulare sono presenti dei punti di controllo o *checkpoints*, localizzati a livello delle transizioni G₁/S e G₂/M. Infatti, tra le fasi S ed M ci sono normalmente due periodi di tempo detti "*gap*": G₁ fra la fine della mitosi e l'inizio della fase S e G₂ fra il termine della fase S e l'inizio della fase M.

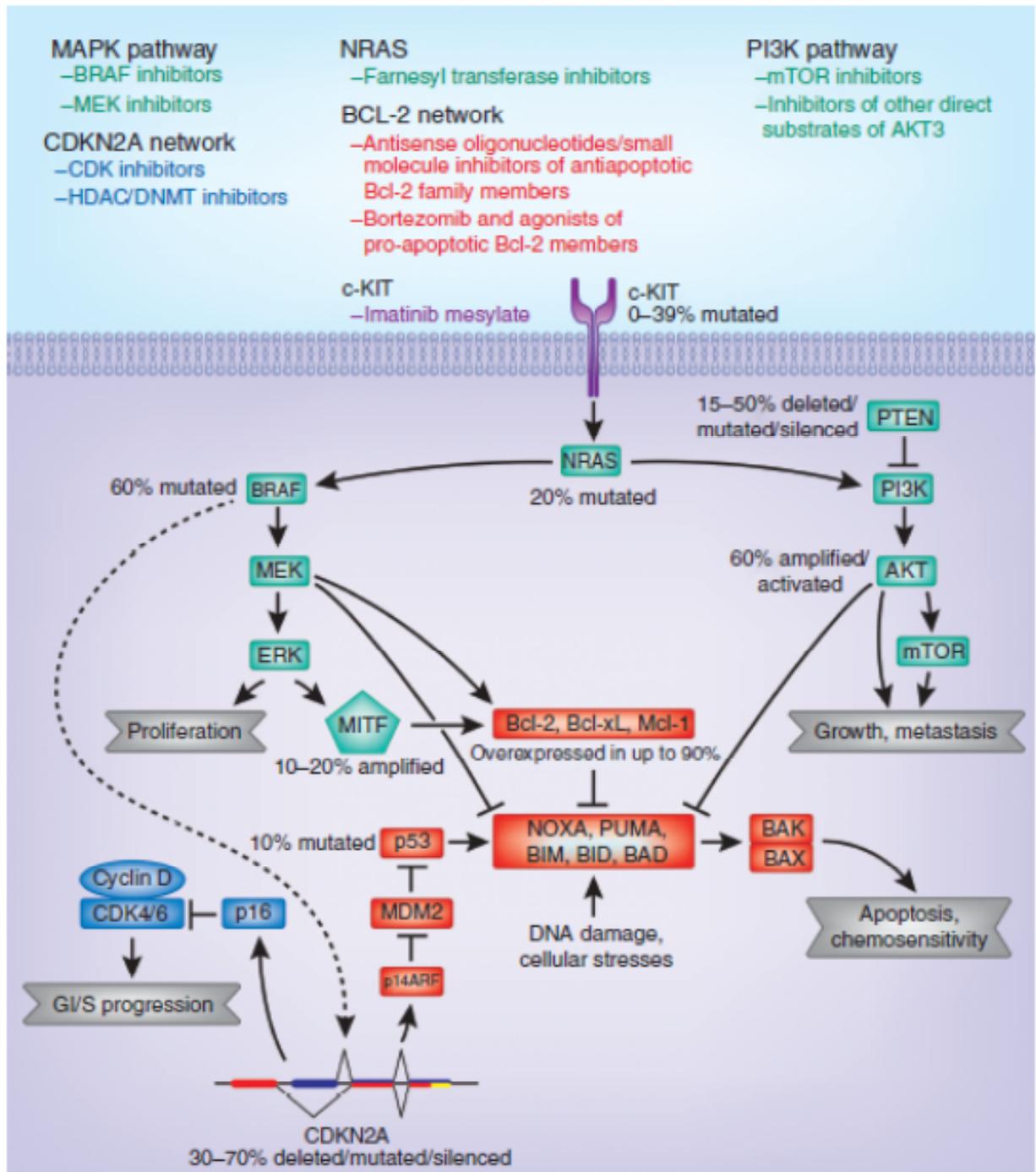
Esistono regolatori molecolari del ciclo cellulare, quali cicline, chinasi ciclina-dipendenti (CDKs) e inibitori del ciclo cellulare.

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

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

Il melanoma rappresenta una patologia complessa, nella quale intervengono presumibilmente sia mutazioni genetiche germinali che somatiche (figura 5).

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

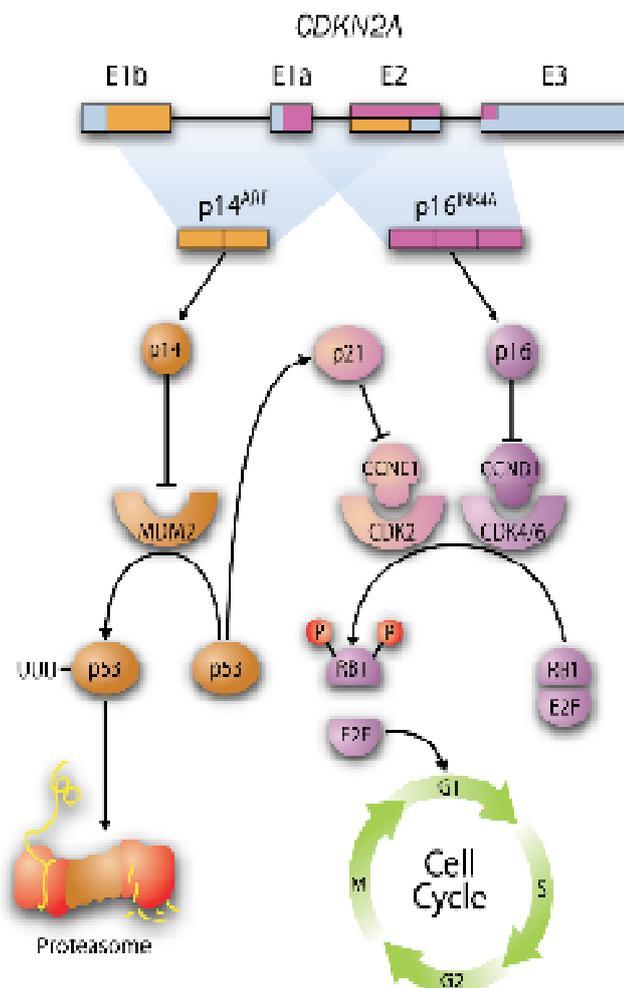


Mutazioni germinali nel melanoma

Nel melanoma familiare sono state riscontrate con elevata frequenza alterazioni del locus CDKN2A (figura 6), localizzato sul cromosoma 9p21 (26-28), il quale, a sua volta, controlla le proteine RB1 (retinoblastoma 1) e p53. Il locus CDKN2A presenta una struttura inusuale, poiché codifica per 2 proteine sovrapponibili ma ben distinte: p16^{INK4A} e p14^{ARF}; questo grazie all'utilizzo alternativo di due diversi esoni, che sono l'esone E1a per la proteina p16^{INK4A} e l'esone E1b per p14^{ARF} (29). Sebbene siano strutturalmente molto diverse, entrambe le proteine agiscono come regolatori negativi del ciclo cellulare: la p16^{INK4A} inibisce l'attivazione di CDK4 e CDK6 da parte della ciclina D1 (CCND1), prevenendo, in questo modo, la successiva fosforilazione di RB1; quest'ultimo, non fosforilato, sequestra il fattore di trascrizione E2F impedendogli, così, di indurre la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S. L'assenza di una proteina p16^{INK4A} funzionante, invece, comporta una iperfosforilazione di RB1, con conseguente rilascio di E2F e mancata inibizione della progressione del ciclo cellulare. La proteina p14^{ARF} regola l'attività della proteina p53 tramite l'inibizione di MDM2 (Murine Double Minute 2 Protein), una ubiquitin-ligasi in grado di avviare la proteina p53 alla degradazione attraverso proteosomi; livelli elevati di p14^{ARF} stabilizzano la p53, permettendo l'induzione della proteina p21^{WAF1/CIP1}, un inibitore del ciclo cellulare che blocca la fosforilazione di RB1 mediata dal complesso CDK2/ciclina E (CCNE1). In assenza di una p14^{ARF} funzionante, si verifica

un'incontrollata ubiquitinazione e degradazione di p53, il che comporta l'inibizione dell'induzione della proteina p21^{WAF1/CIP1}, la conseguente iperfosforilazione di RB1 e, in ultima analisi, la progressione del ciclo cellulare. Un'altra mutazione riscontrata con minor frequenza nei melanomi familiari riguarda il CDK4, localizzato sul cromosoma 12q14 (30-33).

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



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

Mutazioni somatiche del melanoma

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

Proliferazione cellulare

La via di trasduzione del segnale MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), altresì nota come via RAS/RAF/MEK/MAPK (figura 7), riveste un ruolo chiave nella proliferazione di molte neoplasie, incluso il melanoma (34).

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

sua volta, fosforila le isoforme di MAPK (anche nota come ERK), MAPK3 (anche chiamata ERK1) e MAPK1 (nota anche come ERK2) (29).

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

In caso di melanociti normali e nevi benigni, l'attivazione di queste vie è finemente regolata e, in assenza di ulteriori modificazioni oncogeniche, tipicamente conduce alla senescenza cellulare (35, 36).

Diverse alterazioni nella via MAPK, che ne determinano l'iperfosforilazione, rappresentano la base per la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule di melanoma in oltre il 90% dei casi (37).

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

Fino al 70% dei melanomi è caratterizzato da mutazioni di BRAF, mentre non si osservano mutazioni di ARAF e CRAF (38).

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

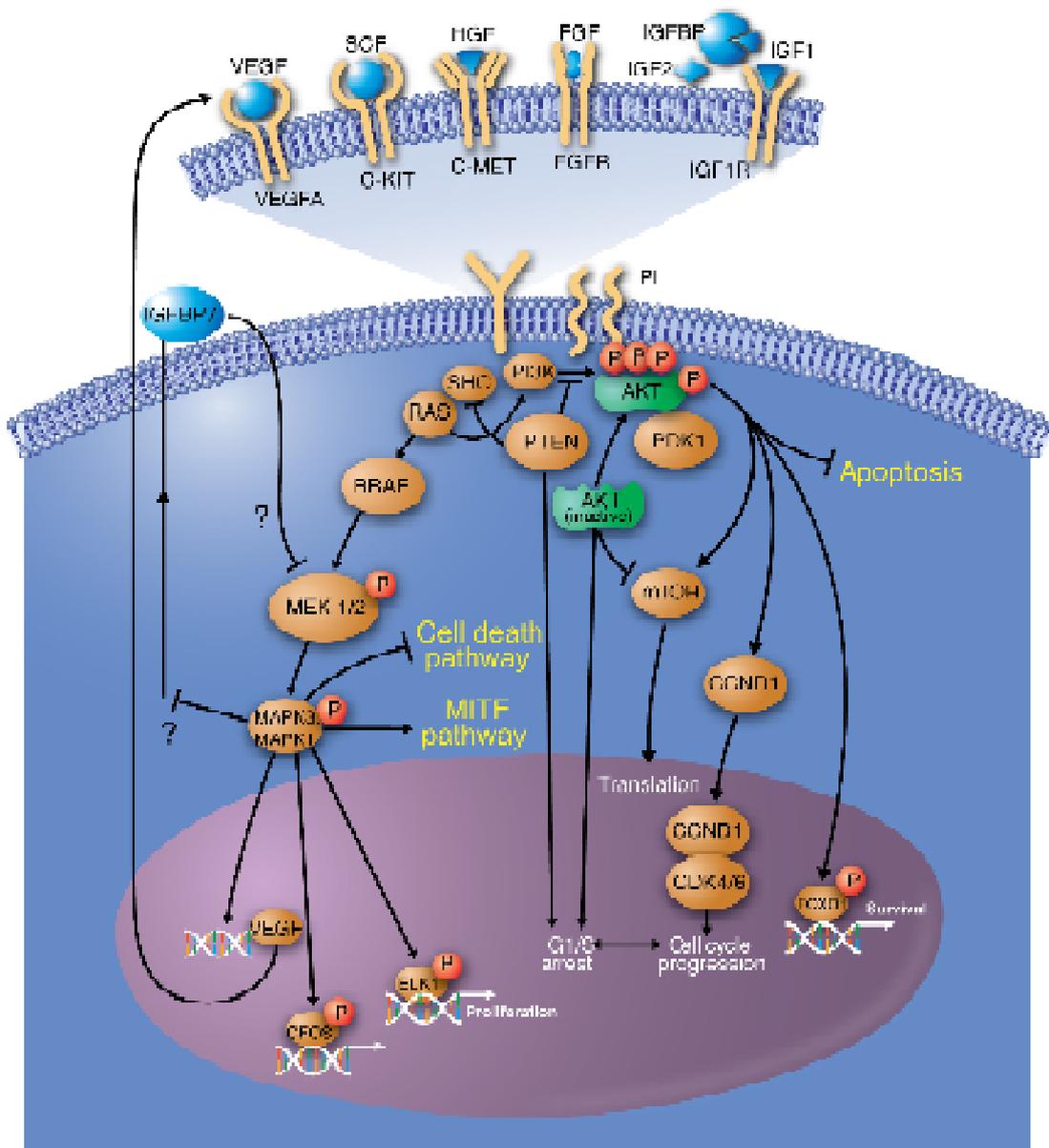
Sia nel melanoma che nei nevi la più frequente mutazione di BRAF consiste nella sostituzione di una valina con un glutammato in posizione 600 (V600E).

BRAF mutato è essenziale per la crescita del melanoma e stimola la proliferazione e la sopravvivenza MAPK-mediate (39).

Mutazioni sono anche frequenti in NRAS, che giustifica dal 15% al 30% dei casi di melanoma, mentre le mutazioni delle altre forme di RAS sono rare (38, 40-42).

Come le mutazioni attivanti di BRAF, NRAS mutato causa l'attivazione costitutiva della via MAPK. In assenza di inibitori del ciclo cellulare, come la proteina p16^{INK4A}, RAS può indurre la proliferazione del melanoma e giocherebbe un ruolo di primo piano nella sopravvivenza della neoplasia (40, 43).

Figura 7: Le vie MAPK e PI3K/AKT



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

Segnali di sopravvivenza

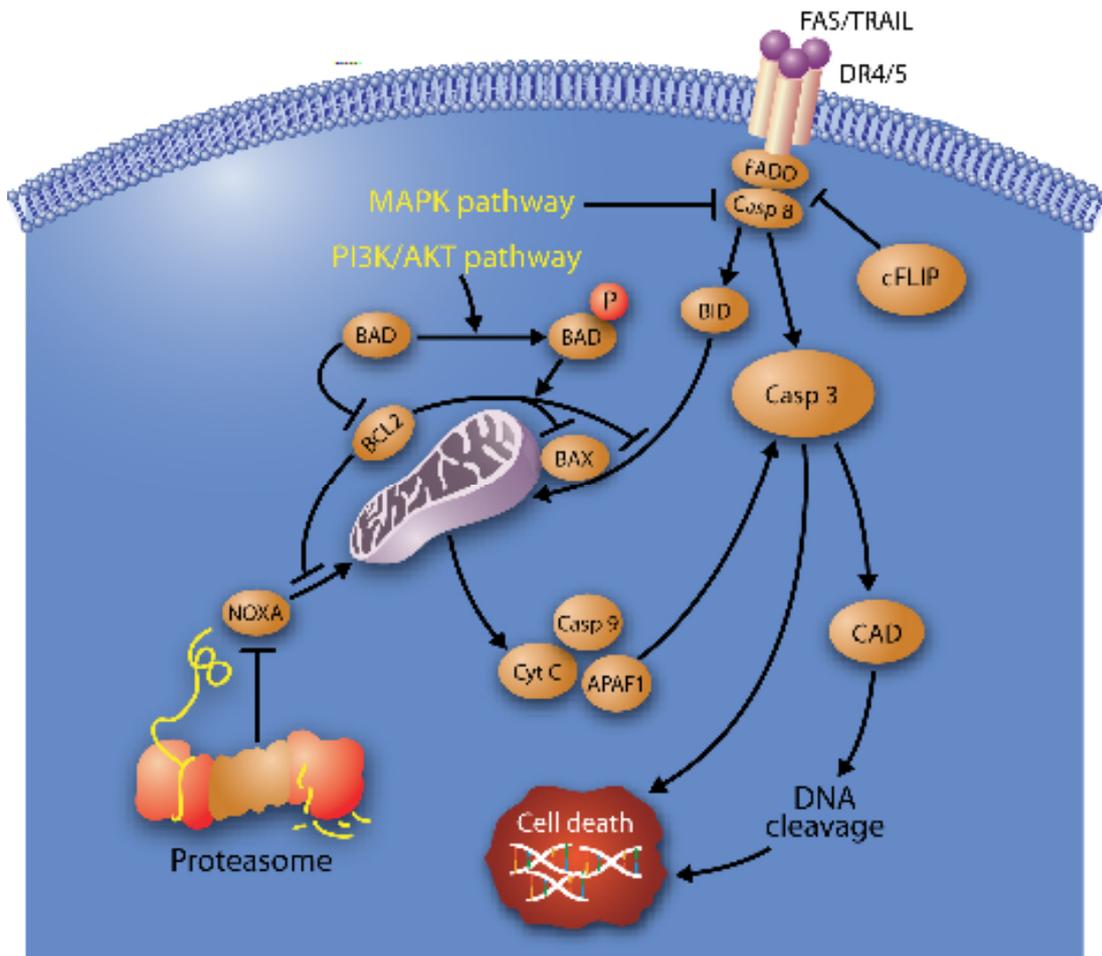
L'apoptosi rappresenta un processo fisiologico chiave nel mantenimento dell'omeostasi e della crescita tissutale. Due vie principali, quella intrinseca e quella estrinseca, convergono in più punti verso il risultato finale, rappresentato dall'apoptosi stessa (figura 8). Entrambe le vie sono influenzate da segnali di sopravvivenza aberranti, che sembrano essere implicati nella resistenza del melanoma alle terapie antitumorali convenzionali (44-46).

La via estrinseca è attivata dal legame di FAS o TRAIL ligando ai rispettivi recettori (DR4 o DR5); questo stimola a sua volta il reclutamento di FADD e l'attivazione della caspasi 8, che è regolata da cFLIP (noto anche come CFLAR) e da fattori di crescita attraverso la via MAPK. L'attivazione della caspasi 8 comporta il clivaggio della caspasi 3, che inizia processi proapoptotici multipli, inclusa la stimolazione del clivaggio del DNA (29).

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

Tuttavia, BAD defosforilato blocca BCL2 tramite eterodimerizzazione (BAD/BCL2), il che consente alle proteine proapoptotiche di formare dei pori nei mitocondri. Questo processo rilascia fattori apoptotici dallo spazio intermembranario mitocondriale, inclusi citocromo C (Cyt C), APAF1 e caspasi 9. Questi fattori formano il cosiddetto "apoptosoma", che stimola l'apoptosi attraverso il clivaggio della caspasi 3 (29).

Figura 8: Vie di apoptosi



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

Nel melanoma, i segnali di sopravvivenza che si realizzano attraverso PI3K/AKT antagonizzano la via intrinseca dell'apoptosi (47).

Attraverso le interazioni con i recettori attivati dei fattori di crescita, PI3K catalizza la produzione di fosfatidilinositolotrifosfato (PIP3) attraverso la fosforilazione di fosfatidilinositolo (PI), fosfatidilinositolo fosfato (PIP), e fosfatidilinositolo difosfato (PIP2) (48). Questo processo è antagonizzato dalla fosfatasi PTEN, che rimuove i gruppi fosfato.

Con la produzione di PIP3, AKT è trasferito alla membrana cellulare, dove è attivato da PDK1 (noto anche come PDK1); l'attivazione risultante di AKT prolunga la sopravvivenza cellulare attraverso l'inattivazione di BAD e l'attivazione del fattore di trascrizione FOXO1 (anche noto come FKHR), che comporta la sintesi di proteine antiapoptotiche (47, 49).

L'inattivazione di PTEN, che comporta un aumento dell'attività di AKT, sarebbe implicata in oltre il 20% dei melanomi al IV stadio (50).

Per quanto riguarda la via estrinseca, l'espressione dei recettori TRAIL-R1 e TRAIL-R2 (rispettivamente DR4 e DR5) potrebbe avere un ruolo nella progressione del melanoma metastatico. Sia DR4 che DR5 sono ridotti nel melanoma metastatico rispetto al melanoma primitivo e ai nevi (51).

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

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

Oltre a regolare l'attività di PI3K, la proteina PTEN gioca un ruolo fondamentale nella modulazione della via MAPK e nel blocco della progressione cellulare in G1/S attraverso l'overespressione dell'inibitore CDK, p27^{KIP1} (noto anche come CDKN1B) (49).

RAS può anche legare e attivare PI3K, aumentando l'attività di AKT. Questi dati suggeriscono che le mutazioni di PTEN e RAS siano ridondanti: infatti, la presenza contemporanea di mutazioni a carico sia di PTEN che di NRAS nelle stesse linee cellulari è rara (52).

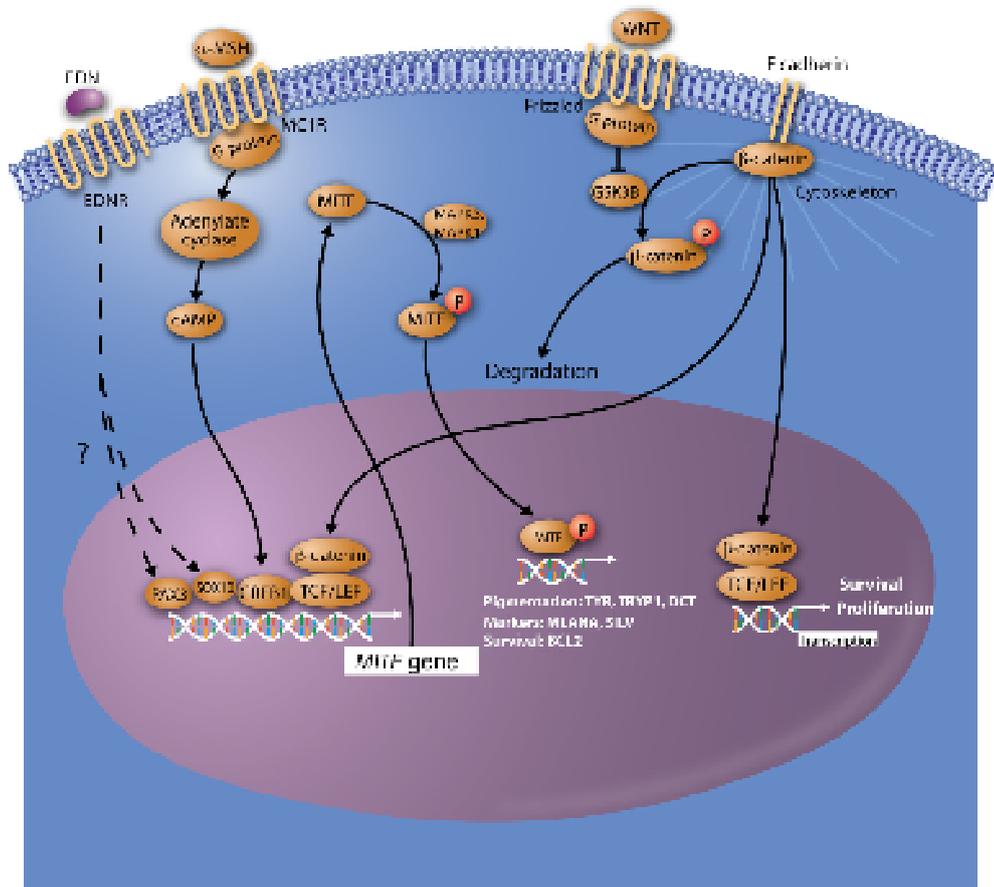
Alterazione di geni implicati nella differenziazione del melanocita

Uno tra i geni più importanti implicati nella differenziazione delle cellule melanocitarie è il MITF (53, 54).

La trascrizione di MITF è regolata da numerosi promotori, quali CREB1 e β catenina (figura 9). Il primo viene attivato a seguito della cascata di segnali avviata dal legame di α -MSH al proprio recettore; il secondo, invece, viene sovraespresso nelle cellule melanocitarie quando la sua via fisiologica di degradazione (tramite fosforilazione) viene inibita da eventi mutazionali (29).

La proteina MITF fosforilata è maggiormente attiva come fattore trascrizionale; fisiologicamente, agisce da promotore per numerose proteine proprie del melanocita, quali tirosinasi, Melan-A, MART-1 e HMB-45 (55), ma anche per proteine proapoptotiche come BCL-2 (56). La fosforilazione di MITF è fisiologicamente controllata dalla via MAPK che, come già detto, è iperattivata nelle cellule di melanoma (29).

Figura 9: La via di MITF



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

Invasione e adesione cellulare

La morbilità e mortalità del melanoma sono una diretta conseguenza dell'invasione locale e della diffusione metastatica. Nei melanociti, le caderine di superficie sono state ben studiate come diretti mediatori di adesione cellulare e come componenti delle vie di segnale che influenzano la differenziazione (29).

Il dominio extracellulare delle caderine si lega ad altre caderine presenti sulla superficie di altri tipi cellulari e le alterazioni nell'espressione delle caderine influenzano l'interazione delle cellule con l'ambiente circostante. In particolare, l'espressione delle E-caderine nei melanociti media la loro associazione con i cheratinociti, prevenendo la proliferazione dei melanociti stessi e mantenendo la differenziazione melanocitaria attraverso diversi segnali (57).

La progressione dalla fase di crescita radiale a quella di crescita verticale del melanoma è caratterizzata dalla perdita di E-caderine, con conseguente rottura dell'interazione melanocita-cheratinocita e aumento dell'espressione delle N-caderine; una riduzione dell'espressione delle E-caderine aumenta la disponibilità intracellulare della β -catenina che, a sua volta, incrementa l'espressione di geni come MITF (58-60).

Attivazione dei recettori per i fattori di crescita

La trasduzione del segnale attraverso le vie RAS/RAF/MEK/MAPK e PI3K/AKT è innescata attraverso l'attivazione dei recettori dei fattori di crescita stimolati dai rispettivi ligandi. Sebbene fisiologicamente altamente regolate, queste proteine possono essere disregolate da diversi meccanismi nel melanoma.

La stimolazione di fattori come C-MET (anche noto come MET), recettore per il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) e, soprattutto, l'IGF1 costituisce un importante stimolo attraverso cui entrambe le vie (RAS/RAF/MEK/MAPK e PI3K/AKT) possono essere attivate senza mutazioni di RAS o RAF (29).

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

La perdita di espressione di IGF1R, utilizzando small interfering RNA, conduce all'apoptosi delle cellule di melanoma, sia wild type che con mutazioni di RAS o RAF (61).

La tabella 1 riassume le principali mutazioni genetiche nel melanoma cutaneo.

Tabella 1: Mutazioni genetiche nel melanoma cutaneo

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

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

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

IL SISTEMA DEI FATTORI DI CRESCITA INSULINO-SIMILE

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

Gli studi condotti con topi *knockout* (KO), in cui sono stati disattivati selettivamente alcuni geni specifici (IGF, IGFR, BP) confermano l'importante ruolo di questi fattori nella crescita, nella differenziazione e nella sopravvivenza cellulare (62-63).

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

IGF-1 è un peptide di 70 amminoacidi (765 kDa) importante per la normale crescita durante la vita postnatale, nonché per lo sviluppo e la differenziazione di molti organi e sistemi (64).

IGF-2 è un peptide di 67 amminoacidi (747 kDa) che riveste un ruolo particolarmente significativo nello sviluppo ed è espresso in elevate quantità nei tessuti fetali (65-68); alcuni studi suggeriscono che IGF-2 potrebbe controllare la crescita fetale regolando la sintesi di glicogeno, giocando, così, un ruolo di primo piano nel passaggio dalla vita fetale a quella postnatale.

Nel sistema degli IGFs rientrano, inoltre, altri fattori: due recettori cellulari di membrana, IGF1R e IGF2R, nonché 7 proteine di legame, le IGF binding proteins 1-7 (IGFBP 1-7) (69). Studi recenti hanno, inoltre, aggiunto nuovi membri alla famiglia degli IGF: il recettore correlato al recettore per l'insulina

(insulin-receptor-related receptor, IRR), varie proteine correlate alle IGFBPs (IGFBP-rP) e diverse proteasi di IGFBP (64).

Le localizzazioni geniche di IGF-1 e IGF-2 si trovano rispettivamente sul cromosoma 12 e 11, 1.4 kb a valle del gene dell'insulina. Il gene di IGF-1 ha due promotori, mentre IGF-2 ne ha quattro (P1-P4) (70). L'utilizzo alternativo dei promotori e lo splicing della regione in 5' non tradotta che origina esoni comuni codificanti, determinano la produzione di trascritti comuni. Sono stati descritti numerosi elementi cis (siti di legame al DNA per i fattori transregolatori) e fattori trascrizionali (TF) che regolano il promotore P3. Nel segmento prossimale al promotore P3 sono presenti elementi cis e potenziali TF coinvolti nella regolazione dell'attività dello stesso (71). La trascrizione di IGF-2 ha inizio dal promotore P1 nel tessuto adulto, mentre nel tessuto fetale comincia dai promotori P3-P4 e incrementa nei tessuti neoplastici.

Una volta prodotti, gli IGFs vengono liberati in circolo, dove si legano alle IGFBPs, le quali ne modulano l'attività: solo l'1-2% degli IGFs circola in forma libera, mentre approssimativamente il 20% è legato alle proteine IGFBP-1, IGFBP-2 o IGFBP-4, che li trasportano ai loro target cellulari. L'80% è associato a IGFBP-3, che risulta glicosilata nella porzione N-terminale (72), e previene l'azione dei recettori per IGF nell'indirizzare la cellula verso la proliferazione e sopravvivenza (73).

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

producono (autocrino) o siano tessuti differenti (paracrino se gli IGFs raggiungono tali tessuti attraverso il liquido extracellulare, endocrino se li raggiungono tramite trasporto ematico) (71).

La maggior parte dei tessuti adulti non esprime IGF-2 e la forma prevalente in circolo durante l'età adulta è rappresentata da IGF-1 (74): l'IGF-1 circolante e la sua principale proteina di trasporto, l'IGFBP-3, sono significativamente correlati alla secrezione di ormone somatotropo (GH) (75) e vengono utilizzati anche come marker dello stato del GH in caso di anomalie della crescita (76-78).

I recettori degli IGFs e le vie di segnalazione

Gli IGFs svolgono la propria azione legandosi a specifici recettori della superficie cellulare. Sono noti 3 recettori diversi: IGF1R, IGF2R e il recettore dell'insulina (IR). IGF1R è il recettore che media maggiormente l'effetto degli IGFs (79).

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

IGF2R è un monomero costituito da una singola catena polipeptidica con un'unità extracellulare ripetitiva (79), molto simile, dal punto di vista strutturale, al recettore del mannosio 6-fosfato (80).

IGF2R lega con maggiore affinità IGF-2 rispetto a IGF-1; lega anche proteine contenenti il mannosio-6 fosfato, mentre non ha alcuna affinità per l'insulina. Questo recettore è associato con l'internalizzazione e la degradazione lisosomiale dei ligandi (79). I domini tirosin-chinasici dell'IGF1R e dell'IR mostrano omologia di sequenza più elevata se paragonata a quella che si osserva nella regione ricca di cisteina della subunità α e nel dominio C-terminale. Le differenze presenti in α determinano l'affinità dell'IGF1R e dell'IR per l'IGF o per l'insulina, mentre quelle nella subunità β determinano una divergenza delle vie di segnalazione, che culminano negli effetti mitogeni ed antiapoptotici, tramite l'IGF1R, ed in quelli metabolici tramite l'IR.

L'espressione di IGF-1R è regolata dagli ormoni steroidei e dai fattori di crescita. Inoltre, questa può essere controllata negativamente dalle IGFs, inibita dai soppressori tumorali, quali la proteina p53 e WT1 (la proteina del tumore di Wilms). I meccanismi molecolari che permettono l'espressione di IGF2R non sono ben noti, sebbene alcuni studi sostengano l'ipotesi di una regolazione positiva da parte dell'insulina e degli IGFs (80).

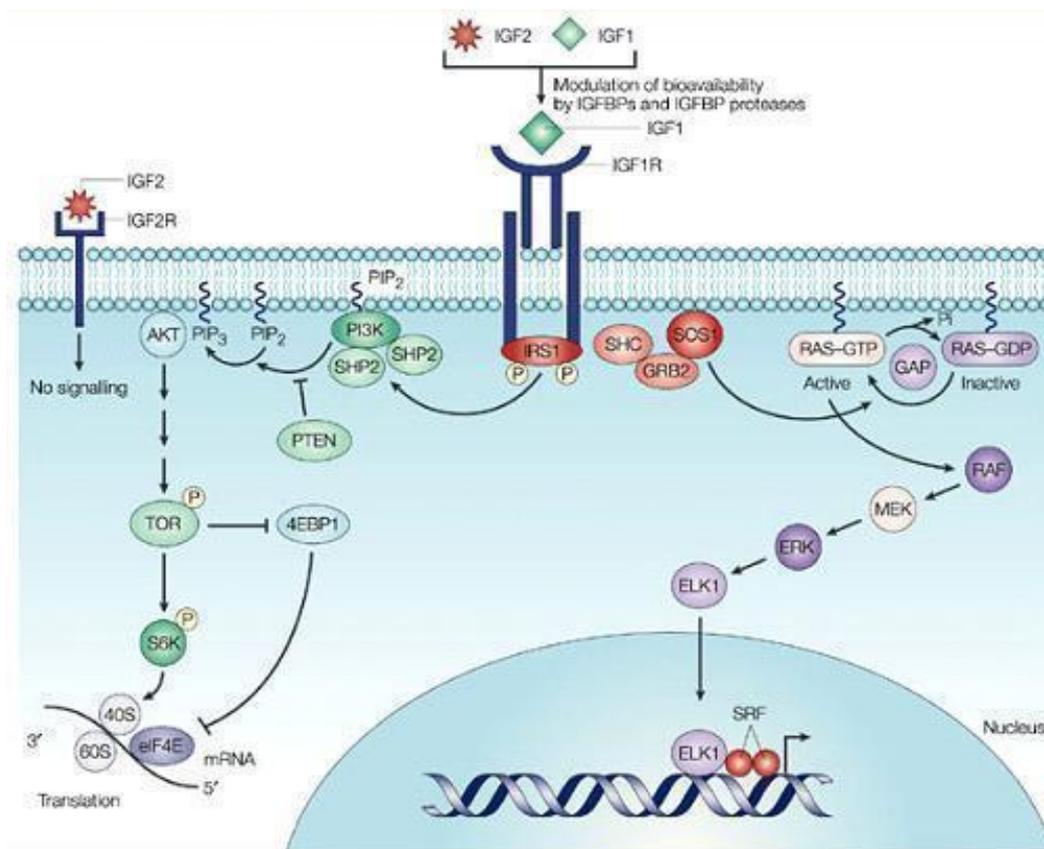
Il legame degli IGFs al recettore IGF1R può attivare diverse vie di trasduzione del segnale, tra le quali due sono le meglio caratterizzate (figura 10). Un percorso attiva le proteine Ras, Raf e la proteina chinasi mitogena, raggiungendo

il nucleo cellulare dove viene stimolata la trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare (81).

Un altro percorso è mediato dall'attivazione della fosfoinositolo-3-chinasi che attraverso le chinasi AKT e TOR porta alla stimolazione della sintesi proteica, con effetti mitogenici e antiapoptotici. Al contrario, il legame di IGF-2 al recettore IGF2R non produce eventi di signaling, ma induce la degradazione di IGF-2 stesso, riducendone così la funzionalità. Per tale ragione, IGF2R è considerato un soppressore tumorale (70).

Il ruolo di IGF1R nella trasformazione maligna è ben documentato ed è stato ridiscusso da diversi Autori (81).

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



L'IGF1R è overespresso in diverse linee cellulari tumorali (82-84): un disordine a carico del gene per IGF1R, che sopprime l'espressione di IGF1R e ne inibisce, così, le funzioni, può abolire la trasformazione cellulare (85); infatti, le linee cellulari di fibroblasti derivanti da embrioni di topo in cui il gene per IGF1R è danneggiato, non possono essere trasformate da oncogeni (86-88).

La capacità di IGF1R di promuovere la crescita e di mantenere la trasformazione cellulare è il risultato della sua potente attività antiapoptotica. Queste caratteristiche sono state dimostrate in diversi sistemi (89-91). Il numero dei recettori IGF1Rs sulla superficie cellulare è il fattore più importante nel determinare la sopravvivenza cellulare (92). La via del segnale di IGF1R può indurre diversi effetti, inclusa differenziazione, trasformazione e prevenzione dell'apoptosi. I fattori che possono influenzare questi effetti non sono ancora ben noti, ma il recettore 1 per l'insulina (insulin receptor substrate 1, IRS1) sembra essere coinvolto; in assenza di IRS1, l'IGF1R trasmette un segnale che promuove la differenziazione. Al contrario, quando IRS1 è espresso, il segnale è mitogenico ed antiapoptotico (92).

In seguito all'autofosforilazione ed all'attivazione dell'IGF1R, vengono fosforilati vari substrati intracellulari, fra cui IRS-1, IRS-2, Shc e Grb10 (93). IRS-1 interagisce a sua volta con proteine di adesione, integrine, antigeni T e media il legame della subunità p85 della fosfatidilinositolo 3-chinasi (P13-K) al complesso dell'IGF1R, determinando la stimolazione della via Akt/proteina chinasi B e la disattivazione delle vie apoptotiche (93-95).

In risposta all'interazione con il ligando di IGF1R, vengono inoltre attivate Raf, Ras e le MAP chinasi, e la specifica stimolazione delle diverse vie determina i differenti effetti degli IGF sulle cellule bersaglio (93-96). Quindi, i due principali substrati, IRS e Shc, mediano molti degli effetti di crescita e differenziazione degli IGF tramite l'IGF1R, attivando vari effettori a valle.

La diversa disponibilità di substrati interagenti può determinare l'effetto biologico finale dell'attivazione dell'IGF1R: qualora predomini IRS-1, le cellule tendono a proliferare e a trasformarsi; in caso di predominanza di Shc (Src-homology-2 and collagen homology domain protein), le cellule tendono a differenziarsi (97).

Diversi studi (94-96) sostengono che, in risposta all'attivazione dell'IGF1R, vengano attivate più vie di segnalazione che culminano nella protezione della cellula dall'apoptosi.

La principale via di segnalazione che determina la protezione dall'apoptosi si ritiene mediata dalla P-13 chinasi, seguita dall'attivazione della Aky/proteina chinasi B, culminante nella fosforilazione di BAD (membro della famiglia BCL-2 che forma un dimero con BCL-2 determinandone l'inattivazione) (94-96). La fosforilazione di BAD inattiva questa proteina neutralizzante, quindi BCL-XL e BCL-2 si rendono disponibili per inibire l'apoptosi.

Sono state descritte almeno altre due vie, fra cui l'attivazione della via delle MAP chinasi e la traslocazione mitocondriale di Raf, che culminano entrambe nella fosforilazione di BAD (95): l'attivazione di più vie di segnalazione tramite

l'IGF1R, che convergono tutte nella fosforilazione della proteina BAD, conferisce quindi a questo recettore un potente ruolo antiapoptotico.

L'inibizione dell'espressione del recettore Fas (98) e/o la riduzione dei livelli di ossido nitrico in risposta all'IGF1 (98-100) sono altri meccanismi che mediano gli effetti anti-apoptotici dell'IGF1R.

Mentre le vie che mediano gli effetti proliferativi e quelli differenziativi sono chiaramente separate, altrettanto non si può dire per ciò che riguarda le vie che mediano gli effetti proliferativi e antiapoptotici. Tuttavia, studi recenti suggeriscono che i domini dell'IGF1R che mediano gli effetti anti-apoptotici siano distinti da quelli che attivano la proliferazione (100); la PI3-k potrebbe mediare principalmente gli effetti antiapoptotici, mentre le MAPK quelli proliferativi.

I dati presenti in letteratura indicano inoltre che l'asse IGF/IGF1R non solo media gli effetti mitogeni degli IGF, ma anche di numerosi altri oncogeni e fattori di crescita, fra cui il proto-oncogene c-myc (101), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita dell'epidermide (EGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF) (102-103), l'ormone somatotropo (GH), gli ormoni estrogeni (104) e l'oncogene virale SV40-antigene T (105).

Quindi, si sta evolvendo il concetto che gli IGF, tramite l'IGF1R, svolgano il ruolo di fattore di crescita capace di mediare gli effetti mitogeni di numerosi fattori di crescita ed oncogeni, e che potrebbero di conseguenza essere necessari per sostenere la progressione del ciclo cellulare di quasi tutte le cellule, normali

e neoplastiche, oltre ad essere critici per la trasformazione delle cellule tramite oncogenesi virale o cellulare (106).

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

Le IGF-binding proteins

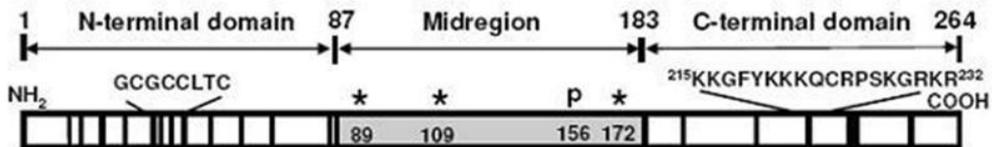
Sono state finora identificate sette IGFBPs (indicate con numero arabo da IGFBP-1 a IGFBP-7), con una struttura proteica ben conservata (figura 11).

I domini C-terminale ed N-terminale contengono diversi residui di cisteina capaci di interagire per formare ponti disolfuro. La regione centrale è variabile.

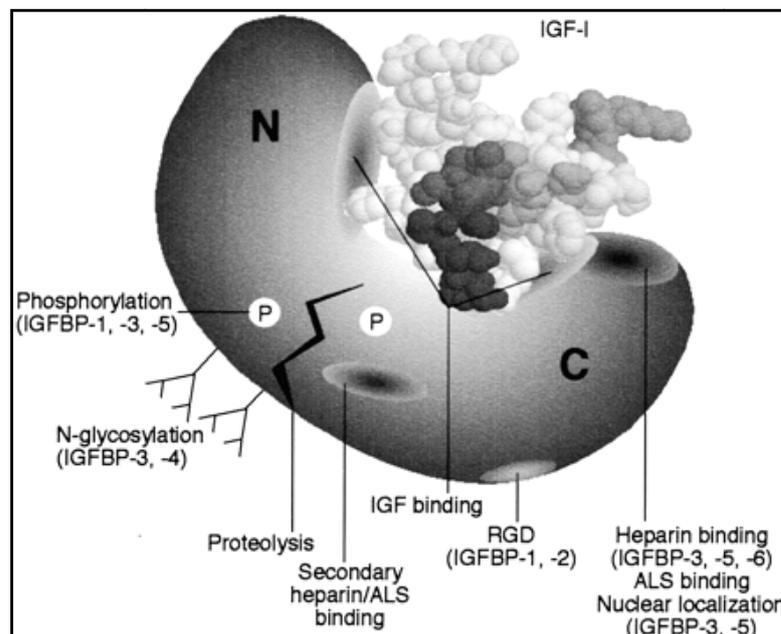
Nella regione C-terminale di diverse IGFBPs (IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5) si trovano motivi di legame per l'eparina, che mediano l'interazione con i proteoglicani nella matrice cellulare o con la superficie cellulare. Ad esempio, tali motivi sono fondamentali per aumentare l'affinità di legame tra l'IGFBP-3 e la superficie cellulare e diminuire quella con l'IGF, che viene rilasciato in circolo. Inoltre, alcuni residui nella regione C-terminale sono importanti per la stabilità del complesso IGF-IGFBPs, poiché ne incrementano l'affinità di legame. La regione N-terminale, ben conservata nelle IGFBPs, contiene il sito primario per l'interazione con le IGFs. Altri motivi strutturali nelle IGFBPs includono una sequenza Arg-Gly-Asp (RGD) nella regione C-terminale

(IGFBP-1 e IGFBP-2), importante per il legame con l'integrina e per l'associazione cellulare (92).

Figura 11: struttura IGFBPs (Endocrine Reviews, 2009)



- | | | |
|---|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> *Similarità strutturale tra le sei IGFBPs- 58% *Regioni ricche di cisteine (12 Cs) *Motivo IGFBP- GCGCCXXC *Subdomini non caratterizzati (20,21) *Sito principale di legame per IGF | <ul style="list-style-type: none"> * Regione centrale altamente variabile- la similarità è solo del 15% con le altre IGFBPs *Modificazioni post-traduzionali (glicosilazione *; fosforilazione p) *Associazione dell'IGFBP-3 alla superficie cellulare mediata dal suo recettore *Siti proteolitici per differenti proteasi delle IGFBPs sono stati trovati in questa regione | <ul style="list-style-type: none"> -Similarità strutturale tra le sei IGFBPs- 34% -Regione ricche di cisteine (6Cs) -*Residui di legame per l'IGF -Motivo di 18 residui basici che legano l'eparina, altri glicosaminoglicani, proteoglicani, fibrinogeno, fibrina -Regione di legame per la subunità acido labile (ALS) e la transferrina - Sequenza di localizzazione nucleare |
|---|--|--|



Una volta tradotte, le IGFbps possono subire modificazioni che accrescono l'affinità per gli IGFs, la maggior parte delle quali interessano la regione centrale variabile. Fosforilazione, proteolisi e glicosilazione sono le diverse modificazioni che possono coinvolgere tali proteine. Ad esempio, IGFbp-3 può subire fosforilazione sul residuo della Ser156 (107). Inoltre, IGFbp-3, IGFbp-4, IGFbp-5 e IGFbp-6 possono essere glicosilate: N-glicosilazioni (residui di Asp) sono state trovate nelle prime due, mentre O-glicosilazioni (residui di Ser e Thr) sono state riscontrate nelle ultime. IGFbp-3, ad esempio, contiene tre siti di N-glicosilazione (Asp89, Asp109, Asp172); questa proteina è presente nel siero in forma quasi esclusivamente glicosilata. La glicosilazione non modifica l'interazione con IGFs ma può influenzare l'associazione con la superficie cellulare (108).

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

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

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

conseguenza la proliferazione cellulare. Tuttavia, le IGFBPs (in particolare IGFBP-3) possono agire anche attraverso un meccanismo IGF-indipendente, legandosi, come proteine secretorie, ai recettori sulla superficie cellulare per attivare i pathway di trasduzione del segnale, essere internalizzate o indurre l'apoptosi (109).

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

IGFBP-3

IGFBP-3 è un peptide di 264 aminoacidi, codificato da un gene di 8,9 kb che comprende cinque esoni, uno dei quali contenente esclusivamente sequenze 3' UTR, mentre gli altri quattro hanno il loro omologo nelle altre IGFBPs. Il gene per IGFBP-3 è espresso in un vasto numero di tessuti come un singolo mRNA di 2,6 kb. La relativa abbondanza del mRNA per IGFBP-3 nel fegato è in accordo con l'ipotesi che la sintesi epatica sia la fonte principale dell'IGFBP-3 circolante (80). In circolo molti IGFs formano un complesso ternario (150 kDa) con

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

L'azione dell'IGFBP-3 risiede nella capacità di formare un complesso con IGF-1 o IGF-2, impedendone il legame con IGF-R e inibendo la proliferazione e la sopravvivenza cellulare (109). Quando IGFBP-3 interagisce con la superficie cellulare è capace di regolare l'azione degli IGFs.

Come già accennato, diverse evidenze dimostrerebbero che, oltre al suo ruolo di modulazione delle funzioni di IGF e alle attività IGF-dipendenti, IGFBP-3 avrebbe un'attività antiproliferativa diretta, il che ne rifletterebbe una capacità intrinseca (111) o un'attività probabilmente mediata dal legame a specifici recettori di superficie cellulare (112-114).

Alcuni Autori hanno dimostrato l'effetto antiproliferativo *in vitro* di IGFBP-3 su fibroblasti nei quali era stato precedentemente alterato l'IGFR1, dimostrando ulteriormente l'indipendenza di questa risposta da IGF (115).

A supporto dell'ipotesi del ruolo di inibitore della crescita di IGFBP-3, è stato dimostrato che l'espressione dei geni per IGFBP-3 (116, 117) è indotta da altri fattori antiproliferativi, come TGF β (118), acido retinoico (119), tumour necrosis factor- α (120), antiestrogeni (121), p53 (122) e analoghi della vitamina D (123); inoltre, anche alcune citochine, come l'interleuchina 1 o 6, sono capaci di elevare i livelli di IGFBP-3 (122).

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

Evidenze sempre crescenti suggeriscono che gli effetti antiproliferativi di IGFBP-3 possano essere mediati attraverso l'induzione dell'apoptosi. A supporto di questa ipotesi esistono sia studi in vivo che in vitro. Sia IGF-1 che IGF-2 sono noti come fattori di sopravvivenza per numerose specie cellulari e proteggono le cellule da differenti stimoli apoptotici attraverso vie di sopravvivenza cellulare mediate da IGF1R (124). Inoltre, la riduzione quantitativa di IGF1R può portare ad apoptosi, mentre un'overespressione di IGF1R può proteggere dall'apoptosi in vivo (125). Dunque, il sequestro degli IGFs da parte di IGFBP-3 e la conseguente impossibilità di interazione con IGFRI sembra inibire l'induzione dell'apoptosi.

La più forte evidenza della funzione proapoptotica diretta IGF indipendente di IGFBP-3 proviene dagli studi di Rajah *et al*, i quali hanno dimostrato un'induzione dose-dipendente dell'apoptosi in risposta all'aggiunta di IGFBP-3 (50ng/ml–500ng/ml) ricombinante nelle cellule di carcinoma prostatico PC-3. Questo effetto veniva solo parzialmente inibito dall'aggiunta di IGF e non veniva eliminato in presenza di analoghi dell'IGF che non legano le IGFBPs, suggerendo che quest'effetto sia IGF indipendente (126).

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

sintesi del DNA. Le cellule epiteliali di mammifero MCF-10, se trasfettate con un oncogene H-ras, diventano refrattarie all'azione inibitoria di IGFBP-3, sebbene le stesse cellule, ma *wild-type*, siano inibite da concentrazioni di IGFBP-3 inferiori a 10ng/ml (127).

IGFBP3: un mediatore di apoptosi

La proliferazione cellulare si ottiene dal bilanciamento tra divisione e morte cellulare. La proteina IGFBP-3 può modulare l'apoptosi: una via attraverso la quale si può verificare questa funzione è il sequestro degli IGFs e il conseguente blocco della loro attività antiapoptotica (128). Tuttavia, effetti apoptotici di IGFBP-3 sono stati riportati anche in cellule prive del recettore per IGF di tipo 1 (126) e in condizioni in cui l'IGF-1 non potesse esprimere un effetto di sopravvivenza (129), sottolineando l'esistenza di una via d'azione IGF indipendente per IGFBP-3.

La capacità antiproliferativa di IGFBP-3 è stata valutata da diversi Autori. Una delle più importanti proteine umane di soppressione, p53, capace di mediare l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi, è in grado di indurre il gene di IGFBP3 attivandone l'espressione in risposta al danno al DNA da radiazioni ionizzanti (130-133). Tuttavia, IGFBP-3 sembra in grado di indurre apoptosi anche attraverso vie p53 indipendenti, dal momento che risulta attiva anche in linee cellulari p53 negative (126, 133).

Le proteasi che agiscono sulle IGFBPs

In varie condizioni, fisiologiche e patologiche, le IGFBPs possono essere modificate mediante tagli proteolitici operati da diversi enzimi. La regolazione della proteolisi delle IGFBPs è complessa e variabile in base alle diverse condizioni fisiologiche (70). Ad esempio, l'antigene prostata-specifico (PSA), una serin-proteasi, è in grado di tagliare IGFBP-3 e IGFBP-5; un'altra serin-proteasi, il fattore di crescita γ del nervo (che presenta il 65% di omologia con il PSA) proteolizza sia l'IGFBP-4 che IGFBP-6; le catepsine D, G ed L sono proteasi lisosomiali acide in grado di proteolizzare tutte le IGFBPs; le metalloproteasi della matrice, inclusa la collagenasi interstiziale, la gelatinasi A, la stromelisina 1, la tripsina e la gelatinasi B sono coinvolte nelle proteolisi dell'IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4 e IGFBP-5. Il ruolo di proteolisi è svolto anche da plasmina, trombina e dalla proteina A plasmatica in gravidanza.

Gli IGFs modulano l'attività proteolitica verso le IGFBPs, suggerendo la presenza di un loop autocrino regolatorio che controlla le proteasi delle IGFBPs. L'insulina e gli estrogeni, ma non il GH, inoltre, influenzano le proteasi delle IGFBPs (70).

La proteolisi dell'IGFBP-3 si osserva in diversi fluidi biologici, quali quello peritoneale, follicolare, seminale, amniotico e cerebrospinale (134). IGFBP-3 presenta diversi siti di taglio nella porzione N-terminale della regione conservata e nel dominio variabile (centrale) (72).

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

Il frammento più grande ha un peso molecolare di 30 kDa in forma glicosilata e di 22 kDa in forma non glicosilata ed ha un'affinità per gli IGF molto minore rispetto alla proteina intatta. Il frammento più piccolo misura 20 kDa in forma glicosilata e 16 kDa in forma non glicosilata e non lega gli IGFs (109). Pertanto, la proteolisi specifica di IGFBP-3 rappresenta un meccanismo di regolazione per il rilascio delle IGFs e la sua maggiore disponibilità per i tessuti. Inoltre, il frammento N-terminale 1-95, media l'abilità dell'IGFBP-3 nativa nell'indurre l'apoptosi attraverso il meccanismo IGF-indipendente (109).

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

Dunque, la proteolisi dell'IGFBP-3 è in accordo con le sue differenti funzioni: la forma intatta trasporta e limita la disponibilità degli IGFs, la proteolisi ne riduce l'affinità rilasciando gli IGFs liberi di interagire con i recettori. Quando l'attività delle proteasi o la loro concentrazione è alta, il frammento maggiore (IGFBP-3¹⁻¹⁶⁰) subisce un ulteriore taglio formando un frammento secondario (IGFBP-3¹⁻⁹⁵) che inibisce la crescita cellulare (70).

Il complesso ternario

L'80% circa degli IGFs circola sottoforma di complesso ternario (150 kDa) che contiene IGF-1/2, IGFBP-3/5 e la subunità acido labile (ALS, 85 kDa). Il complesso non è capace di attraversare l'endotelio capillare. Tuttavia, IGFBP-3 è più abbondante di IGFBP-5 perciò la maggior parte dell'IGF è legato a IGFBP-3. La percentuale rimanente delle IGFs in circolo forma un complesso binario di circa 50 kDa con altre IGFBPs. L'ormone della crescita regola l'espressione di IGFBP-3, IGF-1 e ALS. Il complesso ternario ha almeno due funzioni principali. In primo luogo, esso limita l'accesso dell'IGF circolante ai fluidi extracellulari e quindi ai vari tessuti (134). In secondo luogo stabilizza gli IGFs, accrescendone l'emivita (approssimativamente di 10 minuti in forma libera e di 12-15 h in forma complessata) e assicurando così una riserva di IGF in circolo.

L'mRNA dell'IGFBP-3 è localizzato soprattutto nell'endotelio epatico, mentre l'mRNA di ALS è espresso esclusivamente negli epatociti: ciò è a supporto dell'ipotesi che la formazione del complesso ternario può avvenire solo in circolo e non nell'ambiente extracellulare epatico (80).

GLI IGF E IL CANCRO

IGF-1 e IGF-2 sono dotati di eguale efficacia come agenti mitogeni, mostrando solo lievi differenze di potenzialità (68, 71, 135): è stato, infatti, evidenziato un importante ruolo degli IGFs nell'innescare e nella proliferazione delle cellule tumorali (71, 136, 137).

Alcuni dati dimostrerebbero una forte associazione tra elevati livelli circolanti di IGF-1 e il rischio di sviluppo di tumore mammario nella donna (138) e di tumore della prostata nell'uomo (139). Diversi studi rafforzano l'ipotesi che IGF-1 sia un mediatore essenziale degli effetti mitogeni degli estrogeni, con un ruolo critico nella progressione in G2 del ciclo cellulare (140): IGF-1 induce una regolarizzazione positiva dell'attività mitogena degli estrogeni e questi ultimi inducono un aumento dell'IGF-1 mediando l'espressione dei recettori di tipo 1 per IGF-1 e delle molecole di segnale a valle, IRS 1 (substrato 1 del recettore dell'insulina) e IRS 2 (substrato 2 del recettore dell'insulina) (141).

Oltre all'IGF-1 circolante, l'espressione autocrina degli IGF, in particolare di IGF-2, svolge un ruolo di primo piano nel conferire un vantaggio di accrescimento a molte cellule tumorali (71, 136, 137).

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

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

Ruolo dell'IGF2R nella tumorigenesi

L'IGF2R interagisce con diversi ligandi, fra cui l'IGF-2 e numerose proteine contenenti residui di mannosio-6 fosfato (M-6-P) nelle loro catene laterali glucidiche, come gli enzimi lisosomiali, il precursore del fattore di crescita trasformante- β (TGF- β) e la prolifina; il recettore è stato quindi denominato M-6-P/IGF2R, e ne è stata dimostrata la capacità di legare anche l'acido retinoico (RA); l'IGF2R lega l'IGF-2 con un'affinità superiore di 100 volte rispetto all'IGF-1, e non lega l'insulina (142).

L'IGF2R è progettato per regolare i segnali di crescita in gran parte delle cellule epiteliali tramite il legame dell'IGF-2, che determina la sua internalizzazione e degradazione; tramite endocitosi delle proteasi lisosomiali, come le catepsine D, B ed L, attraverso la riduzione della concentrazione di enzimi proteolitici coinvolti nell'invasione tumorale e facilitando l'attivazione del TGF- β e l'internalizzazione di RA, si assiste ad un aumento dei segnali inibitori della crescita sulle cellule epiteliali bersaglio (142). L'IGF2R è stato, quindi, designato come una proteina con attività oncosoppressiva, e che sembra svolgere un ruolo fondamentale nella regolazione fine della disponibilità dell'IGF-2, sia durante la crescita e lo sviluppo fetale che durante la tumorigenesi.

La delezione funzionale dell'IGF2R in fase postnatale può determinare la soppressione degli effetti inibitori della crescita esercitati da TGF- β e RA, e l'aumento della proliferazione tramite il legame dell'IGF-2 all'IGF1R; insieme ad altri effetti trasformanti, la perdita di IGF2R può condurre alla tumorigenesi. La disponibilità di un eccesso di enzimi proteolitici catepsina-simili in assenza di IGF2R potenzierebbe, quindi, la capacità di invadere e metastatizzare delle cellule trasformate: la regolazione negativa dell'IGF2R è stata infatti riportata in molte neoplasie (143).

Un altro recettore identificato è l'isoforma A del recettore dell'insulina (IR-A), che lega l'IGF-2 con un'elevata affinità, ed è espresso nelle cellule fetali e nelle cellule tumorali (144); l'IR umano esiste, dunque, in due isoforme, IR-A e IR-B; lo splicing alternativo di un piccolo esone determinerebbe la formazione di due trascritti, in cui vengono esclusi (IR-A) o inclusi (IR-B) 36 nucleotidi (145): IR-B è espresso prevalentemente nei tessuti, adiposi, epatici e muscolari, che sono i tessuti bersaglio principali degli effetti metabolici dell'insulina, mentre l'IR-A è espresso soprattutto nel sistema nervoso centrale e nelle cellule ematopoietiche, specialmente durante lo sviluppo fetale, e sembra essere nuovamente espresso in alcuni tumori (144). Quindi, si può ritenere che l'effetto biologico finale dell'IGF-2 sulla cellula sia determinato dalla presenza relativa di IGF1R, IGF2R (forme associate a membrana o solubili) ed IR-A.

IGFBP-3 E MELANOMA

Le vie di segnale di IGF sono coinvolte nella progressione del melanoma (146, 147): secondo alcuni Autori (148), IGFBP-3 potrebbe essere utilizzata come un marker nel melanoma, in virtù della sua aumentata espressione nella malattia metastatica; altri, invece, (149) hanno riportato solo piccole differenze nell'espressione della proteina in caso di malattia metastatica o meno e nessuna differenza nei livelli plasmatici di IGFBP-3.

Alcuni Autori (150) hanno valutato l'espressione di IGFBP-3 nel melanoma; questa è stata analizzata su pezzi in paraffina provenienti da nevi, melanomi primitivi e metastasi: l'espressione di IGFBP-3 varia in modo significativo nelle linee cellulari di melanoma umano, infatti non è stata rinvenuta alcuna espressione di IGFBP-3 nei nevi, mentre una debole positività (1-5% delle cellule) è stata osservata nei melanomi primitivi; nessuna immunoreattività è stata osservata nella cute sana adiacente la neoplasia; le metastasi hanno mostrato, infine, debole positività, ma maggiore rispetto alle cellule del melanoma primitivo: questo suggerirebbe che l'espressione di IGFBP-3 potrebbe essere indotta in caso di progressione di malattia. Inoltre, gli stessi autori hanno indagato circa l'esistenza di una correlazione tra i livelli circolanti di IGFBP-3 nel plasma e la progressione di malattia, non rilevando alcuna significativa differenza tra i pazienti in stadio II e in stadio IV: di conseguenza, IGFBP-3 non può essere utilizzata come marker sierico nei pazienti affetti da melanoma (149, 150).

L'espressione di IGFBP-3 si riduce durante la progressione di malattia ma, come riportato anche per altre neoplasie (151), IGFBP-3 sembra avere un modesto valore diagnostico. Inoltre, IGFBP-3 sembra avere un ruolo sia nella proliferazione che nell'apoptosi cellulare; i meccanismi che regolano l'espressione di IGFBP3 nel melanoma includono sia un silenziamento dovuto alla metilazione del promoter di IGFBP-3 che un coinvolgimento delle vie di segnale PI3-chinasi/AKT e MAPK/ERK1/2, la cui inibizione comporterebbe una riduzione dei livelli di IGFBP3 (150).

Diversi lavori sono stati condotti sullo studio di eventuali geni che potessero rivestire un ruolo importante nella progressione del melanoma (152): tra questi, proprio IGFBP-3 sembra essere un candidato importante, in virtù del suo ruolo chiave nella proliferazione cellulare e nella metastatizzazione (153).

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

potenziale invasivo della linea cellulare WM266-4 *in vitro*: questi dati si traducono nella dimostrazione che IGFBP-3 possa giocare un ruolo centrale nella modulazione del potenziale metastatico delle cellule di melanoma, e che possa rappresentare un marker prognostico (148).

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

LE METALLOPROTEASI

Le metalloproteasi di matrice (matrix metalloproteinases, MMP), o matrixine, sono una famiglia di enzimi proteolitici, la cui attività catalitica di tipo endopeptidasico è dipendente dalla presenza di specifici ioni metallici. Le MMP hanno una potente azione degradativa nei confronti di componenti proteici della matrice extracellulare (extracellular matrix, ECM) e possiedono, inoltre, attività di clivaggio verso molecole presenti sulla membrana cellulare e verso altre molecole proteiche pericellulari (154).

L'attività di questi enzimi è fondamentale per lo svolgimento di numerosi processi fisiologici (sviluppo embrionale, rimodellamento/turn-over tissutale, riparazione di ferite) e patologici, sia di tipo infiammatorio che degenerativo (ad es. artriti, artrosi), nonché nell'acquisizione del fenotipo invasivo e/o metastatizzante delle neoplasie (154).

Tale molteplicità di funzioni delle MMP è accompagnata da precisi meccanismi di regolazione, molto articolati e che agiscono a livelli differenti; oltre ad essere noti dei meccanismi di regolazione a livello trascrizionale, le MMP, al pari degli enzimi pancreatici, sono secrete come "zimogeni" cioè come enzimi che si attivano solo dopo la rimozione di un propeptide inibitorio. Inoltre, l'attività delle MMP è ulteriormente regolata da molecole con azione inibitoria chiamate "inibitori tissutali delle MMP" (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, TIMP).

Gli organismi superiori producono numerose e diverse MMP, ciascuna delle quali si contraddistingue per il proprio profilo di espressione, localizzazione,

attivazione, inibizione e clearance così come per uno specifico pannello di substrati da degradare. Tuttavia, alcune funzioni delle diverse MMP sono sovrapponibili: si potrebbe dire che l'attività delle MMP è, per certi aspetti, ridondante, ma, allo stesso tempo, vantaggiosa per l'organismo perché garantisce una sorta di meccanismo compensatorio, nel caso di perdita di funzione di qualche MMP (155).

La nomenclatura delle MMP associa normalmente all'acronimo MMP un numero che di solito si riferisce alla sequenza cronologica della scoperta. Inoltre, le MMP possono essere raggruppate e nominate sulla base dell'organizzazione dei loro domini. La maggior parte delle MMP è costituita da molecole di secrezione; tuttavia, almeno sei di esse mostrano un dominio transmembranario e sono espresse come molecole di superficie.

La struttura delle MMP può essere così schematicamente descritta (155):

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

Sulla base della specificità per i substrati, della similarità nella sequenza e nell'organizzazione dei domini, le MMP dei vertebrati sono state divise in 6 distinti gruppi (155), di seguito descritti.

Collagenasi

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

Gelatinasi

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

Stromelisine

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

la sequenza e la specificità di substrati divergono da quelle delle altre stromelisine.

Matrilisine

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

MMP membrane type

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

Il gruppo delle “altre MMP”

Appartengono a questo gruppo 7 MMP. La MMP12 o metalloelastasi è conosciuta per essere espressa nei macrofagi dove svolge un ruolo fondamentale nei processi di migrazione digerendo appunto l'elastina e numerose altre proteine. La MMP19 sembra essere un autoantigene espresso nei pazienti affetti da artrite reumatoide. La MMP20, o enamelisina, digerisce l'amelogenina ed è primariamente espressa a livello dentale. La MMP23 non possiede il cysteine-switch-motif a livello di predominio e al posto del dominio emopessinico presenta un dominio ricco in cisteina e prolina chiamato “IL-1 type II receptor-like domain”. La MMP23 è stata proposta come MMP di membrana di tipo II perché possiede un dominio transmembranario a livello N-terminale del predominio. Inoltre, sempre nel propeptide, è presente un motivo che riconosce la furina ed è perciò clivata a livello dell'apparato di Golgi e rilasciata come proteina già attiva nello spazio extracellulare. Appartengono infine a questo gruppo la MMP22, con funzione ancora ignota, e la MMP28, principalmente espressa nei cheratinociti.

Attivazione delle MMP

Come altri enzimi proteolitici, le MMP sono sintetizzate come zimogeni, cioè proenzimi inattivi (definiti proMMP). La latenza è garantita dal gruppo sulfidrilico di una cisteina a livello dell'estremità C-terminale del prodominio;

questo gruppo sulfidrilico rappresenta il quarto sito di legame per lo zinco presente nel sito attivo del dominio catalitico.

L'attivazione si verifica quando il legame gruppo sulfidrilico – ione zinco (c.d. cystein to zinc switch) è rimosso; a questo punto il sito attivo, in cui il quarto legame è rimpiazzato con una molecola di acqua, può attaccare i legami peptidici delle proteine target delle MMP (155, 156).

Attivazione in vitro

L'attivazione delle MMP *in vitro* può essere mediata da molti agenti chimici quali ad esempio SDS, glutatione ossidato, agenti caotropici, oltre che da bassi valori di pH e da trattamento al calore. Questi agenti, probabilmente, interferiscono direttamente con l'interazione tra la cisteina e lo zinco del sito attivo.

Attivazione in vivo

L'attivazione *in vivo* della maggior parte delle MMP a livello extracellulare avviene per proteolisi; questo processo avviene in genere per step e può essere iniziata o da altre MMP, a loro volta già attivate, oppure da numerose serin-proteasi. Il primo attacco proteolitico avviene a livello della bait region del prodominio. Quando questa prima parte del prodominio è rimossa, si verifica una destabilizzazione complessiva di tutta questa regione comprendendo anche l'interazione cisteina-zinco del sito attivo. L'attivazione completa della MMP è mediata da una successiva processazione intermolecolare da parte di altre MMP

parzialmente o totalmente attivate; di conseguenza, lo step finale dell'attivazione è MMP-dipendente.

TIMP

I TIMP sono inibitori peptidici di peso molecolare compreso tra 21 e 29 kDa, che legano le MMP secondo un rapporto stechiometrico di 1:1. Nei vertebrati sono stati identificati 4 diversi TIMP (TIMP1, 2, 3 e 4). Analogamente alle MMP, anche l'attività dei TIMP è regolata in condizioni fisiologiche. I TIMP hanno un'estremità N e C terminale di, rispettivamente, 125 e 65 aminoacidi, ciascuno contenente 3 ponti disolfuro. L'estremità N-terminale è quella con azione inibitoria sulle MMP. La struttura complessiva tridimensionale dei TIMP è riferibile ad un "cuneo" che si inserisce a livello del solco del sito attivo nel dominio catalitico delle MMP (155). Da un punto di vista funzionale, è noto che i TIMP, oltre l'inibizione delle MMP, svolgono altre funzioni come la stimolazione dell'attività eritroide e della crescita cellulare (156).

Meccanismi molecolari dell'attività delle MMP

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

in grado di influenzare il comportamento cellulare attraverso numerosi meccanismi.

Rimodellamento della ECM

La degradazione della ECM, operata dalle MMP insieme ad altre molecole proteolitiche, quali principalmente le serin-proteasi, è un processo che permette, distruggendo fisicamente le barriere strutturali, l'invasione cellulare dei tessuti circostanti. Tuttavia la ECM non deve essere considerata solo come una semplice impalcatura, perché la sua degradazione può fortemente influenzare il comportamento cellulare in conseguenza della liberazione di molecole bioattive che normalmente sono sequestrate nella ECM stessa. Queste molecole sono numerose e con funzioni differenti: fattori di crescita, proteine che legano i fattori di crescita e molecole che rappresentano i ligandi per recettori cellulari di adesione (ad es. per le integrine). Di conseguenza, la ECM risulta implicata nella regolazione di numerosi processi cellulari quali la forma, il movimento, la crescita, la differenziazione e la sopravvivenza. Tutti questi processi possono essere alterati dall'azione delle MMP che, modificando la normale composizione e organizzazione della ECM, influenzano tutti i segnali derivati dalla matrice. Ad esempio, per dimostrare come l'attività delle MMP possa influenzare il comportamento cellulare, la degradazione MMP-dipendente delle fibrille native di collagene determina l'esposizione di siti altrimenti criptati che possono essere legati da integrine di cellule neoplastiche di melanoma, consentendone la sopravvivenza e la crescita (156).

Degradazione di molecole di superficie

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

Sempre nell'ambito del rimodellamento di molecole di superficie, le MMP possono determinare anche il rilascio di molecole bioattive. Ad esempio, la MMP3 può determinare la liberazione dai leucociti di L-selectina e può anche rilasciare il fattore di crescita HB-FGF in forma attivata. La MMP7 a sua volta può indurre apoptosi cellulare mediata dal recettore FAS determinando il rilascio del ligando attivato per il FAS dalla superficie delle stesse cellule con un meccanismo autocrino. La liberazione del ligando per il FAS può prevenire in certi contesti la progressione neoplastica, ma, allo stesso tempo, può essere responsabile della selezione di sottopopolazioni neoplastiche resistenti all'apoptosi FAS-mediata. Le MMP2 e 9 possono attivare il TGF- β e almeno 7 diverse MMP possono attivare il precursore del TNF- α legato alla membrana

cellulare. Oltre ad attivare e/o rilasciare numerosi fattori di crescita e citochine, le MMP possono rilasciare anche i recettori specifici per tali molecole. Ad esempio, la MMP2 libera dalla superficie cellulare il recettore 1 per l'FGF, che mantiene dopo il rilascio la capacità di legame con l'FGF influenzandone di conseguenza la biodisponibilità (154).

Regolazione di segnali paracrini

Le MMP possono intervenire anche nella regolazione di segnali con azione paracrina sia inattivando direttamente le molecole responsabili di tali segnali sia, in alternativa, degradando i recettori destinati al legame con tali molecole ad azione paracrina. Per esempio le MMP possono direttamente degradare molecole con azione paracrina quali angiotensina I e II, bradichinina e la sostanza P (154).

LE METALLOPROTEASI E IL MELANOMA

Negli ultimi anni è diventato sempre più chiaro che ritenere le metalloproteasi indispensabili esclusivamente per la distruzione di componenti della matrice extracellulare con la conseguente acquisizione di capacità invasive da parte delle cellule tumorali, fosse riduttivo. La matrice extracellulare, oltre alle sue funzioni strutturali e di barriera, riveste altri importanti ruoli; ad esempio, la membrana basale influenza la crescita e la sopravvivenza di cellule epiteliali e la ECM serve come serbatoio di numerose molecole biologicamente attive (157). La proteolisi di componenti della ECM da parte di metalloproteasi può alterare queste funzioni. Inoltre, sono stati identificati vari substrati non appartenenti alla ECM che possono influenzare le funzioni cellulari (158). Ad esempio è stato dimostrato che l'IGFBP3 è un substrato per le metalloproteasi, in particolare per le metalloproteasi 1, 2 e 3 (159).

II SISTEMA WNT, GSK3 E β -CATENINA

Il sistema Wnt comprende una famiglia di glicoproteine necessarie per lo sviluppo embrionale e per l'omeostasi tissutale nell'adulto (160,161). È stato dimostrato che il pathway Wnt/ β -catenina gioca un ruolo importante in questi processi e regola differenziazione, proliferazione e rinnovamento cellulare; inoltre, regola la pigmentazione durante lo sviluppo murino determinando il numero di melanoblasti, precursori dei melanociti (162).

Mutazioni a carico del sistema Wnt compromettono lo sviluppo embrionale e sono implicate nella patogenesi di diversi tipi di cancro (163). Nell'uomo sono stati identificati 19 geni Wnt, la cui struttura è molto simile: la maggior parte di essi comprende 4 esoni codificanti di cui il primo contiene una metionina iniziale. Le proteine Wnt condividono un'omologia di sequenza che va dal 27% all'83% e sono altamente conservate tra diverse specie (164). Tali proteine hanno una dimensione che va dai 39 ai 46 KDa e, una volta secrete, si associano strettamente con i glicosaminoglicani della matrice extracellulare e si legano alla superficie cellulare mediante recettori specifici (165). La regione carbossi-terminale delle proteine Wnt è responsabile della specificità di risposta, mentre la porzione amino-terminale è deputata all'interazione con recettori di membrana, sebbene necessiti della porzione carbossi-terminale per la loro attivazione (164).

La proteina GSK3 (Glycogen Synthase Kinase) è una serin/treonin protein chinasi presente in tutte le cellule eucariotiche; identificata inizialmente come un regolatore del metabolismo del glicogeno, essa agisce come fattore di regolazione negativo in numerosi pathway, inclusa la risposta cellulare a Wnt, fattori di crescita, insulina, RTK (Receptor Tyrosine Kinases), Hedgehog, e GPCR (G-Protein-Coupled Receptors) ed è coinvolta in numerose cascate di trasduzione del segnale, dal metabolismo del glicogeno allo sviluppo cellulare, alla trascrizione genica all'organizzazione del citoscheletro, alla regolazione del ciclo cellulare, nonché della proliferazione e apoptosi. A differenza delle altre protein chinasi, GSK3 è attivo nelle cellule quiescenti, mentre la sua attività diminuisce in corso di attivazione cellulare; un'altra peculiarità è la sua particolare affinità per substrati già precedentemente fosforilati da un'altra chinasi (166).

GSK3 è localizzato principalmente nel citoplasma, sebbene sia presente anche nel nucleo. I fattori di crescita e l'insulina inibiscono la capacità di GSK3 di agire su un substrato già fosforilato tramite la fosforilazione della Ser9 di GSK3 stesso, che blocca l'interazione di quest'ultimo con il gruppo fosfato del substrato (167).

Esistono due forme principali di GSK3, codificate da geni distinti: GSK3- α e GSK3- β ; in particolare, quest'ultimo è abbondante nel sistema nervoso centrale e fosforila direttamente diverse MAPs (Microtubule-Associated Proteins) coinvolte nella stabilizzazione dei microtubuli (168).

GSK3 è controllato negativamente dall'attivazione di Akt/PKB (Protein Kinase-B), PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) mediata e dal pathway Wnt. In assenza di un segnale Wnt, GSK3 è associato ad un complesso multiproteico che comprende le proteine axina (Axis Inhibitor), APC (Adenomatous Polyposis Coli), CSNK1 (Casein Kinase-1) e β -Catenina, quest'ultima localizzata sulla membrana insieme alle caderine. Queste proteine aiutano GSK3 a fosforilare in maniera efficiente proprio la β -catenina, conducendola all'ubiquitinazione e alla successiva degradazione proteosoma-mediata (figura 12).

L'axina ha il compito di legare sia GSK3 che β -catenina, portandole in stretto contatto e consentendo, così, la fosforilazione della β -catenina da parte di GSK3; inoltre, l'axina agisce anche come proteina attivatrice di GSK3: quando quest'ultimo è attivato, esso fosforila APC e β -catenina e stimola l'interazione tra questa e β -TRCP (Beta-Transducin Repeat-Containing Protein), un fattore di regolazione della E3 Ubiquitin-Ligasi, a sua volta responsabile della degradazione di β -catenina nel proteosoma (169, 170).

Al contrario, il legame di Wnt ai recettori Fzd (Frizzled) attiva Dsh (Dishevelled), che inibisce l'attività di GSK3, di fatto stabilizzando la β -catenina, con conseguente traslocazione della stessa nel nucleo in presenza di PP2A (Protein Phosphatase-2A) dove, tramite l'interazione con LEF (Lymphoid Enhancer Factor)/ TCF (T-Cell Factor), attiva geni target specifici (169).

Quando β -catenina è assente, alcuni TCF sopprimono la trascrizione interagendo con i corepressori TLE (Transducin-Like Enhancer) e CTPB (C-Terminal Binding Protein); Akt è uno dei regolatori più importanti di GSK3 e la fosforilazione e inattivazione di questo potrebbero mediare alcuni effetti antiapoptotici di Akt (171).

Negli adulti, alti livelli di β -catenina sono espressi sia nel citoplasma che nel nucleo delle cellule dei nevi (162, 172-175): questi ultimi esprimono alti livelli di trascritti di Wnt, inclusi WNT2, WNT5A, WNT5B, WNT7B e WNT10B; questi ligandi di Wnt sono altamente espressi anche nei melanomi caratterizzati istologicamente da cellule piccole e monomorfe, mentre sono espressi eterogeneamente nei melanomi caratterizzati da cellule di grandi dimensioni, pleomorfe (176).

La β -catenina svolge un ruolo fondamentale nelle giunzioni aderenti delle cellule epiteliali, facendo da ponte tra il citoscheletro e le molecole di E-caderina, che mediano l'adesione tra le cellule. Il dominio citoplasmatico dell'E-caderina lega la β -catenina o la γ -catenina (anche detta pacoglobina) e queste, a loro volta, legano l' α -catenina, associata ai filamenti di actina citoscheletrica direttamente o tramite proteine actina-associate, quali l' α -actinina e la vinculina (177,178).

Il pathway WNT canonico

Le proteine Wnt agiscono legandosi ai recettori Fzd (179,180), i quali presentano un dominio extracellulare N-terminale ricco di cisteine che lega la proteina Wnt, sette eliche transmembrana e una corta coda citoplasmatica carbossiterminale. Per l'attivazione del sistema è necessaria anche la presenza dei corecettori LRP (Low-density lipoprotein receptor-Related Protein) e la formazione del complesso ternario Wnt/Fzd/LRP (164). I segnali Wnt sono trasdotti attraverso vie distinte di segnalazione intracellulare (181) tra le quali quella meglio nota è rappresentata dal pathway Wnt/ β -catenina, la cui funzione principale è quella di regolare i livelli intracellulari di β -catenina.

Quest'ultima esiste in tre pool a localizzazione e funzioni diverse (182):

- β -catenina legata all'E-caderina a livello della membrana plasmatica;
- β -catenina nucleare complessata a fattori di trascrizione della famiglia TCF (T-Cell Factor) / LEF (Lymphoid Enhancing Factor), che promuove la trascrizione dei geni target;
- β -catenina legata a GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β), che la indirizza alla degradazione.

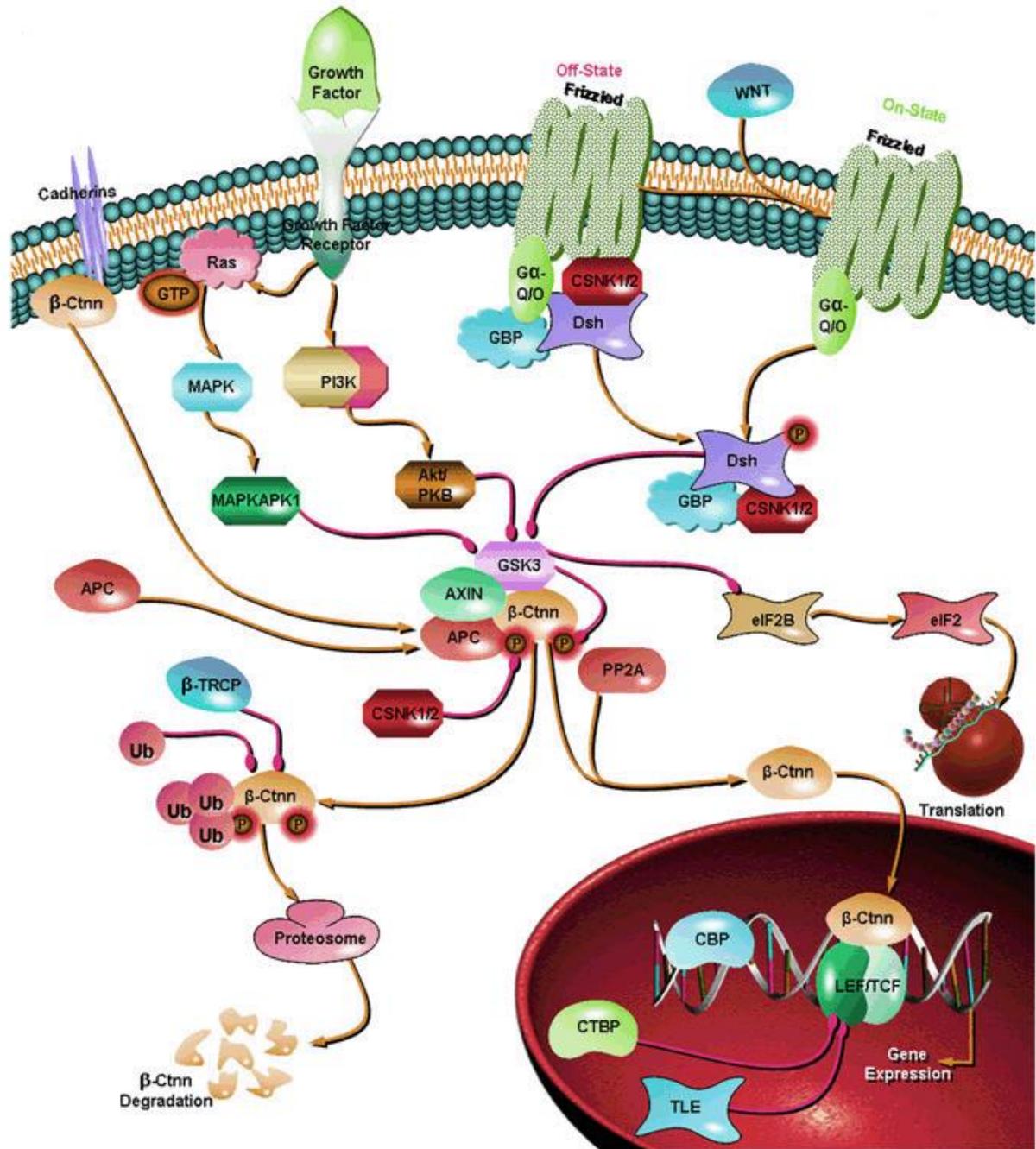
In assenza di segnalazione Wnt, la β -catenina si trasforma in un “complesso di distruzione” insieme ad APC, axina, GSK-3 β e casein chinasi 1 α : viene, cioè, fosforilata e, quindi, legata dalla proteina F-box β -TrCP (β -Transducin repeat

Containing Protein), una componente del complesso E3 ubiquitina ligasi, che la rende poliubiquitinata e quindi degradabile dal proteosoma (182).

In presenza di segnalazione Wnt, GSK-3 β viene disattivato tramite il legame di Wnt stesso a recettori Fzd e LRP, il che comporta l'attivazione di Dishevelled, con successivo blocco della fosforilazione/ubiquitinazione di β -catenina: conseguentemente, la β -catenina attiva, non fosforilata, si accumula nel citoplasma e migra poi nel nucleo, dove si lega ai fattori di trascrizione TCF/LEF (T-cell factor / lymphoid enhancer factor): la conseguenza è l'attivazione trascrizionale di alcuni geni regolatori chiave, come myc, ciclina D1 e MITF (183) (figura 12).

La natura oncogenica della β -catenina è stata affermata per la prima volta circa 15 anni fa, ("Smoking Gun" , Mark Peifer's cancer crime scene, Peifer, 1997). Da allora, il suo ruolo chiave in diverse neoplasie (colon, mammella, prostata e ovaio) è stato ben documentato: la β -catenina può svolgere la propria attività oncogenica tramite mutazioni a carico dei siti di fosforilazione degradazione-specifici o, più frequentemente, tramite una perdita della funzione di APC. Tuttavia, nonostante il melanoma sia stato uno dei primi tumori per i quali sia stato riconosciuto un ruolo chiave della β -catenina (184), il suo ruolo rimane tuttora non chiaro (185).

Figura 12: Sistema WNT, GSK3 e β -catenina



MATERIALI E METODI

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

Le variabili analizzate sono state l'età, il sesso, la data della diagnosi, l'istotipo del melanoma, lo spessore di Breslow, il livello di Clark, la presenza o meno di ulcerazione, lo stadio di malattia al momento della diagnosi e al momento di una eventuale progressione, la data di progressione, morte o ultimo follow up, il performance status, la presenza di eventuali malattie associate e terapie intercorrenti, l'intervallo libero da malattia (Disease Free Survival, DFS), la sopravvivenza globale (Overall Survival, OS) ed il volume metastatico, calcolato attraverso immagini radiologiche ottenute con la Tomografia Assiale Computerizzata (TAC) spirale secondo i criteri RECIST (186). Ciascuna metastasi è stata accuratamente misurata considerando il suo diametro maggiore, con uno spessore minimo di 10mm a scansione, al fine di discriminare sia le lesioni tumorali che i linfonodi in misurabili e non misurabili. Quindi, ogni lesione misurabile è stata paragonata ad una formazione sferica con il diametro equivalente alla media del diametro minore con quello maggiore ed il volume è stato calcolato usando la formula: $\frac{4}{3} \pi r^3$.

Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte nella tabella 2.

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

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

Tabella 2: caratteristiche dei pazienti

Caratteristiche dei pazienti (N = 48)	Numero
Sesso	
Maschio	25 (52.08%)
Femmina	23 (47.92%)
Età	
≤40	7 (14.59%)
41-60	17 (35.41%)
>60	24 (50%)
Spessore di Breslow	
≤1.00	9 (18.75%)
1.01-2.00	7 (14.58%)
2.01-4.00	17 (35.41%)
>4.00	12 (25%)
Non valutabile (melanoma occulto)	3 (6.26%)
Ulcerazione	
Assente	20 (41.66%)
Presente	25 (52.08%)
Non valutabile	3 (6.26%)
Sottotipo istologico	
Superficial Spreading Melanoma (SSM)	24 (50%)
Nodular Melanoma (NM)	20 (41.66%)
Acral Lentiginous Melanoma (ALM)	1 (2.08%)
Occulto	3 (6.26%)
Decesso	
Si	12 (25%)
No	36 (75%)
Familiarità	
Si	4 (8.33%)
No	44 (91.77%)
Presenza di malattia al prelievo	
Si	16 (33.33%)
No	32 (66.67%)
Melanoma multiplo	
Si	5 (10.41%)
No	43 (89.59%)
Progressione	
Si	22 (45.83%)
No	26 (54.17%)
Stadio al prelievo	
Stadio 1	10 (20.84%)
Stadio 2	15 (31.25%)
Stadio 3	9 (18.75%)
Stadio 4	14 (29.16%)
Volume metastatico	
0-15cc	36 (75%)
≥ 15cc	12 (25%)

ELISA

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

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

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

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

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

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

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

RIA

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

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

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

Saggio per le proteasi di IGFBP-3

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

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

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

Zimografia

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

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

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

Dopo l'elettroforesi i gel sono stati lavati due volte, per 30 minuti, in un buffer di triton X-100 al 2,5% per rimuovere l'SDS. Successivamente i gel sono stati incubati overnight, ad una temperatura di 37°C, con un buffer contenente il substrato dell'enzima (Tris-HCl 50mM, pH 7,5; NaCl 150mM; CaCl₂ 5mM). Infine, i gel sono stati colorati con Blue Coomassie R250 e decolorati in acqua.

Lo stesso test è stato anche eseguito su estratti cellulari provenienti da colture di cellule di melanoma umano sia primitive che metastatiche (WM793 e Me501).

Colture cellulari

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

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

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

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

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

Scratch test

Detto anche wound-healing, si utilizza per valutare la motilità cellulare e consiste nel praticare un vero e proprio "graffio" in una coltura cellulare in adesione e quindi monitorare se e con quale velocità il graffio torni a riempirsi di cellule: in sostanza, misura la capacità delle cellule di muoversi. E' stato

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

Trypan blue test

Il test di esclusione della colorazione viene utilizzato per determinare il numero di cellule vitali presenti in una sospensione. Si basa sul principio che le cellule vive, avendo membrane cellulari intatte, non permettono a determinati coloranti come il trypan blue, di penetrare all’interno del citoplasma.

Una sospensione cellulare viene messa a contatto con il colorante e successivamente esaminata al microscopio per valutare se le cellule appaiono colorate oppure no. Questo test non è, tuttavia, in grado di distinguere cellule apoptotiche da cellule necrotiche.

Test di invasività cellulare

L'invasività delle cellule di melanoma è stata valutata con la metodica di invasione del Matrigel (strato di membrana basale ricostituita in vitro) adeso alla membrana di separazione tra il compartimento superiore ed inferiore di una camera di Boyden. I due pozzetti della camera di Boyden sono stati separati da un filtro di policarbonato con pori della larghezza di 8µm, che è stato ricoperto con Matrigel (50µg/filtro): il Matrigel corrisponde alla composizione della membrana basale in vivo. La possibilità delle cellule di oltrepassare tale barriera anatomica è indicativa delle proprietà invasive delle cellule.

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

Western blot

Per determinare la concentrazione delle proteine coinvolte nella via proliferativa ed apoptotica influenzate dal legame di IGF-1 al suo recettore, al fine di valutare l'attività di IGFBP-3 sulle stesse, è stata utilizzata la metodica Western Blot

(WB); prima dell'analisi elettroforetica, la concentrazione totale di proteine dei lisati cellulari Me501 usati come controllo o trattati con IGFBP-3, è stata determinata mediante tecnica Bradford. In particolar modo, la quantità di Akt endogena è stata valutata con anticorpo specifico Cell Signaling Technology anti-phospho-Akt(Ser473). I campioni sono stati quindi separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide al 12,5% in presenza di SDS (SDS-PAGE) e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa, utilizzando un buffer contenente Tris-Glicina e 20% metanolo. I filtri sono quindi stati bloccati per 1 ora con 5% Not Fat Dry Milk (NFDM, AppliChem) in PBS, lavati ed incubati over night con l'anticorpo primario policlonale (IGFBP-3, ABD Serotec). Successivamente i filtri sono stati lavati in 5% NFDM in PBS+0,1% Tween-20, ed incubati per 45 minuti con anticorpo secondario coniugato con perossidasi diretto contro le immunoglobuline di coniglio, diluito in 10% NFDM (in PBS/T). Quindi, i filtri sono stati lavati in Wash Buffer (5% milk in PBS/T). L'immunoreattività è stata visualizzata tramite chemiluminescenza (ECL, Bio-Rad). Per evidenziare la reazione, i filtri sono stati esposti ad una lastra fotografica per un tempo variabile da alcuni secondi ad alcuni minuti.

Xenotrapianti di cellule Me501 in topi SCID

Sono stati utilizzati 12 topi maschi SCID ai quali sono state inoculate sottocute, nel fianco, 1×10^6 di cellule di melanoma umano Me501 in 200 μ l, diluite 1:1 con il matrigel. I topi sono stati suddivisi in tre gruppi da 4 (gruppo A di controllo trattato con soluzione PBS, gruppo B pretrattato con 7,5 μ g/ml di

IGFBP-3 nello stesso giorno di inoculazione delle cellule di melanoma, gruppo C trattato con 7,5µg/ml di IGFBP-3 dopo una settimana dall'impianto delle cellule tumorali. I dodici topi sono stati quindi trattati con PBS o IGFBP-3 ogni due giorni per 25 giorni. La lunghezza, la larghezza, il volume ed il peso del tumore a livello del sito di inoculazione sono stati misurati durante ed alla fine dell'esperimento. I topi sono stati sacrificati al 25° giorno. I tumori sono stati asportati, pesati, divisi in due parti per poter effettuare sia le indagini istologiche, con i pezzi inclusi in paraffina, che di biologia molecolare, dove il campione era richiesto a fresco. Dai pezzi inclusi in paraffina sono state eseguite alcune sezioni di 3µm che sono state colorate con ematossilina-eosina per poter valutare la presenza di eventuale necrosi. Le immagini delle sezioni sono state acquisite con il microscopio ottico Olympus BX51 Camera Insight Firewire 2 Mega sample a 10x e trasferite come immagini JPEG su supporto digitale tramite il software IAS versione 007000 prodotto dalla Delta System. Le sezioni troppo grandi per essere acquisite come singole immagini sono state accorpate con l'utilizzo di Microsoft Power Point. L'area totale delle lesioni, così come l'area di necrosi sono state calcolate in valori assoluti con l'utilizzo del programma ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Inoltre, abbiamo voluto valutare anche se la quantità di IGFBP-3 somministrata alle cavie potesse influire sulla crescita tumorale; per fare ciò, sono stati utilizzati ulteriori 12 topi maschi SCID ai quali sono state inoculate, con la stessa metodica precedentemente esposta, 1×10^6 di cellule di melanoma umano

Me501 in 200µl, diluite 1:1 con il matrigel. Nuovamente, i topi sono stati suddivisi in tre gruppi da 4: gruppo A di controllo trattato con soluzione PBS, gruppo B trattato con 7,5µg/ml di IGFBP-3 e gruppo C trattato con 37,5µg/ml di IGFBP-3. Le dodici cavie sono state quindi trattate con PBS o IGFBP-3 ogni due giorni per 25 giorni. Come già precedentemente esposto, la lunghezza, la larghezza, il volume ed il peso del tumore a livello del sito di inoculazione sono stati misurati durante ed al termine dell'esperimento e i topi sono stati sacrificati al 25° giorno. I tumori sono stati infine asportati e pesati.

Saggio dell'attività tirosinasi

Un saggio di valutazione dell'attività tirosinasi è stato effettuato al fine di osservare la capacità delle cellule Me501 di melanoma di sintetizzare la melanina. Circa 1×10^6 di cellule Me501 in coltura trattate con 2µg/ml di IGFBP-3 ed un'analoga quantità delle stesse non trattate sono state lisate miscelandole in un buffer (pH 6.8) di NaH_2PO_4 100mM+Triton X 1% con inibitore di proteasi e tenute per 30 minuti in ghiaccio. Dopo aver centrifugato il lisato cellulare per 10 minuti, è stato prelevato il supernatante. E' stata, quindi, normalizzata la concentrazione delle proteine con test di Bradford e 30µg del lisato sono stati incubati a 37°C con 10mM di L-dopa. Lo stesso test è stato eseguito utilizzando frammenti di melanoma espianati dai topi utilizzati nell'esperimento; circa 20mg di tessuto proveniente rispettivamente da un nevo melanocitico demico usato come controllo, dal melanoma di un topo non trattato

con IGFBP-3 e dal tumore di un topo trattato con IGFBP-3, sono stati lisati mediante un omogeneizzatore a pestello (Potter) ed incubati a 37°C con 10mM di L-dopa. L'attività dell'enzima tirosinasi è stata analizzata mediante lettura con spettrofotometro a 475nm. I valori sono stati rappresentati con un istogramma mediante Microsoft Excel. Allo scopo di escludere la possibilità che l'aumento dell'attività tirosinasi fosse dipendente dal sequestro di IGF-1 da parte di IGFBP-3, abbiamo eseguito lo stesso esperimento utilizzando cellule incubate con terreno di coltura privo di siero. Le cellule inserite su quattro piastre (due utilizzate come controllo e due trattate al tempo 0 con 2µg/ml di IGFBP-3) sono state lisate dopo 24 e 48 ore e l'attività della tirosinasi è stata valutata con spettrofotometro.

Immunoistochimica

Per l'analisi immunoistochimica sono stati utilizzati 20 melanomi primitivi e 20 metastasi dermiche. I campioni sono stati fissati in formalina per 2-4 ore e inclusi in paraffina con un punto di fusione di 55-57°C. Tre sezioni da 3µm sono state tagliate e colorate in ematossilina-eosina. Per lo studio immunoistochimico, le sezioni, montate su vetrini, sono state processate dopo essere state deparaffinate, e i siti non immuni bloccati con l'Ultra V Block (Thermo Scientific, Runcorn, UK) secondo le istruzioni ricevute dal rivenditore e lavate per 3 volte in PBS.

Sono stati utilizzati come anticorpi primari un rabbit anticorpo policlonale anti-MMP-9 (Thermo Scientific, RB-9234-P) diluito 1:200 e un rabbit anticorpo policlonale anti-IGFBP-3 (AbD, 5345-5109) diluito 1:100. Le sezioni sono state incubate per 1 ora con anti-MMP-9 e per 2 ore con anti-IGFBP-3 a temperatura ambiente. Dopo quattro lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate per 20 minuti con Primary Antibody Enhancer (Thermo Scientific, Runcorn, UK) e per 25 minuti con AP Polymer (Thermo Scientific, Runcorn, UK).

Le sezioni sono state quindi trattate con il cromogeno Liquid Fast-Red Substrate System (Thermo Scientific, Runcorn, UK) per 10 minuti ed infine, contrastate con ematossilina.

Le cellule di melanoma valutate per questo studio sono stati i melanociti e le cellule stromali individuate mediante criteri morfologici e istologici per ogni sezione di melanoma primitivo e metastasi dermiche considerate. Il calcolo del numero di cellule immuno-positivo sia per anti-IGFBP-3 che per anti-MMP-9, valutate con microscopio ottico a 200X, è stato eseguito in maniera indipendente da tre ricercatori.

La concordanza tra gli operatori è stata superiore al 90%. Per ogni sezione sono stati scelti in maniera randomizzata almeno 7-10 campi microscopici. È stato ideato uno scoring system per valutare l'espressione immunoistochimica sia di IGFBP3 che di MMP-9 considerando il numero di cellule positive: punteggio 0 è stato assegnato in caso di presenza <5% di cellule positive, 1 in caso di lieve positività, 2 in caso di positività focale, 3 in caso di positività moderata e 4 in

caso di forte positività. Lo stesso score è stato utilizzato per valutare il grado di pigmentazione dei campioni presi in esame.

Un'indagine immunohistochimica è stata effettuata per valutare l'indice proliferativo delle cellule di melanoma umano (Me501) espianate dai 12 topi SCID trattati con IGFBP-3, attraverso l'espressione dell'antigene Ki-67. L'analisi è stata effettuata utilizzando il metodo senza biotina, MACH 1 Universal HRP-Polymer Detection (Biocare Medical, Concord, CA, USA). L'anticorpo primario anti-Ki67 è stato incubato per 1 ora (diluizione 1:100; monoclonal mouse, MIB-1, Dako, Glostrup, Denmark). Le immagini al microscopio ottico sono state acquisite mediante camera (SPOT Insight; Diagnostic Instrument, Sterling Heights, MI, USA) connessa al microscopio Olympus BX-51 (Olympus, Tokyo, Japan). Per valutare l'indice proliferativo sono stati scelti, per ogni sezione, due campi con maggior positività di Ki-67, di circa 350-400 cellule ciascuno, ed è stata calcolata una media delle percentuali delle cellule positive osservate da tre diversi operatori.

Per quantificare l'indice apoptotico nei campioni di tumore di melanoma umano (Me501) asportato dai 12 topi considerati nello studio, è stata eseguita un'analisi immunohistochimica con il metodo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labelling) che permette di identificare le cellule apoptotiche attraverso l'enzima terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) che riconosce l'estremità terminale 3'OH del DNA frammentato a doppia o a singola elica dove aggiunge cataliticamente

residui di nucleotidi marcati o modificati con biotina-dUTP. Il metodo TUNEL è stato eseguito usando il Kit ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection (Oncor, Gaithersburg, USA) secondo le istruzioni del rivenditore. Le sezioni incluse in paraffina, dopo reidratazione in scala discendente di etanolo (100, 95 and 70% v/v etanolo) sono state sottoposte a digestione con la proteinasi K (20 µg/ml, Dako) per 6-7 minuti per rendere gli acidi nucleici accessibili ai nucleotidi marcati. Le sezioni sono state, quindi, lavate con acqua distillata e l'attività enzimatica delle perossidasi endogene è stata bloccata con perossido d'idrogeno a 0.3% in metanolo per 10 minuti. Dopo due lavaggi in PBS da 5 minuti ciascuno, le sezioni sono state incubate per 1 ora a 37°C in camera umida con la soluzione di marcatura costituita dall'enzima TdT e dal deossinucleotide trifosfato coniugato con digossigenina (Oncor), quindi, la marcatura è stata bloccata lavando i vetrini con soluzione tamponata (Oncor) per 10 minuti e PBS tre volte per 5 minuti ciascuno. Le sezioni sono state ulteriormente incubate con un anticorpo anti-digossigenina (Oncor) per 30 minuti a temperatura ambiente, lavate in PBS e trattate con DAB per 1-3 minuti al fine di catalizzare la reazione con il cromogeno. Questa reazione è stata interrotta lavando i vetrini in acqua distillata per 1 minuto e successivamente si è provveduto a colorare le sezioni con ematossilina per 30 secondi; infine, dopo disidratazione con scala ascendente di etanolo e xilene, i vetrini sono stati montati con gli opportuni vetrini coprioggetto. L'indice apoptotico è stato calcolato contando le figure apoptotiche sulle sezioni di tumore colorate con la

DAB perossidasi ed espresso come percentuale sul totale delle cellule contate in tre campi 20x scelti in maniera randomizzata.

Infine è stata valutata l'attività di AKT sulle sezioni dei campioni di melanoma umano xenotrapiantati sui topi SCID utilizzando l'anticorpo monoclonale Rabbit Phospho-AKT (Ser473) (D9E)XPTM. Dopo smascheramento degli antigeni, i vetrini sono stati trattati per bloccare i siti non immuni con Ultra V Block (Thermo Scientific, Runcorn, UK) per 5 minuti, quindi sono stati lavati con due lavaggi da 2 minuti di PBS ed incubati con l'anticorpo monoclonale primario Rabbit Phospho-AKT (diluizione 1:50) per 2 ore. Le sezioni sono state, poi, lavate e trattate con Primary Antibody Enhancer (Thermo Scientific, Runcorn, UK) per 20 minuti e successivamente con AP Polymer (Thermo Scientific, Runcorn, UK) per altri 30 minuti. Infine, sono state incubate con il cromogeno Liquid Fast-Red Substrate System (Thermo Scientific, Runcorn, UK) per 10 minuti e contrastate con ematossilina. Due operatori hanno quindi calcolato la percentuale di aree positive per p-AKT rispetto all'area totale del tumore.

Analisi statistica

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

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

I valori di IGF1 ed IGFBP-3 ottenuti rispettivamente con metodica RIA ed ELISA, sono stati aggiustati per sesso ed età come descritto da Friedrich et al (187).

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

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

Al fine di verificare le correlazioni tra le molecole studiate in immunohistochimica (IGFBP-3 e MMP-9) e la presenza di pigmento o con la natura primitiva o secondaria delle lesioni è stato utilizzato il test di Mann-Whitney per la comparazione tra variabili indipendenti.

I risultati ottenuti dalle indagini immunohistochimiche eseguite sui campioni di melanoma umano provenienti da xenotrapianto su topi SCID sono stati calcolati con il test T di Student, considerando sia le variabili relative al volume dei tumori ed alla percentuale di necrosi in esso contenuto, sia la positività per Ki-67, per pAKT che per il TUNEL, nonché, infine, le variabili relative al volume dei tumori differenziate in base alla quantità di IGFBP-3 somministrata.

L'analisi statistica è stata effettuata tramite MedCalc[®] versione 12.6.1.0, Free Trial su piattaforma Windows XP Home edition.

RISULTATI

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

Per valutare la quantità di IGFBP-3 nei sieri dei pazienti arruolati abbiamo effettuato l'analisi ELISA utilizzando anticorpi commerciali anti-IGFBP-3.

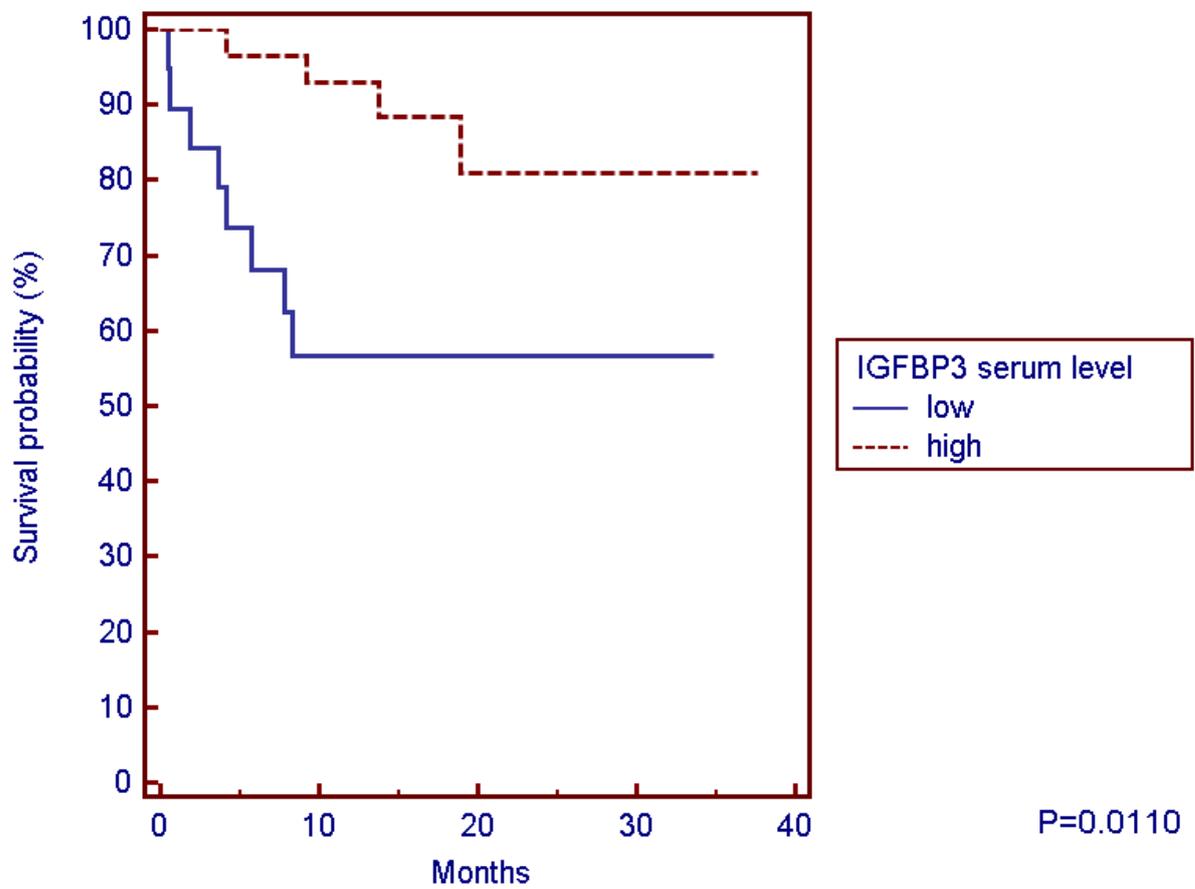
La correlazione tra le variabili prese in esame per i diversi pazienti e la concentrazione sierica di IGFBP-3 è stata effettuata tramite test ANOVA di confronto delle medie; tale indagine, come si evince dalla tabella 3, mostra significatività statistica per le variabili “stadio al momento del prelievo”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

Tramite curva ROC abbiamo calcolato un valore cut-off dell'IGFBP-3, per poter distinguere tra i pazienti deceduti o meno. Abbiamo quindi costruito, secondo il metodo di Kaplan Meier, e paragonato mediante log-rank test, le curve di sopravvivenza dei due gruppi di pazienti aventi valore elevato o basso di IGFBP-3. Tali curve sono risultate statisticamente ben differenziabili con una significatività pari a $P=0.010$ (figura 13). Si può osservare come a 18 mesi solo il 56,7% dei pazienti con bassi livelli di IGFBP-3 è in vita rispetto all'88,3% di quelli con livelli più alti.

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

Caratteristiche dei pazienti (N = 48)	N. pazienti (Valore medio IGFBP-3 in ng/ml)	P value
Sesso Maschi Femmine	25 4780,7517 23 4881,1966	P = 0.744
Età ≤40 41-60 >60	7 5193,5344 17 4825,5782 24 4724,8643	P = 0.592
Spessore di Breslow ≤1.00 1.01-2.00 2.01-4.00 >4.00 Occulto	9 5372,4164 7 5026,7412 17 4353,5847 12 5059,6402 3 4506,9185	P = 0.130
Ulcerazione Assente Presente Non valutabile	20 5026,2152 25 4709,6501 3 4506,9185	P = 0.529
Istologia SSM NM ALM Occulto	24 5173,4689 20 4521,5990 1 3670,3256 3 4506,9185	P = 0.118
Decesso No Si	36 4970,9380 12 4402,7122	P = 0.105
Presenza di malattia al momento del prelievo No Si	32 4982,4951 16 4521,6544	P = 0.153
Progressione No Si	26 5054,4924 22 4562,2505	P = 0.106
Stadio al prelievo Stadio 0 Stadio 1 Stadio 2 Stadio 3 Stadio 4	0 10 5252,9080 15 5040,5362 9 5108,4885 14 4119,4853	P = 0.020
Volume Metastatico tra 0 e 15cc oltre 15cc	36 5051,4858 12 4161,0686	P = 0.009

Figura 13: sopravvivenza globale dei pazienti correlata ai valori di IGFBP-3; linea blu pazienti con bassi livelli di IGFBP-3, linea tratteggiata rossa pazienti con elevati livelli di IGFBP-3



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

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

Abbiamo, quindi, introdotto il valore IGF-1/IGFBP-3 ratio, allo scopo di ottenere un valore, seppure approssimativo, di IGF-1 libero in grado di mediare i propri effetti proliferativi e antiapoptotici a livello dei tessuti.

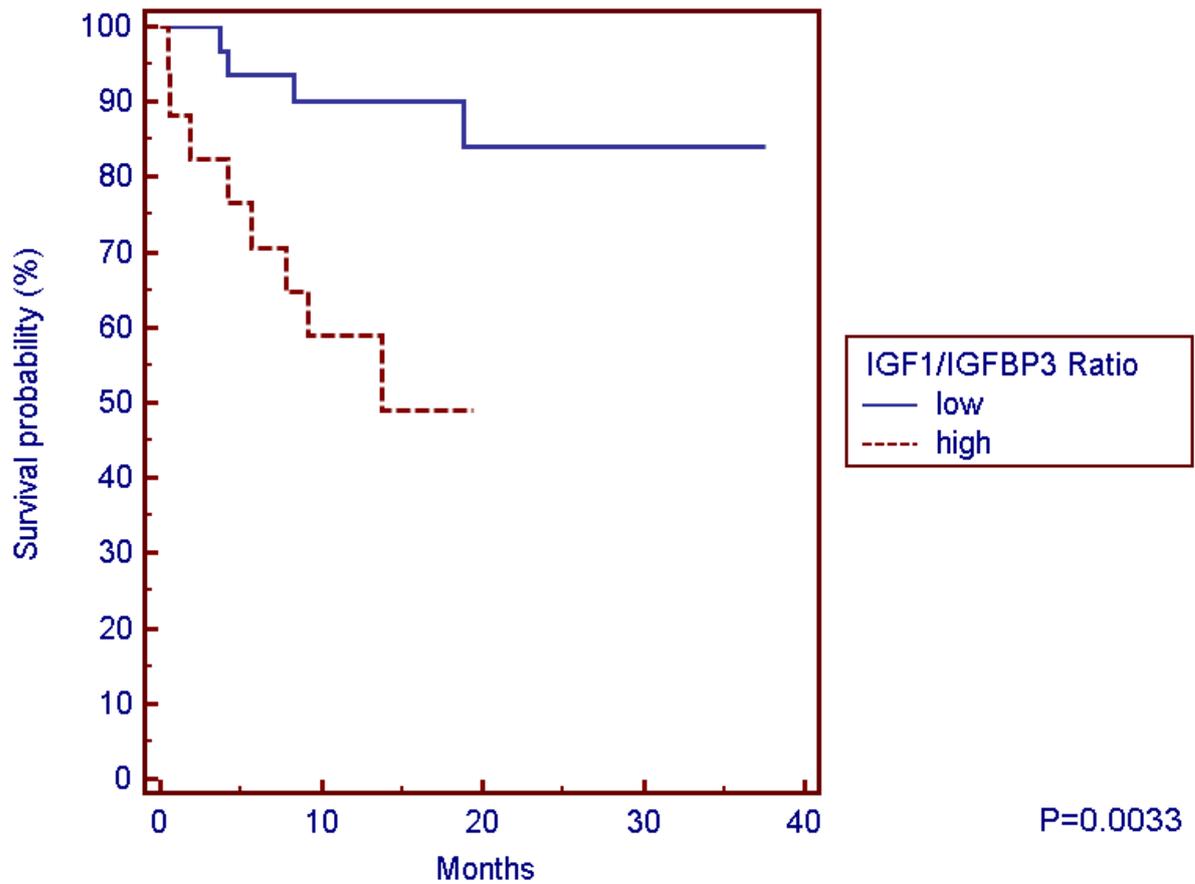
Tale valore è risultato statisticamente correlato con l'età ($P=0.006$) ed il sesso ($P=0.015$) dei pazienti; un valore ($P=0.057$) al limite della significatività è stato riscontrato anche per il volume metastatico (tabella 4).

Tabella 4: correlazione tra il rapporto IGF-1/IGFBP-3 e le variabili studiate mediante test ANOVA

Caratteristiche dei pazienti (N = 48)	N. pazienti (Valore medio IGF1/IGFBP-3)	P value
Sesso Maschi Femmine	25 6,1935 23 5,1392	P = 0.015
Età ≤40 41-60 >60	7 7,3294 17 5,3785 24 5,4290	P = 0.006
Spessore di Breslow ≤1.00 1.01-2.00 2.01-4.00 >4.00 Occulto	9 5,5030 7 6,1181 17 5,8069 12 5,5458 3 5,1393	P = 0.876
Ulcerazione Assente Presente Non valutabile	20 5,8729 25 5,6065 3 5,1393	P = 0.696
Istologia SSM NM ALM Occulto	24 5,8264 20 5,4407 1 8,9716 3 5,1393	P = 0.123
Decesso No Si	36 5,4588 12 6,3768	P = 0.071
Presenza di malattia al momento del prelievo No Si	32 5,5503 16 5,9642	P = 0.382
Progressione No Si	26 5,5542 22 5,8467	P = 0.515
Stadio al prelievo Stadio 0 Stadio 1 Stadio 2 Stadio 3 Stadio 4	0 10 5,3555 15 5,3519 9 5,7662 14 6,2364	P = 0.398
Volume Metastatico tra 0 e 15cc oltre 15cc	36 5,4463 12 6,4142	P = 0.057

Tramite curva ROC abbiamo calcolato un valore cut-off del rapporto IGF-1/IGFBP-3, per poter separare i pazienti deceduti da quelli ancora in vita. Abbiamo, quindi, costruito secondo il metodo di Kaplan Meier e paragonato mediante log-rank test, le curve di sopravvivenza dei due gruppi di pazienti aventi valore elevato o basso di IGF-1/IGFBP-3 ratio. Tali curve sono risultate statisticamente ben differenziabili con una significatività pari a $P=0.0033$ (figura 14). Come si può notare dal grafico, i pazienti con un rapporto più grande, quindi con una biodisponibilità maggiore di IGF-1, hanno, a 18 mesi, una sopravvivenza del 48% rispetto al gruppo di pazienti con il rapporto minore che è dell'89.1%.

Figura 14: sopravvivenza globale dei pazienti correlata ai valori di IGF-1/IGFBP-3 Ratio; linea blu pazienti con bassa biodisponibilità di IGF-1, linea tratteggiata rossa pazienti con elevata biodisponibilità di IGF-1



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

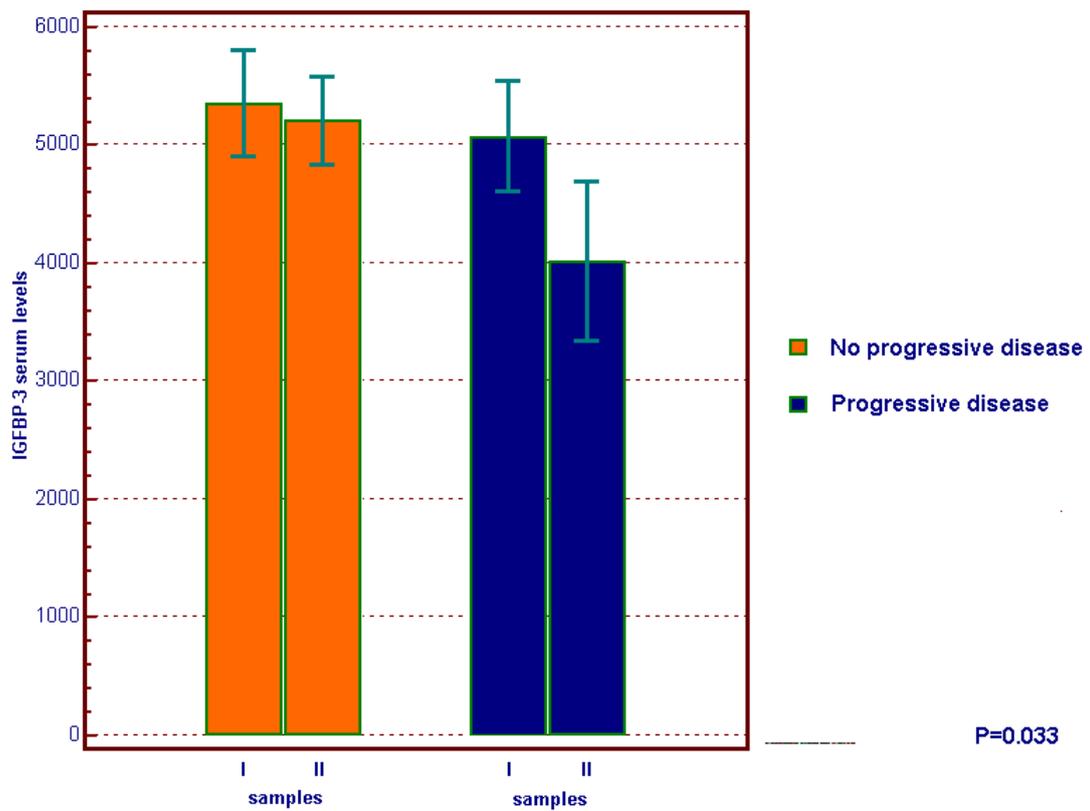
Allo scopo di validare ulteriormente i risultati sopra descritti, abbiamo effettuato misurazioni aggiuntive dei livelli di IGFBP-3 nei sieri degli stessi pazienti sottoposti a prelievo durante il follow-up.

Sono stati valutati 28 pazienti; tra questi, alcuni erano liberi da malattia da almeno 14 mesi, mentre altri erano andati incontro a progressione di malattia ed in alcuni casi a morte.

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

I risultati ancora una volta dimostrano la stretta correlazione esistente tra la concentrazione sierica di IGFBP-3 e la progressione di malattia. I pazienti con “stable disease” presentano valori costanti di IGFBP-3 tra il primo ed il secondo prelievo, mentre nei pazienti andati in progressione di malattia, si può osservare un decremento, statisticamente significativo ($P=0.033$), di circa il 20% medio del valore sierico della proteina (figura 15). Questo dato, insieme ai precedenti, conferma e consolida l'idea che la progressione del melanoma sia significativamente correlata alla riduzione di IGFBP-3 nel sangue dei pazienti.

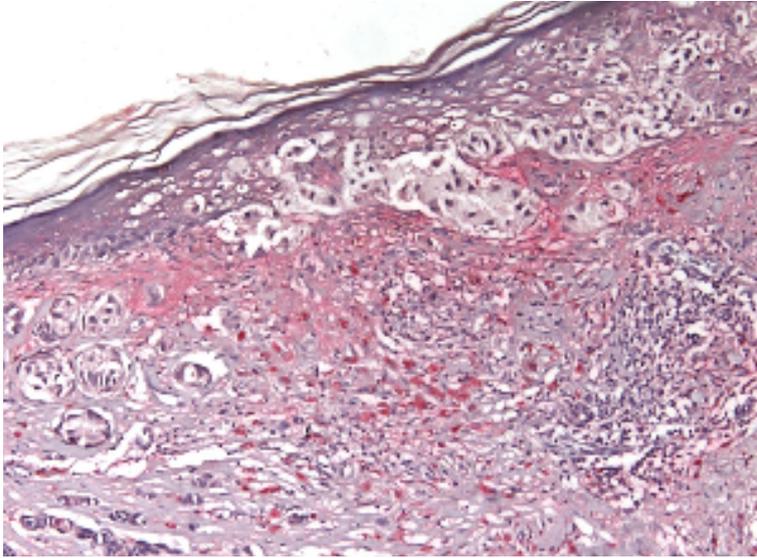
Figura 15: correlazione tra la concentrazione sierica di IGFBP-3 e la progressione di malattia



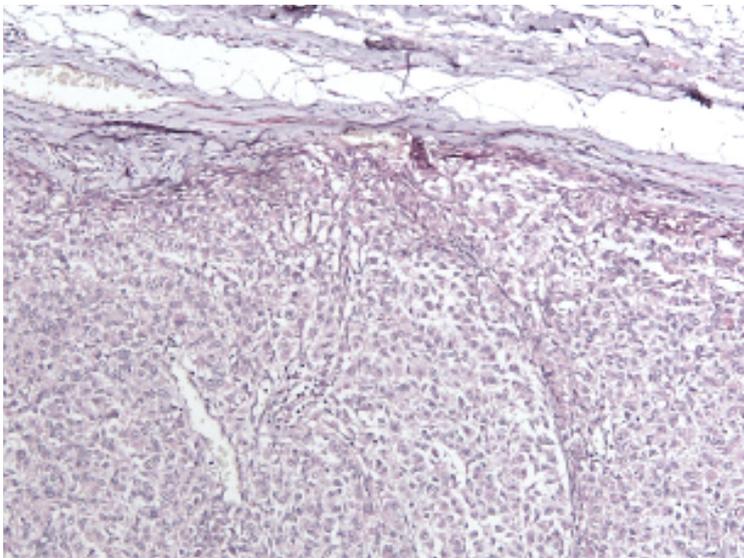
L'espressione di IGFBP-3, valutata in immunistochemica, è maggiore nei melanomi primitivi rispetto alle metastasi dermiche.

La progressione iniziale del melanoma primitivo verso la metastasi è probabilmente controllata, tra gli altri fattori, anche dall'IGFBP-3 presente nel microambiente tissutale. La maggior parte dell'IGFBP-3 è prodotto a livello epatico ma anche dalle cellule infiammatorie, mesenchimali e dai melanociti stessi. L'espressione di IGFBP-3 dei campioni di melanoma primitivo e delle metastasi dermiche considerate in questo studio, è stata valutata attraverso l'analisi immunistochemica; la quantità di IGFBP-3 presente nelle cellule di melanoma correla inversamente con la capacità di metastatizzare della neoplasia (figura 16). La positività citoplasmatica e nucleare di IGFBP-3, considerando sia le cellule delle teche di melanoma che quelle stromali (monociti/macrofagi, linfociti, granulociti e fibroblasti), è risultata statisticamente maggiore nei melanomi primitivi rispetto alle metastasi ($P=0.0031$) (figura 17). Considerando separatamente il grado di positività stromale e tumorale dell'IGFBP-3, si deduce che una minore percentuale di cellule positive nello stroma, correla in modo significativo con la natura secondaria della lesione, rispettivamente $P=0.0014$ IGFBP-3 stromale, $P=0.0947$ IGFBP-3 tumorale (figura 18).

Figura 16 (A-B): Espressione di IGFBP-3 in melanomi primitivi e metastatici



A: L'IGFBP 3 è ben evidente nelle cellule stromali del tumore primitivo



B: Scarsa positività per IGFBP-3 in una metastasi dermica

Figura 17: L'espressione di IGFBP-3 è significativamente maggiore nei melanomi primitivi che nelle metastasi dermiche

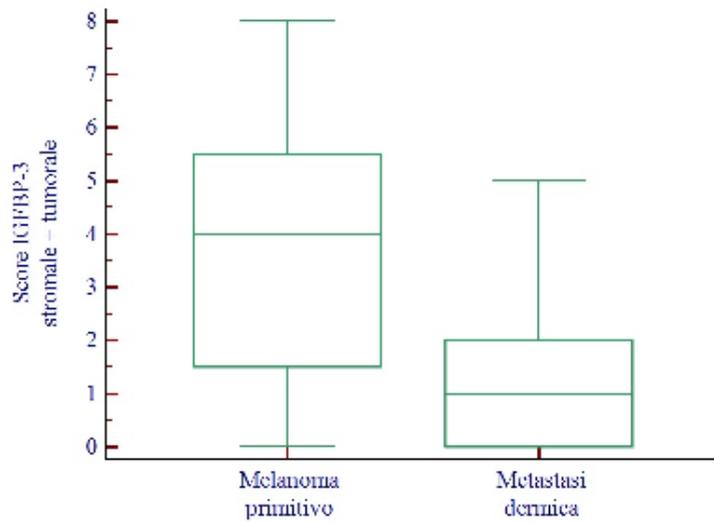
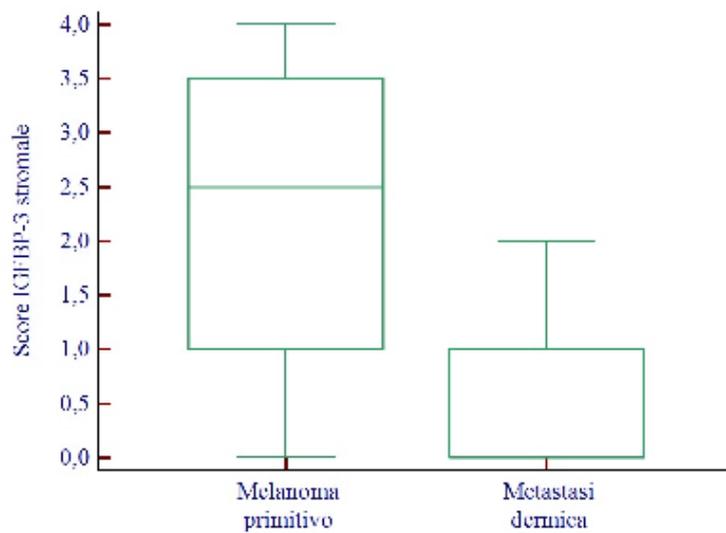


Figura 18: L'espressione di IGFBP-3 stromale è significativamente maggiore nei melanomi primitivi che nelle metastasi dermiche

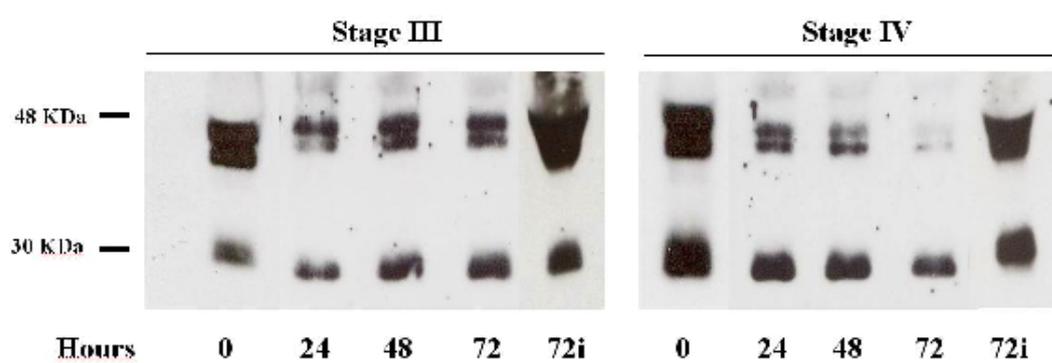


Nel siero dei pazienti al IV stadio di malattia la riduzione dei valori di IGFBP-3 è mediata da specifici processi proteolitici assenti nel siero dei pazienti in stadi 0-III.

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

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

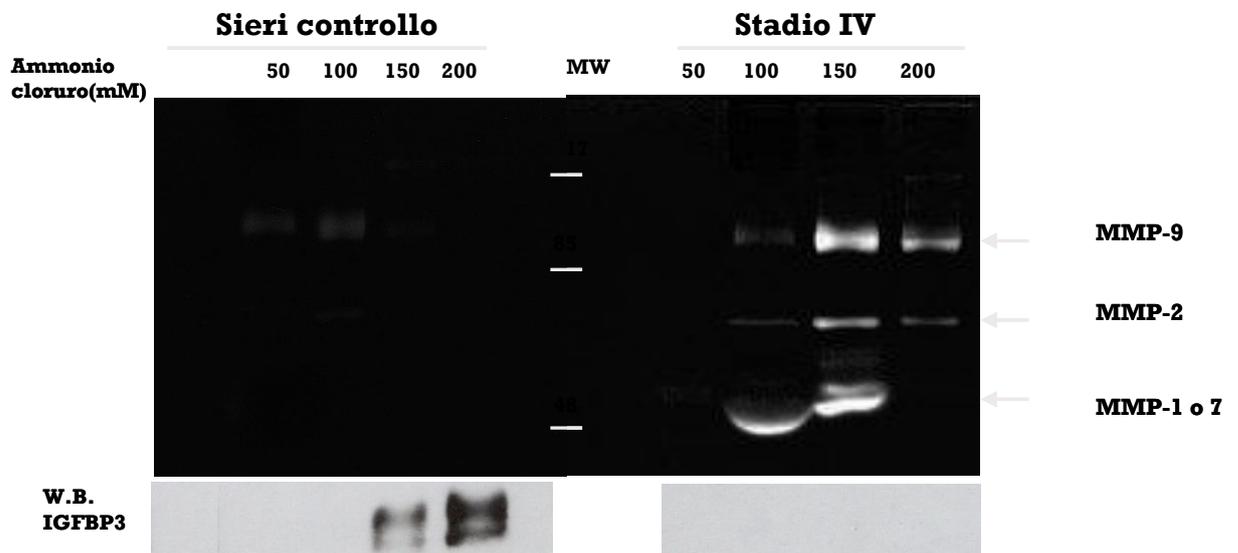
Figura 19: Clivaggio proteolitico dell'IGFBP-3 nel siero di un singolo paziente prelevato prima e dopo la progressione di malattia



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

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

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



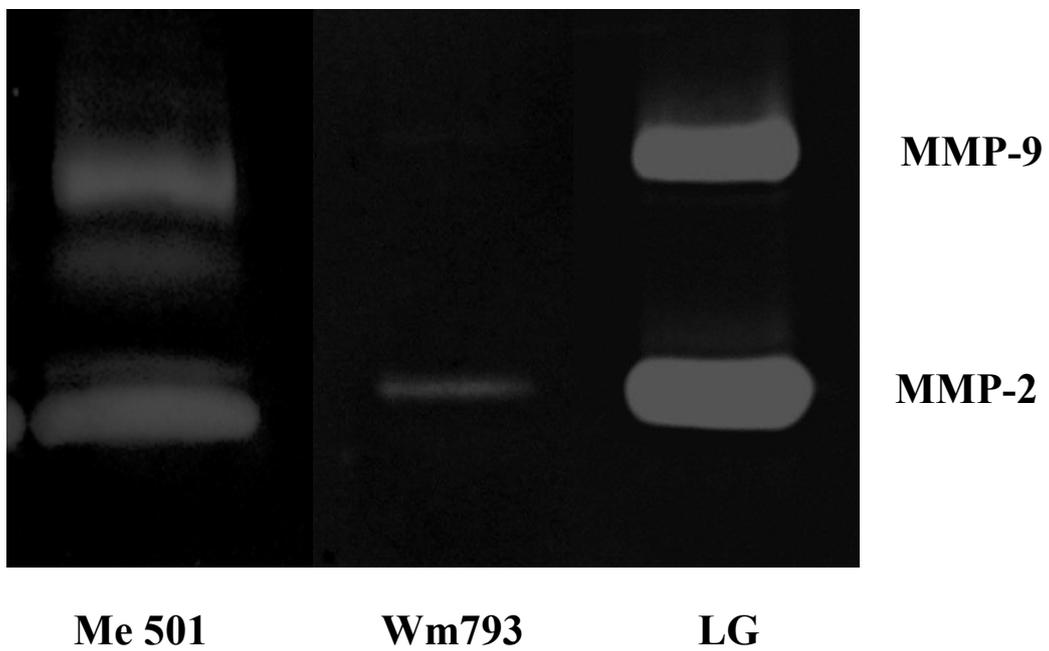
Le linee cellulari di melanoma producono metalloproteasi che degradano IGFBP-3.

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

Il test ha dimostrato che linee cellulari di melanoma metastatico producono una maggior quantità di proteasi che degradano IGFBP-3 rispetto alla linea di cellule di melanoma primitivo (figura 21) e la successiva zimografia ha mostrato la presenza delle metalloproteasi 2 e 9 (figura 22).

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

Medium serum-free(24h)



L'espressione di metalloproteasi 9, valutata in immunohistochimica, è maggiore nelle metastasi dermiche rispetto ai melanomi primitivi.

A conferma dei dati ottenuti tramite zimografia, abbiamo voluto verificare mediante immunohistochimica l'espressione della metalloproteasi 9 sui campioni di melanomi primitivi e metastasi dermiche. Come si può osservare dalla figura 23, lo score totale di MMP-9, considerando sia l'espressione dei melanociti che delle cellule stromali, è significativamente più alto nelle metastasi rispetto alle lesioni primitive ($P=0.0044$). In questo caso, valutando distintamente la positività per MMP-9 sia della componente tumorale che di quella stromale, entrambe correlano in modo statisticamente significativo con la natura primitiva o secondaria della lesione ($P=0.0409$ e $P=0.0338$) (figura 24-27).

Figura 23: L'espressione di MMP-9 è significativamente maggiore nelle metastasi dermiche che nei melanomi primitivi

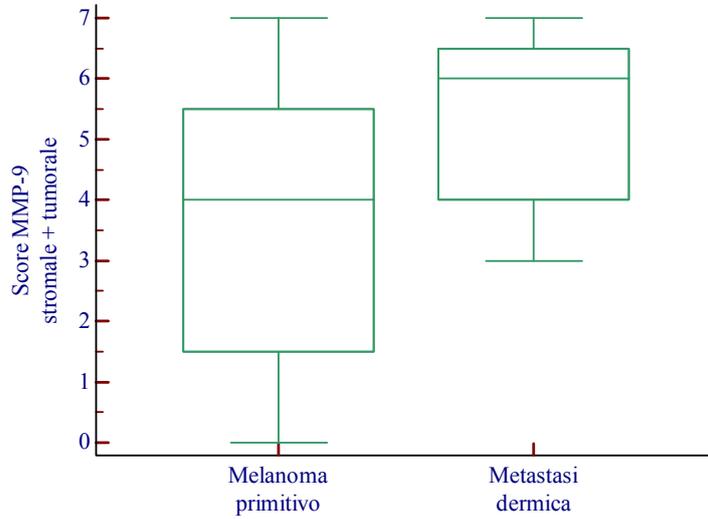


Figura 24: L'espressione di MMP-9 stromale è significativamente maggiore nelle metastasi dermiche che nei melanomi primitivi

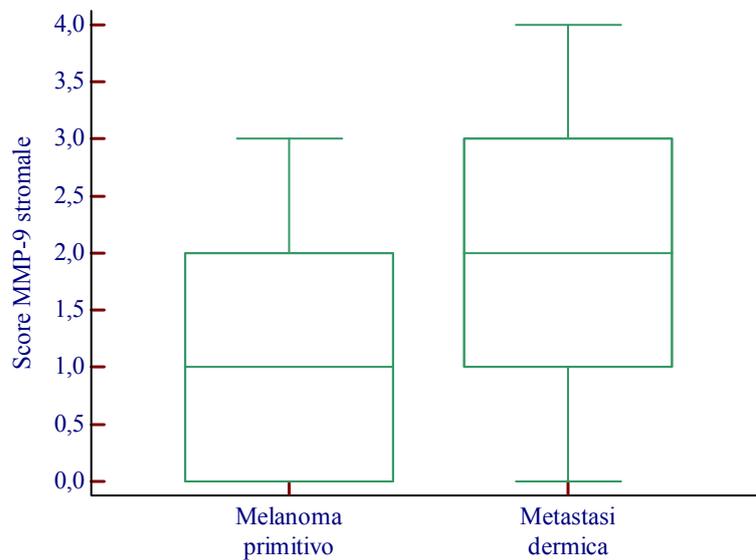


Figura 25: L'espressione di MMP-9 tumorale è significativamente maggiore nelle metastasi dermiche che nei melanomi primitivi

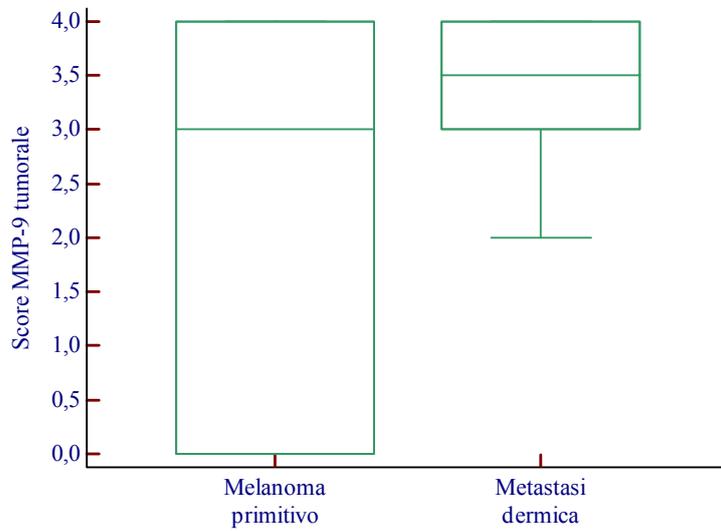


Figura 26: Espressione di MMP9 nei melanomi primitivi: MMP9 è espressa nelle cellule di melanoma ed a livello vasale

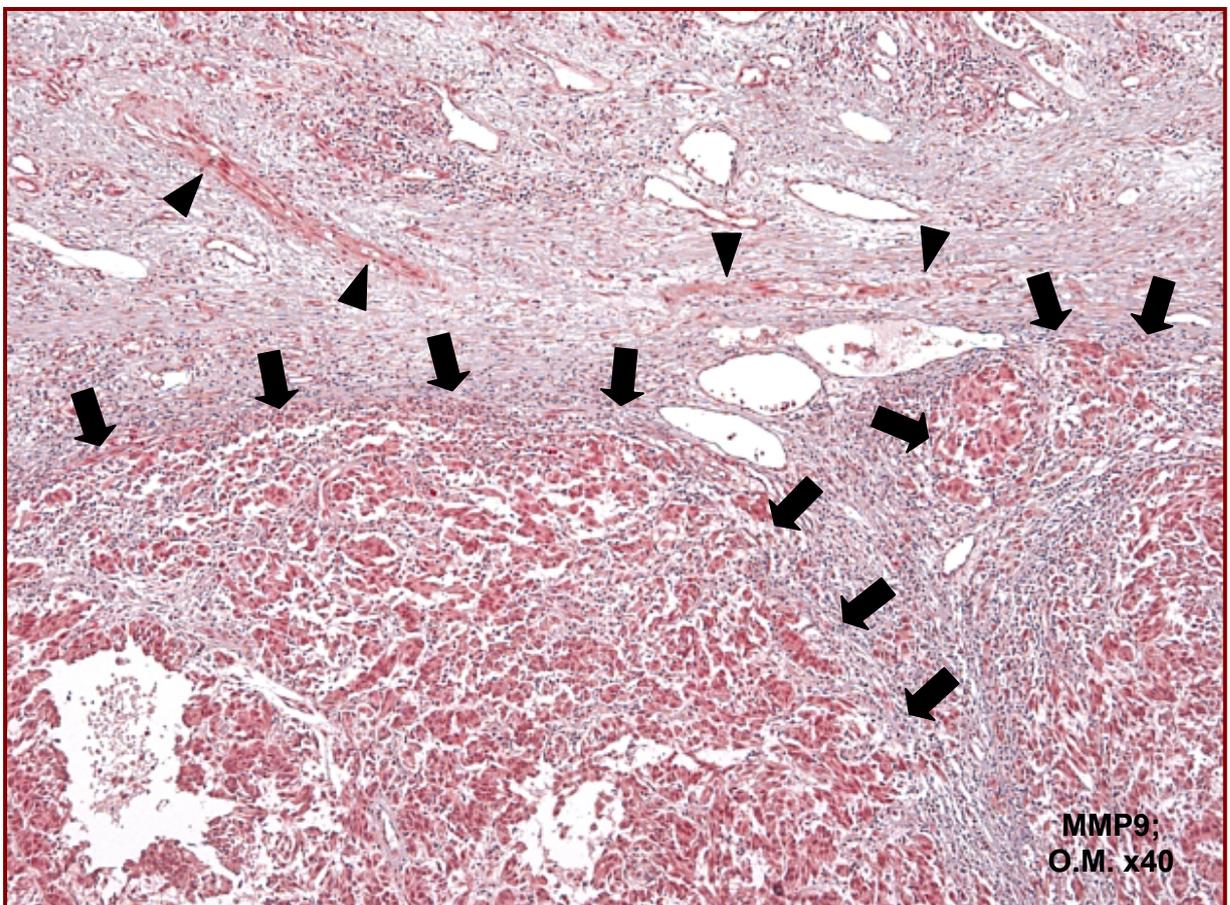
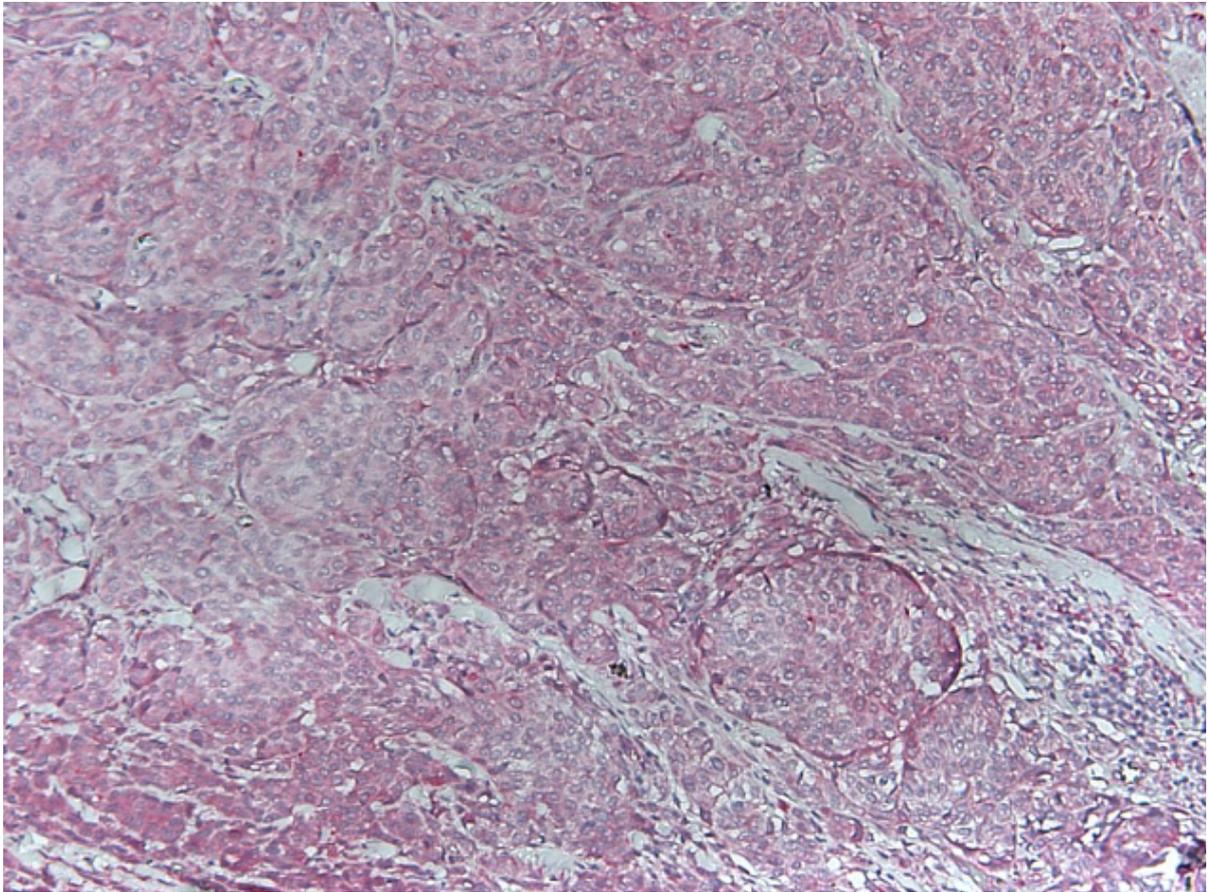


Figura 27: La MMP9 nelle metastasi dermiche è espressa sia a livello tumorale che stromale



La differente espressione compartimentale di IGFBP-3 e di MMP-9 correla con la natura della lesione.

La diversa espressione di IGFBP-3 e di MMP-9 nelle stesse aree di alcune sezioni valutate in immunohistochimica, può avvalorare l'ipotesi della degradazione di IGFBP-3 per mezzo di MMP-9. Quando viene considerata la positività per IGFBP-3 a livello stromale e quella di MMP-9 a livello tumorale come un'unica variabile, si può notare una fortissima correlazione, statisticamente significativa, con la natura primitiva o secondaria della lesione, $P=0.0001$ (figura 28-29).

Figura 28: Una minore espressione di IGFBP-3 stromale ed una maggiore immunoreattività di MMP-9 tumorale correlano con la natura della lesione

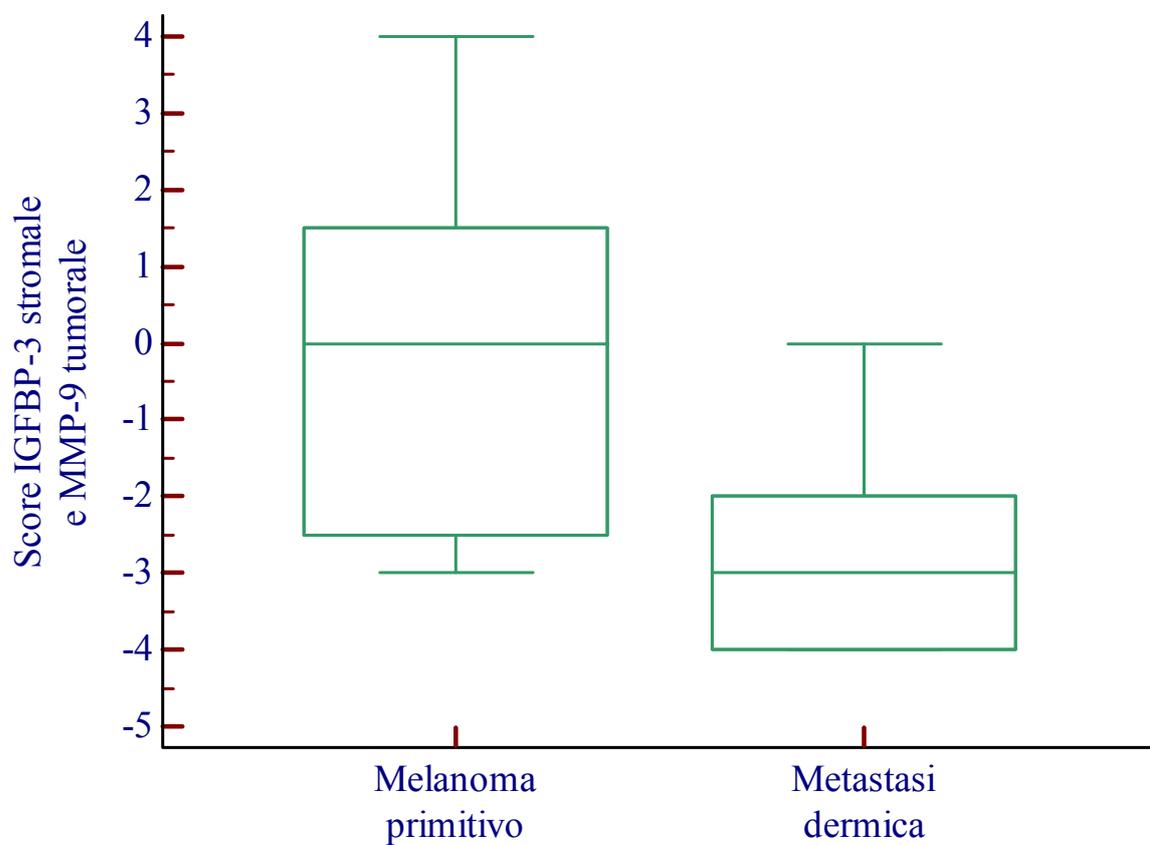
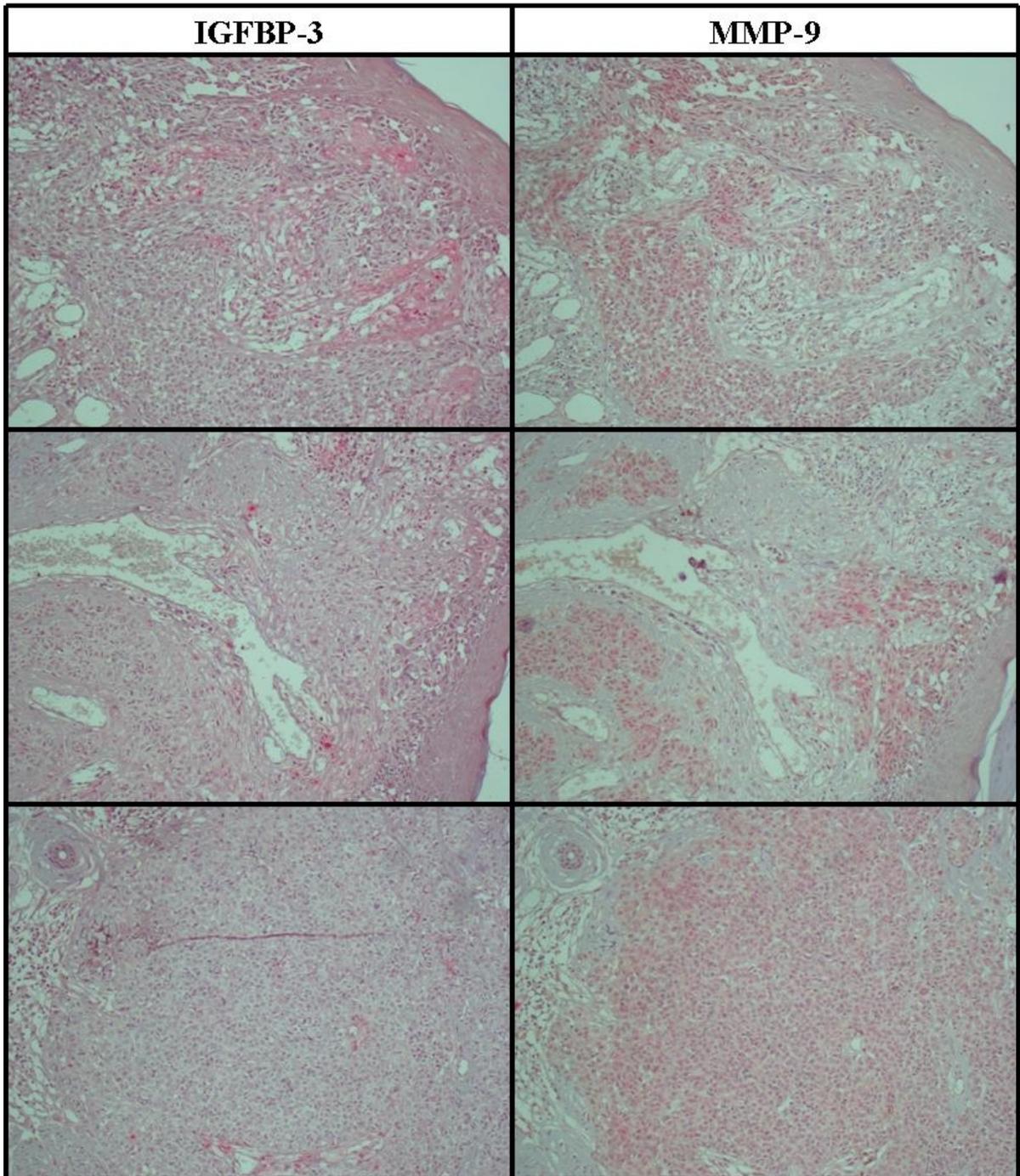


Figura 29: L'analisi immunoistochimica su sezioni parallele di melanomi primitivi e metastasi dermiche evidenzia un'inversa espressione di IGFBP-3 e MMP-9 nelle stesse aree considerate



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

E' stato effettuato lo scratch test sulle linee cellulari in studio (Wm-793, Me-501 ed LG) in condizioni basali per valutare la capacità e la cinetica di migrazione delle cellule appartenenti alle tre linee. A 24 ore sia le Me-501 che le LG mostravano di aver completamente richiuso la "ferita", mentre le Wm-793 non mostravano capacità migratoria (figura 30).

Abbiamo voluto valutare l'azione di IGFBP-3 ricombinante esogeno sulla motilità e sulla capacità di invasione delle cellule Me-501; è stato effettuato lo scratch test sulle cellule in condizioni basali e dopo è stato aggiunto IGFBP-3 ricombinante esogeno al dosaggio di 1,5µg/ml. A 24 ore abbiamo osservato che, in presenza di IGFBP-3, le cellule diminuiscono significativamente la motilità (figura 31). Poiché le cellule di melanoma producono piccole quantità di IGFBP-3, abbiamo eseguito anche l'esperimento opposto, cioè lo scratch test dopo l'aggiunta di un anticorpo specifico per IGFBP-3; il risultato ottenuto ha dimostrato che, in queste condizioni, le cellule riparano la "ferita" in poco tempo, confermando che l'inibizione della motilità cellulare è IGFBP-3 dipendente e che le cellule non solo riacquistano la motilità, ma perdono anche l'aderenza dal substrato rimanendo in sospensione; attraverso il test del Trypan blue abbiamo dimostrato che queste cellule sono comunque vitali (figura 32).

Figura 30: Scratch test su linee cellulari di melanoma

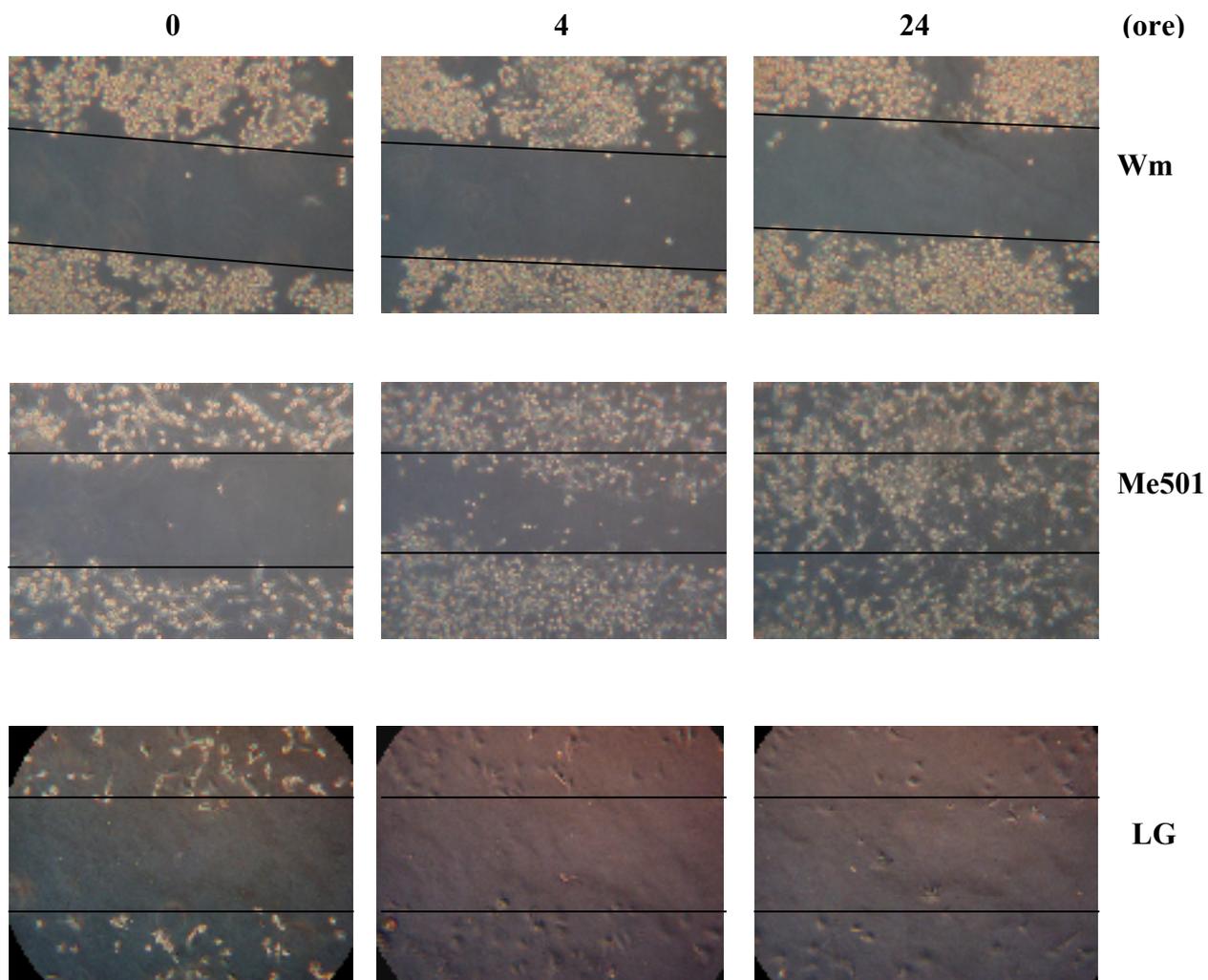


Figura 31: Scratch test su cellule Me-501 in assenza e dopo aggiunta di IGFBP-3 ricombinante e dopo aggiunta di un anticorpo specifico per IGFBP-3

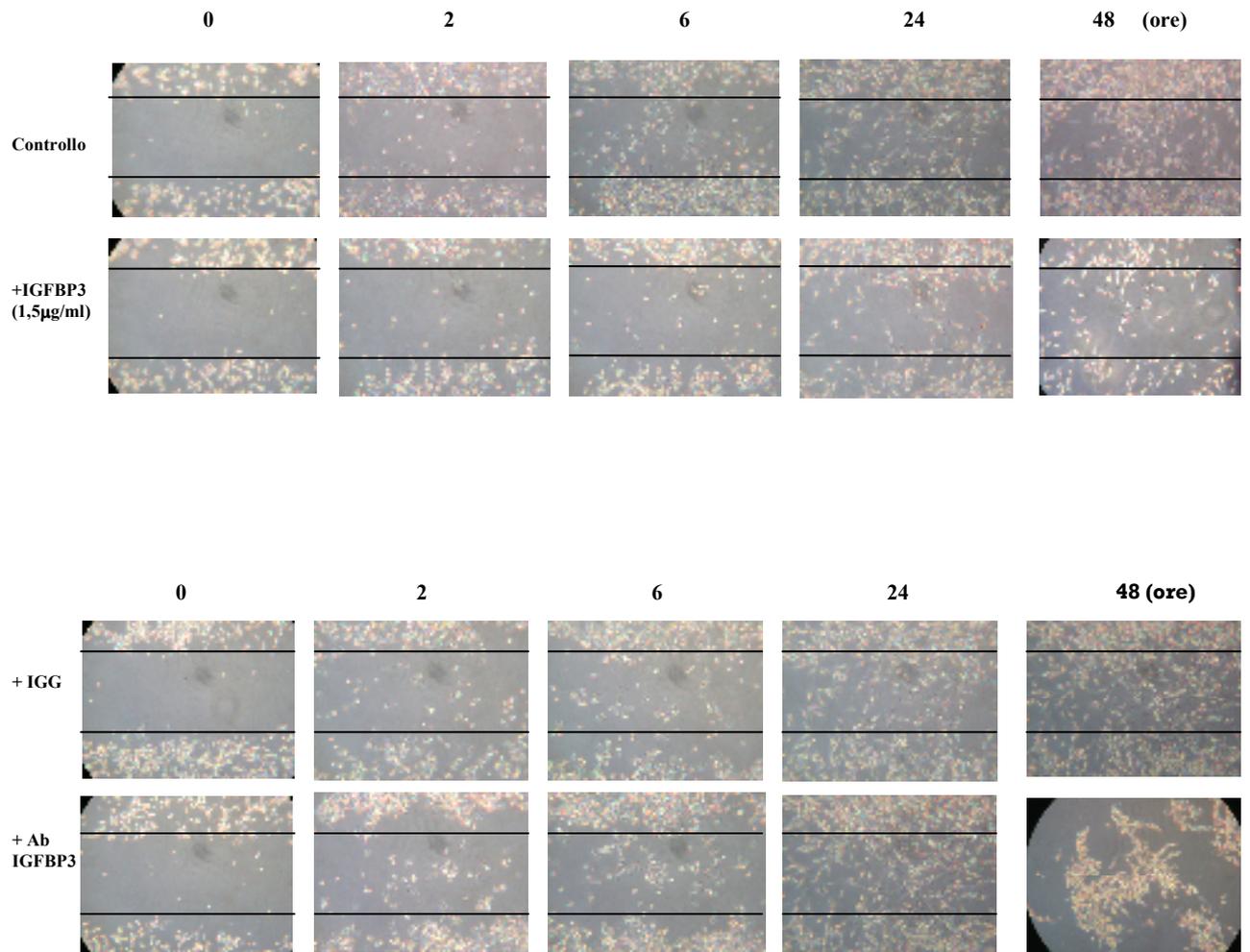
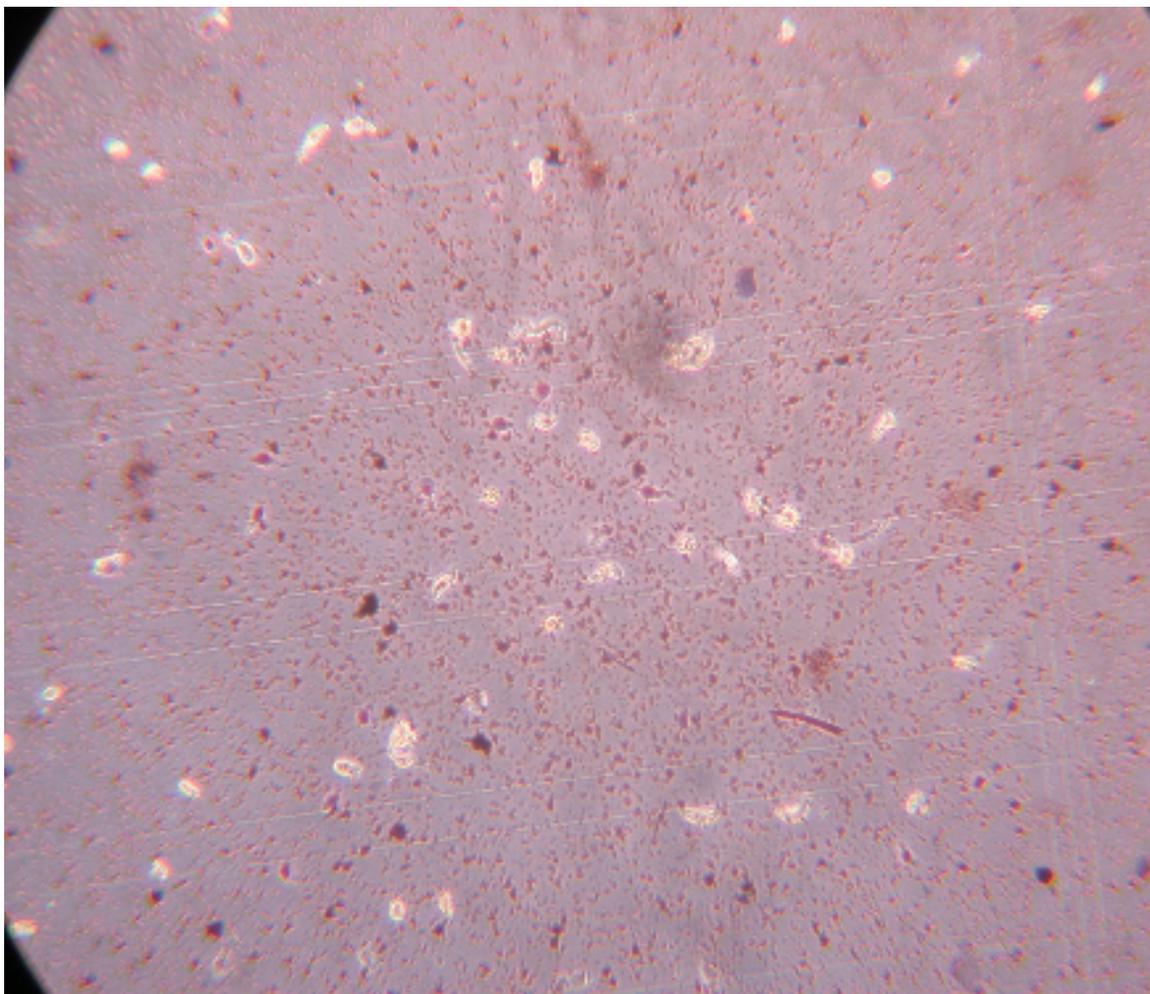


Figura 32: Test del Trypan blue



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

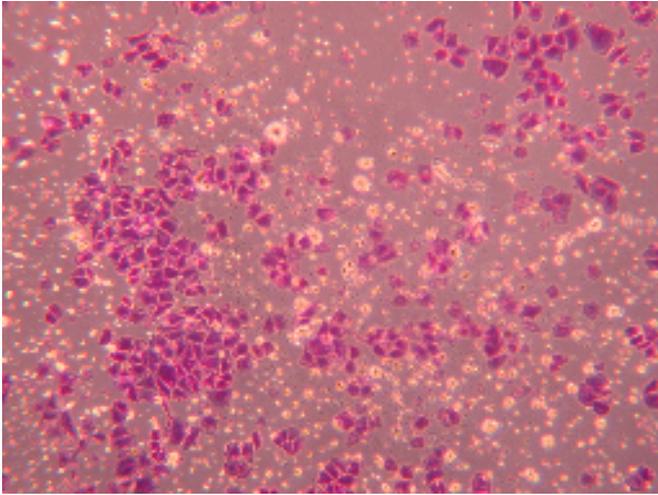
L'invasività delle cellule di melanoma è stata valutata con la metodica di invasione del Matrigel (strato di membrana basale ricostituita in vitro) adeso alla membrana di separazione tra il compartimento superiore ed inferiore di una camera di Boyden. La possibilità delle cellule di oltrepassare tale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

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

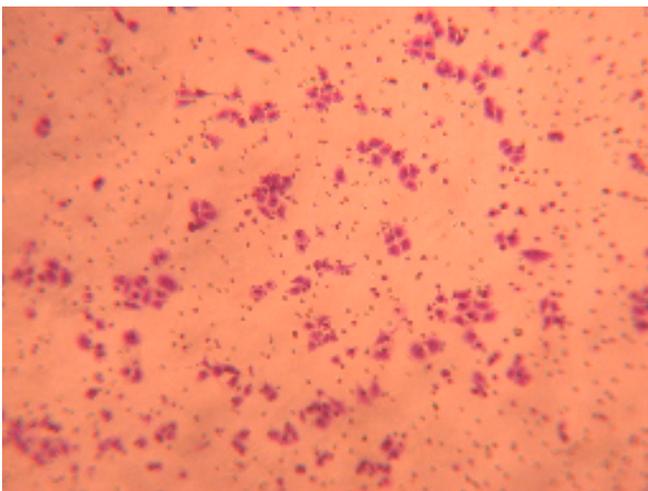
La capacità migratoria delle cellule Me-501 è risultata notevolmente diminuita in presenza di IGFBP-3 con un effetto correlato alla dose (figura 33).

Al contrario l'aggiunta di anticorpo anti-IGFBP-3 a dosi crescenti ne aumentava la capacità invasiva (figura 34).

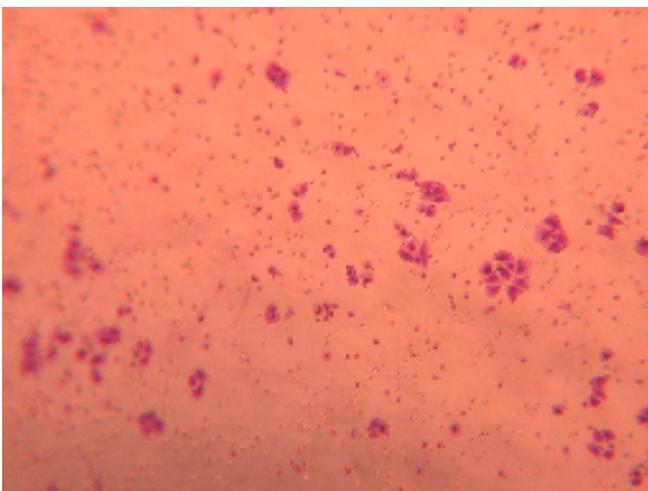
Figura 33: Test di invasione del Matrigel condotto su cellule Me-501 in assenza (A) e dopo aggiunta di IGFBP-3 ricombinante alla dose di 2,5µg/ml (B) e 5µg/ml (C)



A: Controllo

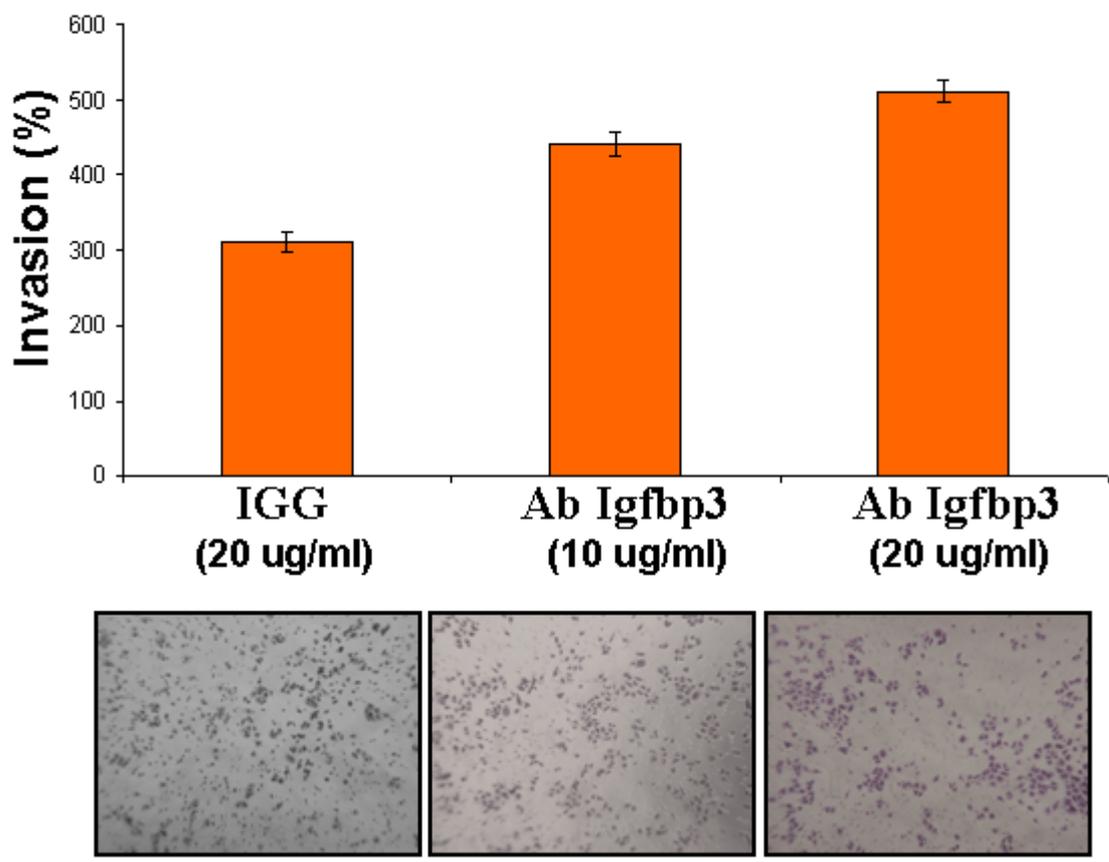


B: +IGFBP-3 alla dose di 2,5µg/ml



C: + IGFBP-3 alla dose di 5µg/ml

Figura 34: L'aggiunta di anticorpo anti-IGFBP-3 a dosi crescenti aumentava la capacità migratoria delle cellule Me501



IGFBP-3 aumenta la capacità di melanogenesi delle cellule Me501.

Attraverso un saggio dell'attività enzimatica della tirosinasi per la sintesi di melanina da parte delle cellule Me501, si è osservata un'attività di IGFBP-3 anche sulla melanogenesi. In particolare, si è visto che il lisato di cellule trattate a tempo 0 con 2 μ g/ml di IGFBP-3 e incubate per 48 ore senza siero con 10mM di L-dopa, un precursore della tirosina, produceva una quantità maggiore di melanina, circa 2,5 volte in più, rispetto al lisato di cellule non trattate con IGFBP-3, con un aumento di circa 1,5 volte dell'attività dell'enzima tirosinasi (figura 35). L'esperimento, eseguito in assenza di siero e quindi di IGF-1 esogeno, ha permesso di escludere l'azione di IGF-1 sull'incremento della melanogenesi, confermando l'ipotesi di un'attività IGFBP-3 dipendente. Questo dato è stato ulteriormente confermato dall'analisi dei lisati cellulari provenienti dai tumori xenotrapiantati nei quali il campione trattato con IGFBP-3 aveva un'attività tirosinasiica maggiore del 50% (figura 36).

Figura 35: Valutazione dell'attività tirosinasi delle cellule Me501 in assenza di siero e trattate con IGFBP-3

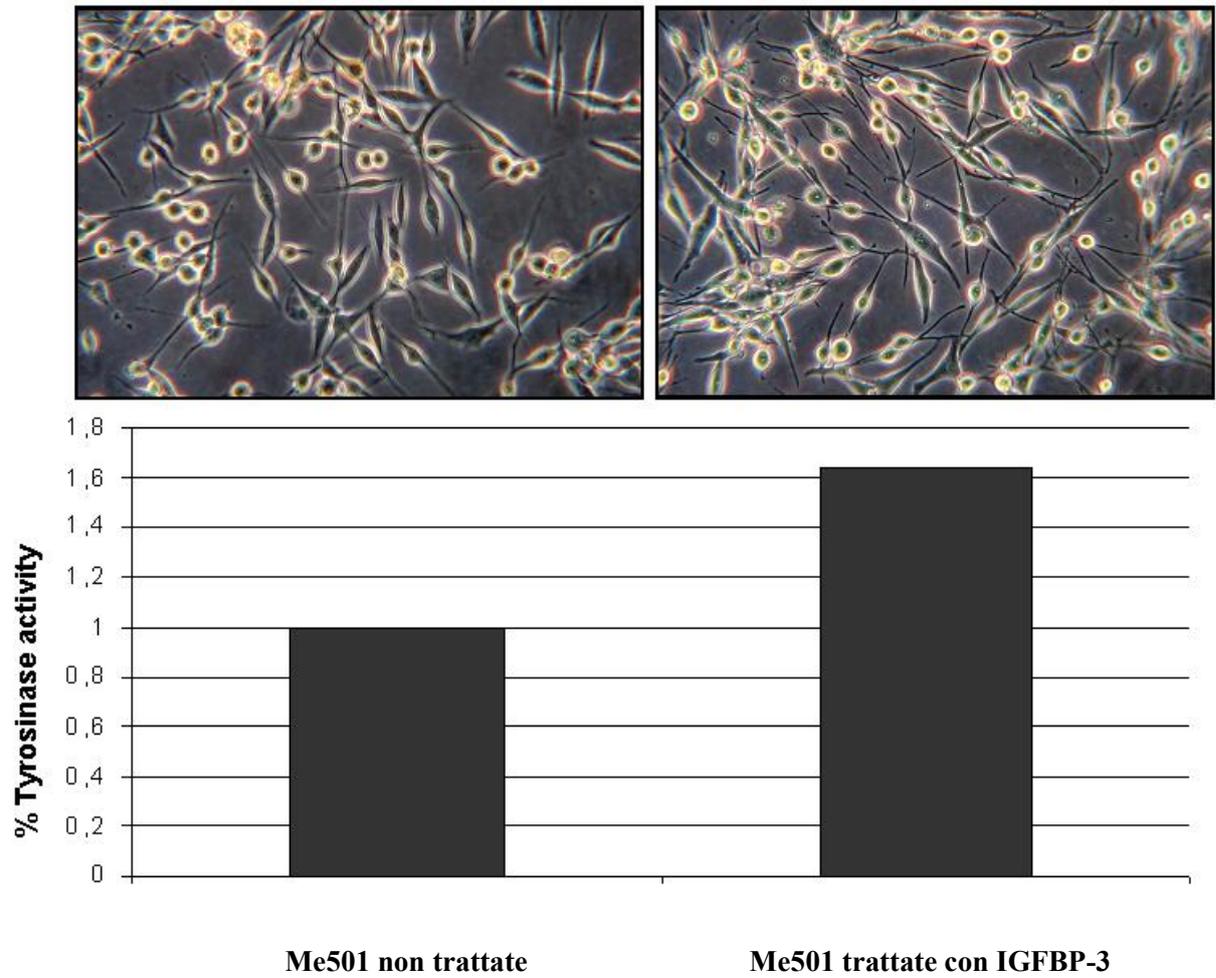
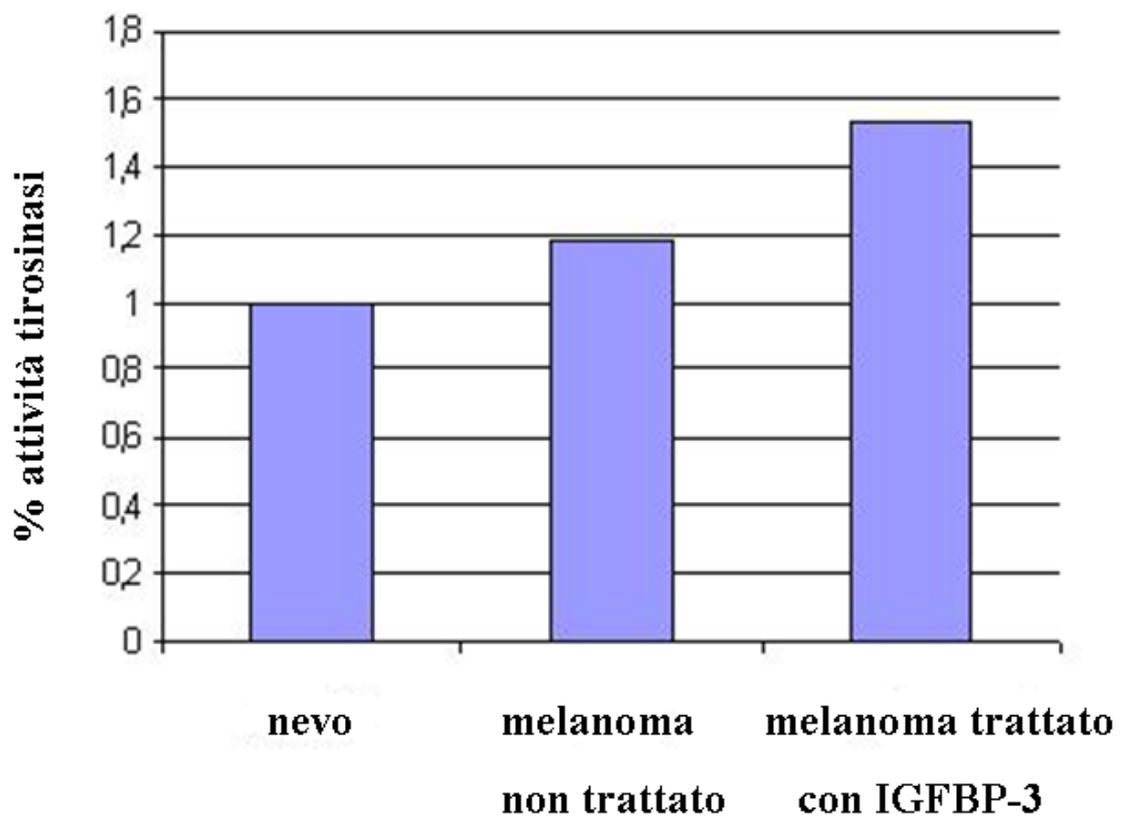


Figura 36: Valutazione dell'attività tirosinasi in un nevo dermico ed in cellule Me501 di tumori xenotrapiantati in modelli murini SCID senza e con trattamento con IGFBP-3



La positività immunoistochimica per IGFBP-3 a livello tumorale correla con la pigmentazione del tumore primitivo.

Il dato osservato a livello cellulare della maggiore capacità di sintetizzare melanina da parte delle cellule Me501 trattate con IGFBP-3 è in accordo con il dato, osservato in immunoistochimica, che la maggior positività delle cellule tumorali e stromali all'IGFBP-3 determina un'aumentata pigmentazione del campione biologico osservato ($P=0.0470$). In dettaglio, si può notare che solo l'espressione di IGFBP-3 all'interno delle cellule di melanoma, rispetto a quelle stromali, è statisticamente correlata con la pigmentazione e quindi con la sintesi di melanina nei tessuti analizzati ($P=0.0079$ a livello tumorale e $P=0.4043$ a livello stromale) (figura 37-39).

Figura 37: Correlazione tra positività immunoistochimica all'IGFBP-3 delle cellule tumorali e pigmentazione del tumore

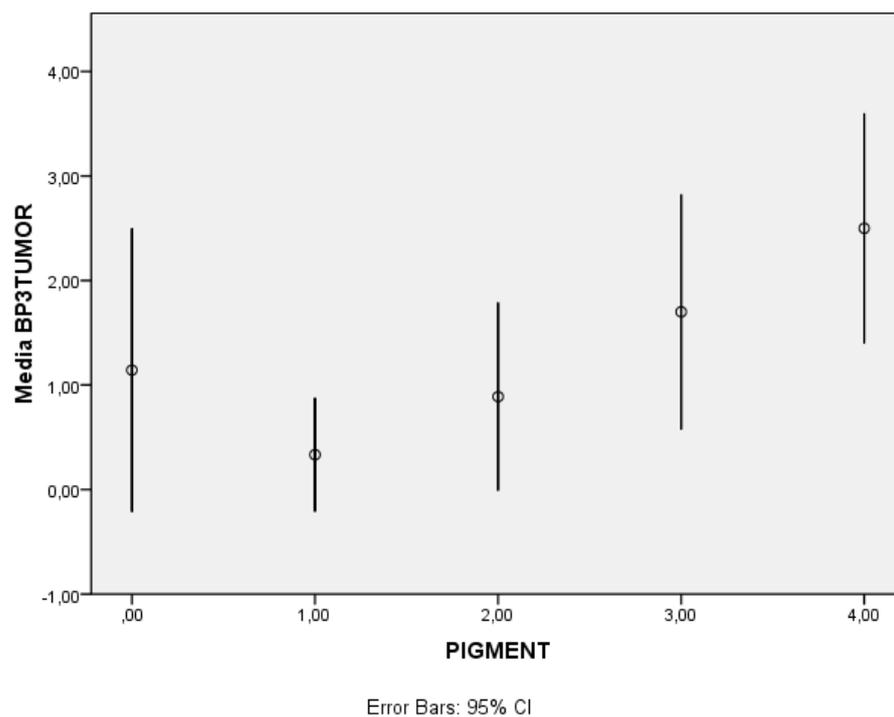


Figura 38: La pigmentazione correla con la positività immunohistochimica per IGFBP-3 delle cellule tumorali (Ingrandimento 20x)

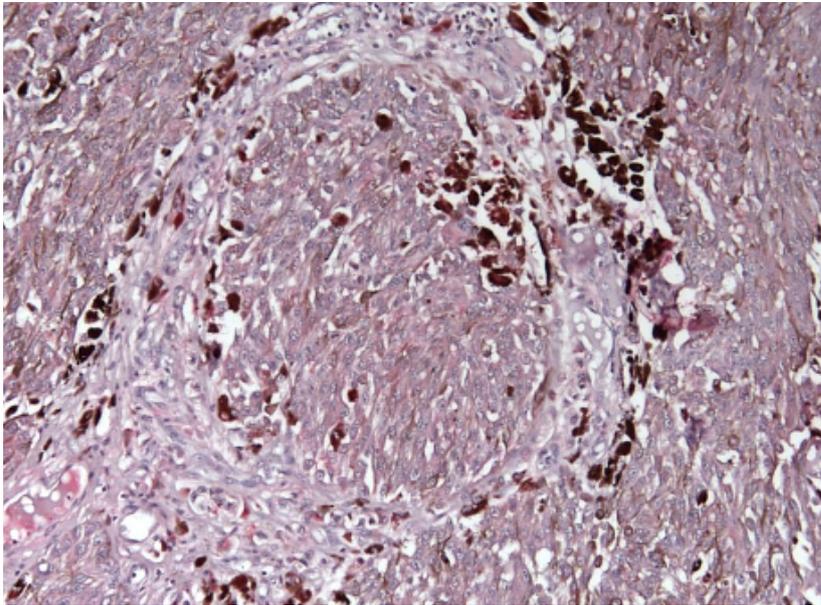
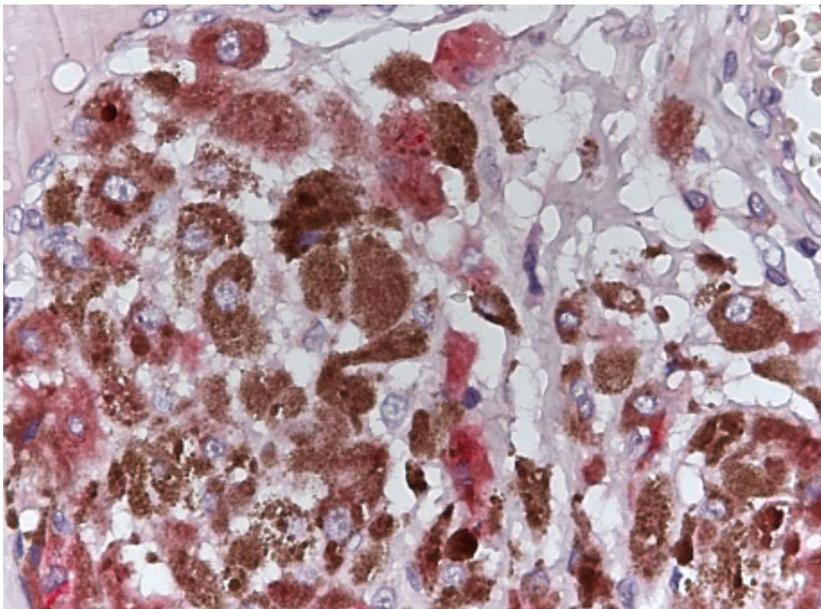


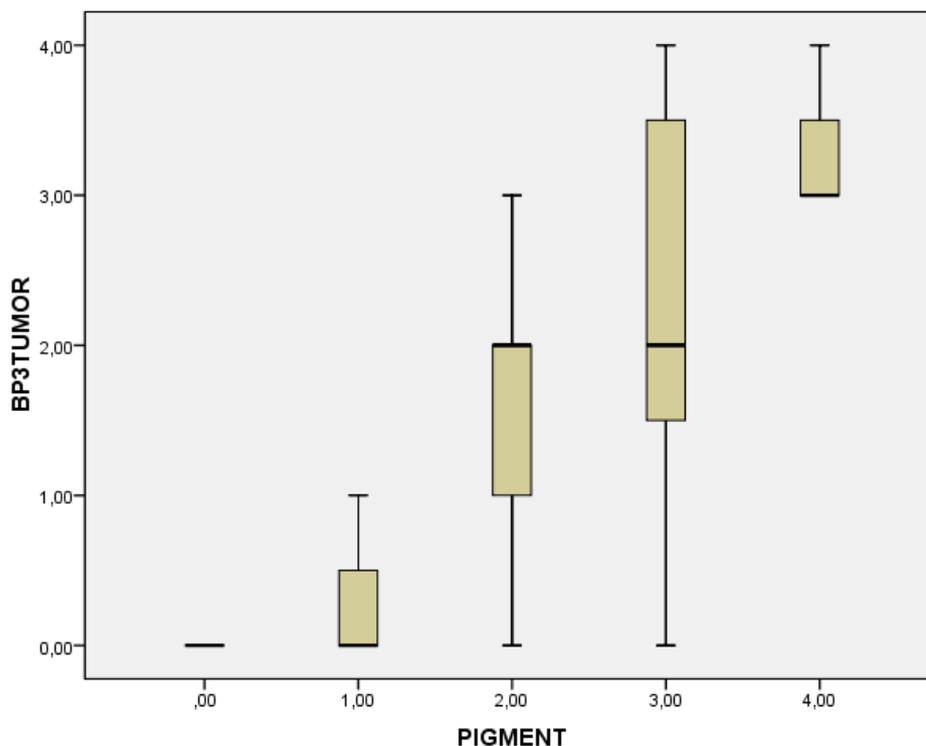
Figura 39: Espressione di IGFBP-3 in cellule di melanoma intensamente pigmentate (Ingrandimento 40x)



Questo dato è maggiormente significativo quando analizziamo esclusivamente la positività per IGFBP-3 nelle lesioni primitive ($P=0.0018$) ed è ancor più netto se si considera la positività delle solo cellule tumorali ($P=0.0004$). (figura 40).

Nessuna correlazione statisticamente significativa si osserva, invece, tra la positività delle cellule tumorali e stromali per MMP-9 e la pigmentazione.

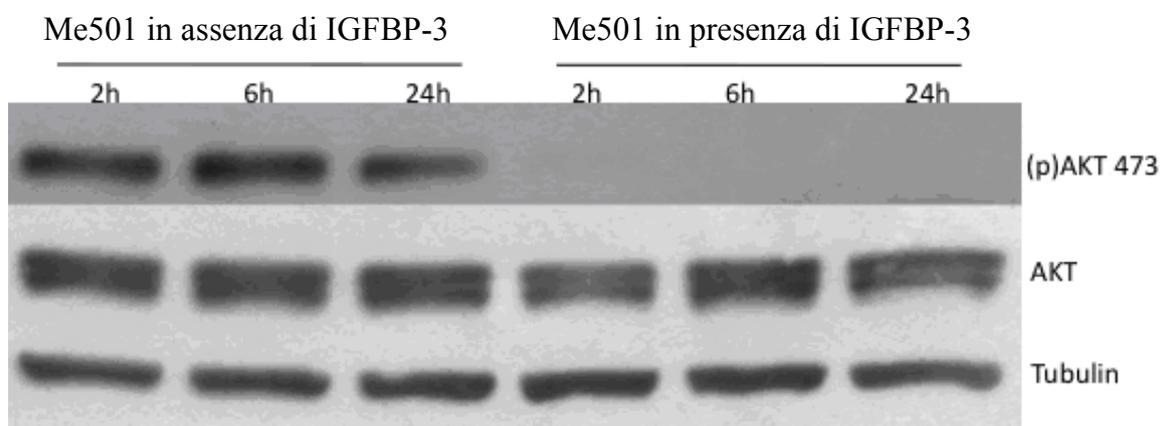
Figura 40: Correlazione tra positività immunoistochimica all'IGFBP-3 delle cellule tumorali con la pigmentazione del tumore primitivo



Influenza del trattamento con IGFBP-3 sul pathway dell'Akt.

L'effetto di IGFBP-3 su Akt è stato analizzato, mediante WB, su linee cellulari di melanoma metastatico (Me501) trattate con IGFBP-3 e valutate a diversi intervalli di tempo. Come mostrato nella figura 41, lo stato di attivazione di Akt, valutato mediante la presenza di fosforilazione nel sito Ser 473, era completamente assente dopo 2 ore dal trattamento con IGFBP-3, perdurando per 24 ore a fronte di una quantità stabile di proteina totale, indicando che IGFBP-3 non ha effetti né sull'espressione né sulla stabilità della proteina. Questi risultati suggeriscono che l'iperattivazione di Akt, attraverso la fosforilazione di Ser 473, presente prevalentemente nelle cellule di melanoma metastatico, rappresenti un importante evento nella transizione tra melanoma primitivo e metastatico, modulando la motilità e la capacità invasiva della cellula.

Figura 41: WB sul sovranatante di cellule Me501 in assenza e in presenza di IGFBP-3



Studio su tumori xenotrapiantati in modelli murini: il volume tumorale nei topi trattati è risultato inferiore a quello del gruppo di controllo.

L'andamento della crescita tumorale misurato ad intervalli costanti si è dimostrato nettamente differente nei tre gruppi considerati (figura 42); in particolare, al termine dell'esperimento, la media del volume dei tumori impiantati nel gruppo di controllo era maggiore di quella dei due gruppi trattati ($64,12\text{mm}^3$ vs $31,56\text{mm}^3$) con una differenza, calcolata con test T di Student, statisticamente significativa ($P=0.0411$). Inoltre, questa differenza è risultata ancora più significativa comparando il gruppo controllo ($64,12\text{mm}^3$) col gruppo che aveva ricevuto la somministrazione di IGFBP-3 contestualmente all'inoculo delle cellule tumorali ($P=0.0408$) (figura 43). La percentuale di necrosi tumorale calcolata sulle sezioni colorate con ematossilina-eosina, pur risultando più alta nei tumori trattati rispetto ai non trattati (14,38% vs 9,3%) non è risultata statisticamente significativa, $P=0.4570$ (figura 44). Valutando la positività delle cellule tumorali per Akt fosforilata in posizione Ser 473 e quindi iperattivata, pur se non in modo statisticamente significativo, si può notare come le medie di immunoreattività dei gruppi trattati risultino inferiori rispetto a quella del gruppo di controllo (57% vs 73,25%) (figura 45).

Figura 42: Immagine macroscopica di tre tumori (uno per gruppo) immediatamente successiva all'espianto

Gruppo A: Controllo

Gruppo B: Trattati con IGFBP-3 dal momento dell'inoculo delle cellule Me501

Gruppo C: Trattati con IGFBP-3 dopo una settimana dall'inoculo delle cellule Me501



Figura 43: Rappresentazione grafica del volume tumorale medio nei tre gruppi considerati

Gruppo A: Controllo

Gruppo B: Trattati con IGFBP-3 dal momento dell'inoculo delle cellule Me501

Gruppo C: Trattati con IGFBP-3 dopo una settimana dall'inoculo delle cellule Me501

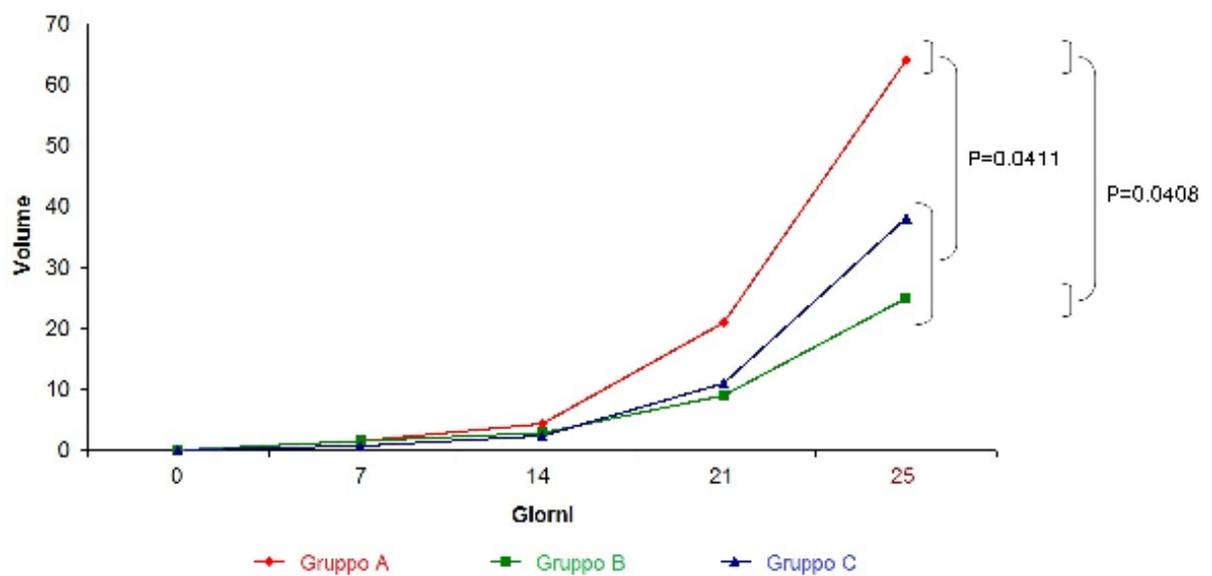


Figura 44: Immagine in ematossilina-eosina di due tumori, rispettivamente del gruppo trattato con IGFBP-3 dal momento dell'inoculo e del gruppo di controllo. L'area di necrosi è delimitata dalla linea rossa

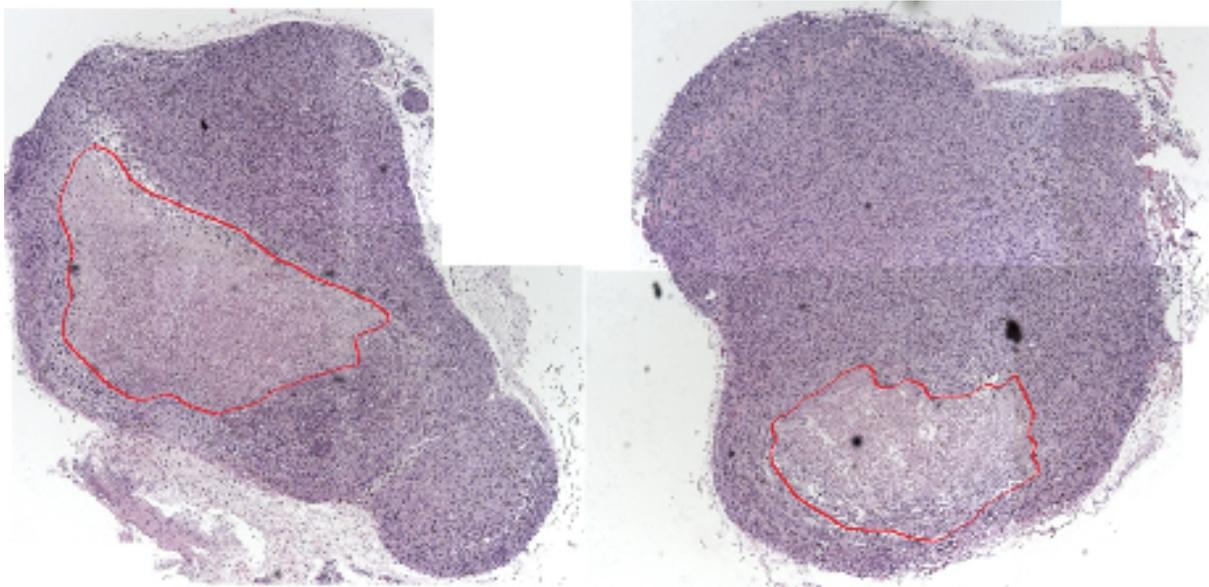
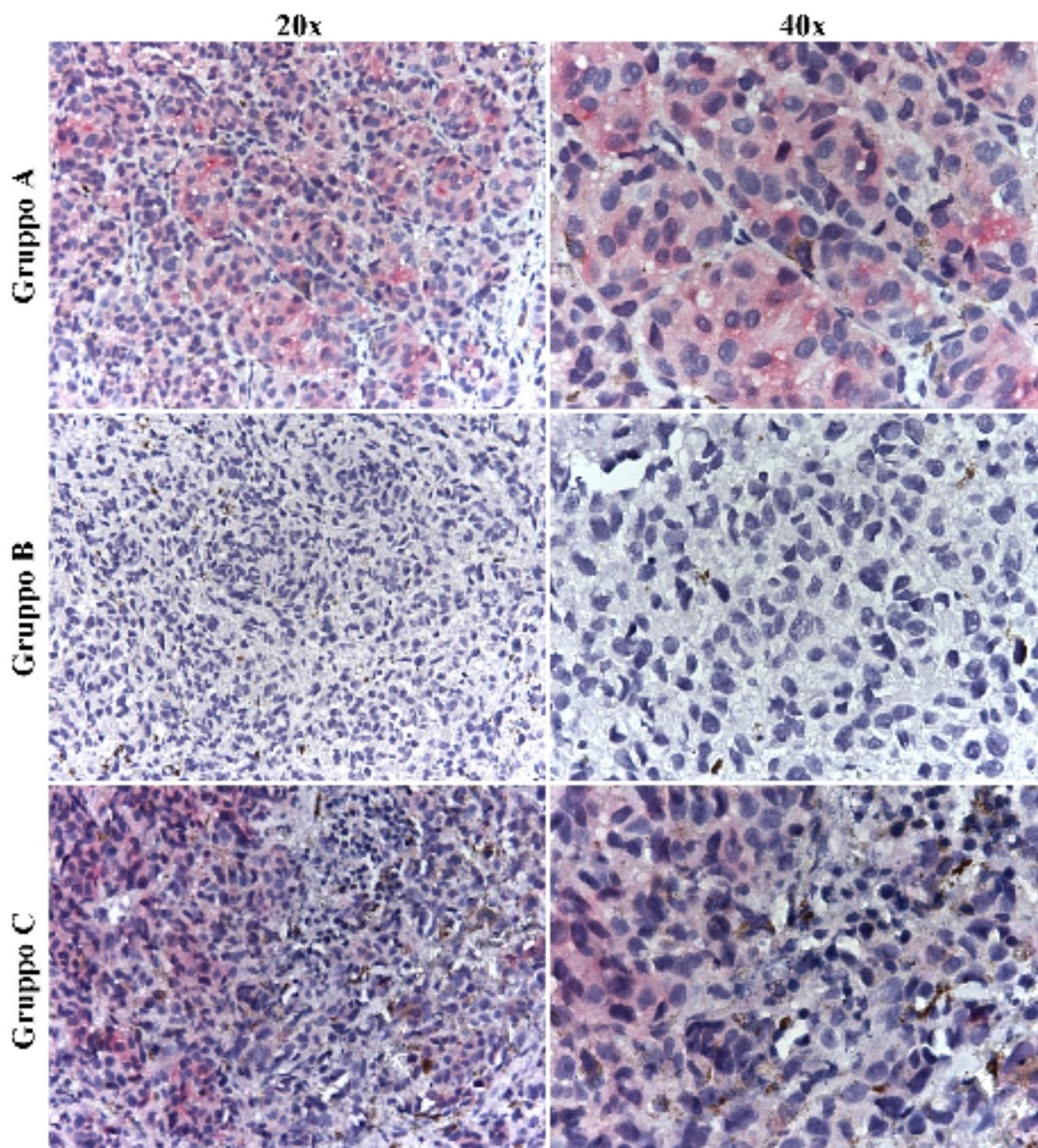


Figure 45: Different immunoreactivity for Akt in the three groups in examination observed at different magnifications



L'indice proliferativo, valutato mediante l'espressione dell'antigene Ki-67 da parte delle cellule tumorali, è risultato aumentato nei tumori del gruppo non trattato rispetto ai gruppi sottoposti a trattamento con IGFBP-3 (31,45% vs 13,5%); questa differenza è statisticamente significativa, $P=0.0062$ (figura 46). Come si può evincere dalla tabella 5, questo dato è confermato anche analizzando singolarmente i due gruppi trattati rispetto al gruppo di controllo (figura 47).

Figura 46: Rappresentazione delle percentuali di positività per Ki-67 nei tre gruppi esaminati

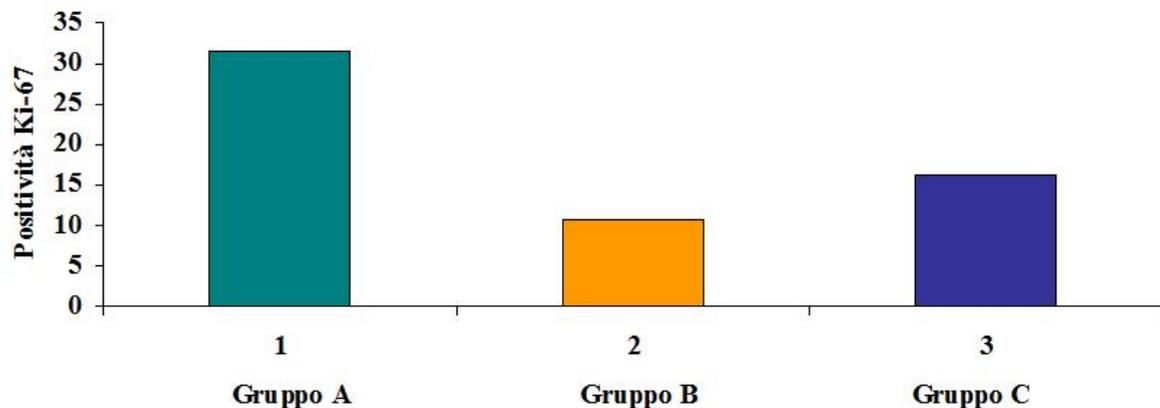
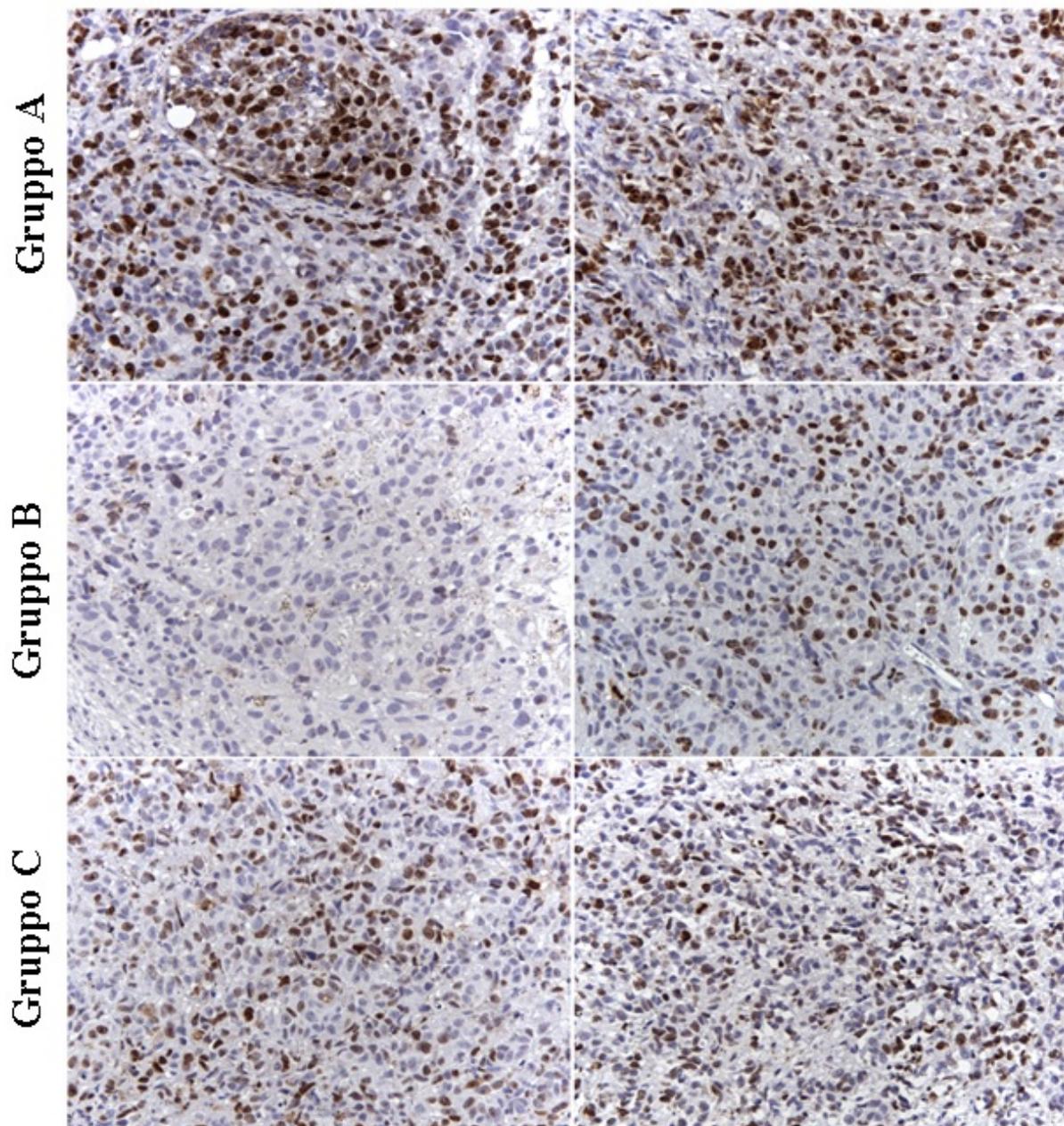


Tabella 5 : Correlazione tra i tre gruppi considerati e le variabili analizzate mediante test T di Student

Variabili	Media	P value
Volume tumore		
A	64,12	
B	25,37	P = 0.0411
C	37,75	P = 0.1374
B+C	31,56	P = 0.0408
% Necrosi tumore		
A	09,2992	
B	11,6054	P = 0.7960
C	17,1468	P = 0.3956
B+C	14,3761	P = 0.4570
% p-Akt		
A	73,25	
B	63,25	P = 0.6301
C	50,75	P = 0.1517
B+C	57,00	P = 0.3299
% Ki-67		
A	31,45	
B	10,82	P = 0,0303
C	16,17	P = 0,0220
B+C	13,50	P = 0,0062

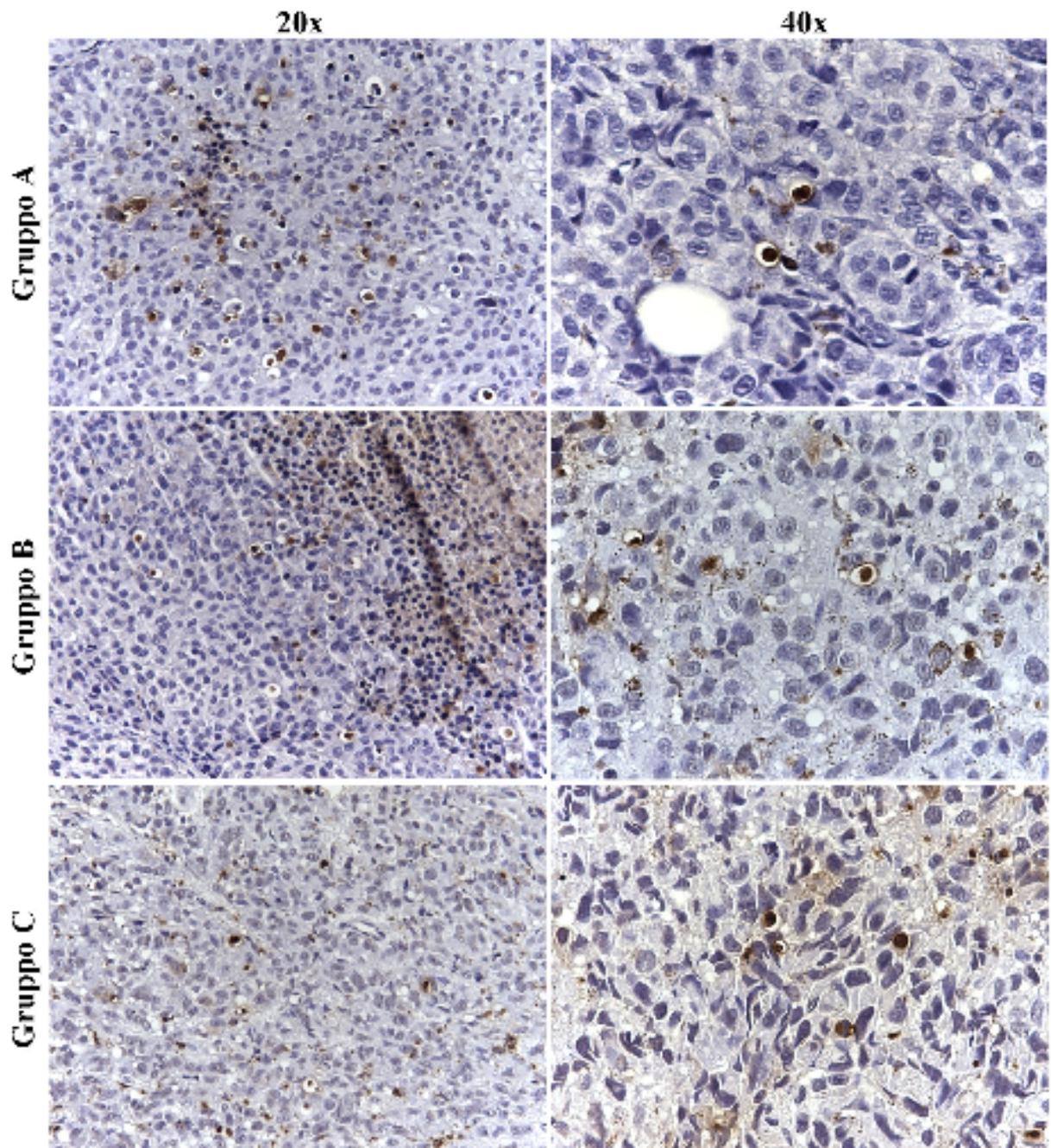
Figura 47: Differente grado di immunoreattività per Ki-67 nei tre gruppi esaminati.

Ingrandimento 20x



Nessuna differenza statisticamente significativa è emersa dal calcolo dell'indice apoptotico mediante metodica TUNEL tra i tre gruppi in esame (figura 48).

Figura 48: Presenza di cellule apoptotiche osservabili, a diversi ingrandimenti, mediante tecnica Tunel nei tre gruppi considerati nello studio



Studio su tumori xenotrapiantati in modelli murini: la β -catenina gioca un ruolo importante nella capacità metastatica delle cellule di melanoma

Abbiamo misurato la crescita neoplastica che si è verificata nei topi in seguito alla somministrazione, di quantità differenti di IGFBP-3, allo scopo di valutare un'eventuale correlazione tra la quantità di IGFBP-3 somministrata e la crescita tumorale.

In tabella 6 sono esposti i valori ottenuti da questo ulteriore studio sul modello murino; come già precedentemente descritto, le cavie sono state suddivise in tre gruppi, indicati con "A" (controlli), "B" (topi trattati con IGFBP-3 a basso dosaggio), "C" (topi trattati con IGFBP-3 ad alto dosaggio). Per ciascun topo è stato misurato il volume del tumore asportato, i cui valori medi sono 126,56 mm³ per il gruppo controllo, 6,82 mm³ per il gruppo di cavie trattate con alto dosaggio di IGFBP-3 (37,5µg) e 51,04 mm³ per il gruppo di topi trattati con basso dosaggio di IGFBP-3 (7,5µg); in totale, la media dei volumi di tutti i topi trattati, indipendentemente dal dosaggio di IGFBP-3, è di 26,47 mm³, comunque inferiore al volume totale dei topi controllo.

Come si evince, in modo assolutamente euristico, sempre dalla figura 49, esiste una correlazione inversa, statisticamente significativa tra la quantità di IGFBP-3 somministrata e la crescita tumorale; utilizzando il test T di Student abbiamo valutato la significatività dei valori ottenuti, che sono risultati statisticamente differenti, in modo significativo, tra il gruppo controllo e il gruppo totale di topi

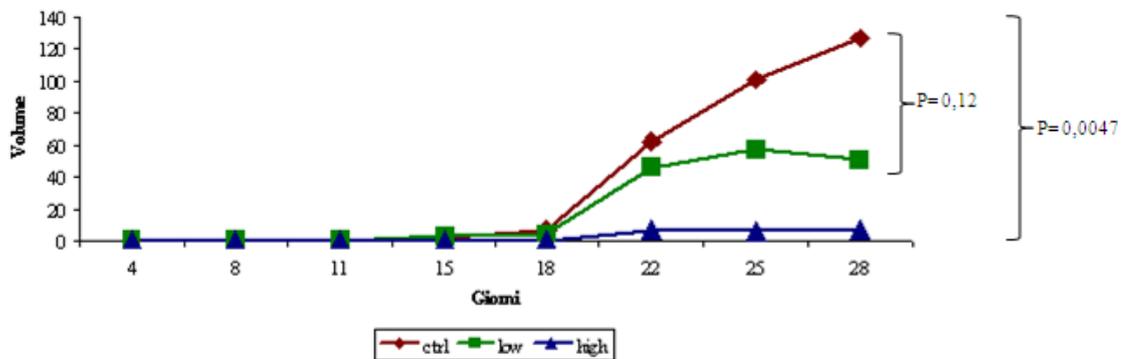
trattati (P= 0,0072), indipendentemente dal dosaggio; la significatività statistica, infine, aumenta ulteriormente nei confronti delle cavie ipertrattate (P=0,0047).

Tabella 6: volume dei tumori asportati; A: controlli; B: topi trattati con 7,5µg/ml di IGFBP-3; C: topi trattati con 37,5µg/ml di IGFBP-3

GRUPPO	MEDIA VOLUME TUMORE	P VALUE
A	126, 56 mm ³	
B	51,04 mm ³	P=0,12
C	6,82 mm ³	P=0,0047
B+C	26,475 mm ³	P=0,0072

Figura 49: Rappresentazione grafica del volume tumorale medio nei tre gruppi

Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Trattati con 37,5µg/ml di IGFBP-3; Gruppo C: Trattati con 7,5µg/ml di IGFBP-3



Contestualmente, nei campioni sierici analizzati, abbiamo osservato anche una certa riduzione dei livelli di β -catenina, il che potrebbe spiegare, almeno in parte, la riduzione del volume del tumore osservato nelle cavie trattate con IGFBP-3.

Per validare questa ipotesi, abbiamo effettuato ulteriori esperimenti. Innanzitutto, tramite western blot, è stata valutata l'attività di GSK3 β che, come abbiamo precedentemente descritto, è un fattore fondamentale nell'ambito della degradazione della β -catenina; è stato possibile osservare che il trattamento con IGFBP3 è in grado di attivare GSK3 β indipendentemente dalla presenza o meno di siero 10%; di conseguenza, è possibile ipotizzare che l'attività di GSK3 β possa dipendere da ulteriori fattori, che abbiamo cercato di indagare.

Innanzitutto è stata effettuata una prova aggiungendo litio alle cellule, sia trattate che non trattate. Il litio è l'inibitore di GSK3 β meglio caratterizzato (188) ed è in grado di disattivarlo (ossia di fosforilarlo) sia in assenza che in presenza di siero (figura 50); questo, di conseguenza, comporta una modulazione anche della β -catenina.

Una prova ulteriore di questo fenomeno si ottiene confrontando le linee cellulari Wm793 (primitive) e Me501 (metastatiche): come è facile aspettarsi, la β -catenina non è presente, fisiologicamente, nelle cellule di melanoma primitivo, mentre la sua espressione diventa evidente nelle cellule metastatiche; in seguito

a trattamento con IGFBP-3, la β -catenina appare ridotta sia a 24 che a 48 ore, fenomeno dimostrato dalla corrispondente attivazione di GSK3 β .

Inoltre, valutando l'espressione di β -catenina nucleare (poiché, ricordiamo, è la β -catenina nucleare ad agire come fattore neoplastico), abbiamo dimostrato come essa diminuisca nelle cellule trattate con IGFBP-3 (figura 51).

Anche l'esame immunostichimico mostra una riduzione della β -catenina (figura 52), a ulteriore dimostrazione dell'attività del trattamento con IGFBP-3.

Figura 50: l'attività di GSK3 β è invariata nelle cellule trattate e in quelle non trattate sia in presenza che in assenza di siero 10%; l'aggiunta di litio modula l'espressione di GSK3 β e, conseguentemente, anche di β -catenina

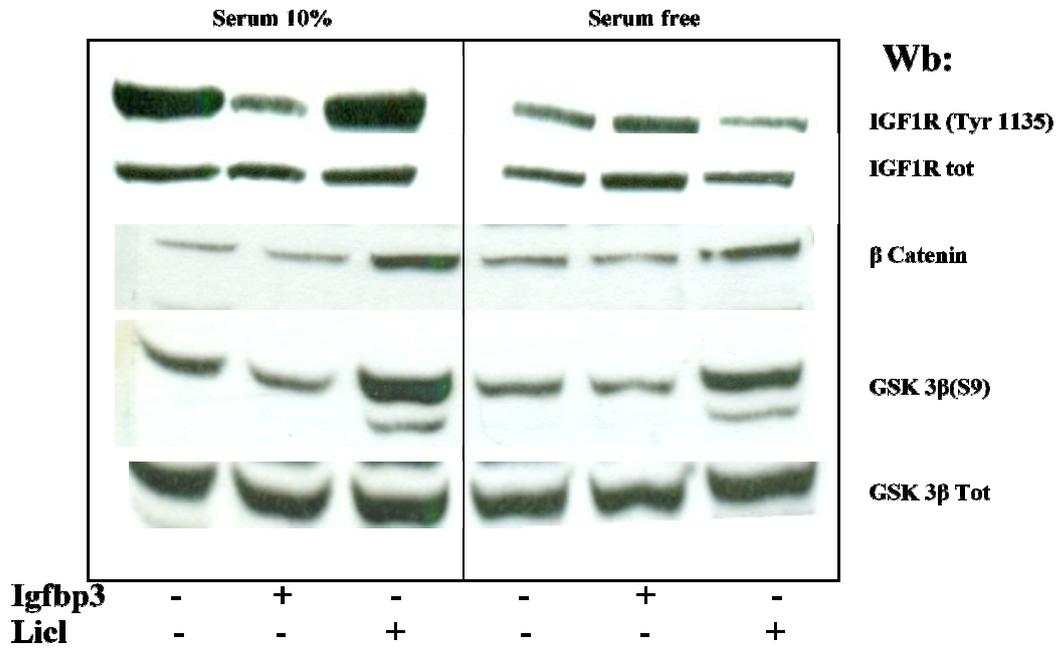


Figura 51: l'espressione di β -catenina diminuisce nelle cellule trattate con IGFBP3

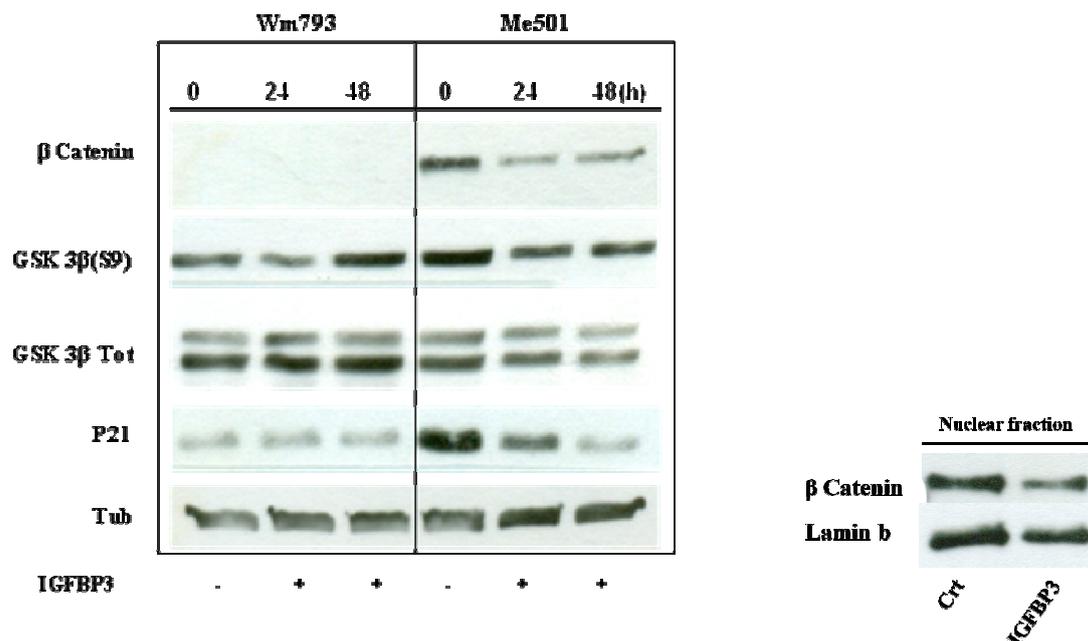
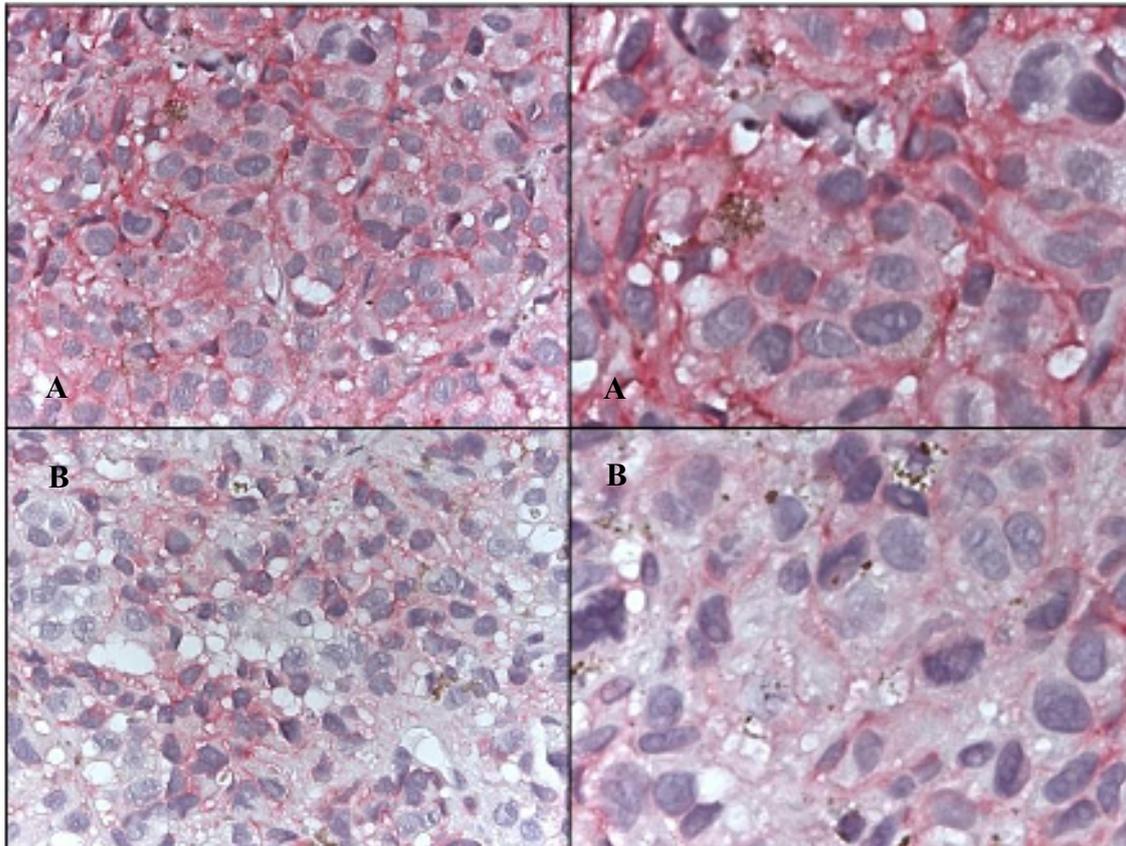


Figura 52: confronto dell'espressione di β -catenina nelle cellule non trattate e in quelle trattate con IGFBP3 (ingrandimento 40x, a destra panoramica, a sinistra un particolare); A: non trattate; B: trattate



Naturalmente, a questo punto abbiamo anche cercato di capire come mai si osservi una riduzione della β -catenina nelle cellule trattate con IGFBP3.

Come è noto, i livelli di β -catenina possono ridursi sia per via trascrizionale (anche se questa è una tesi per la quale non esistono sufficienti evidenze scientifiche), o, come più probabile, per via post-traduzionale, ovvero attraverso quei meccanismi che già fisiologicamente regolano l'attività e la presenza della proteina nelle cellule.

Dal momento che, come visto in letteratura, una delle vie principali di degradazione della β -catenina è la via proteosoma-dipendente, abbiamo effettuato un ulteriore esperimento, utilizzando, sempre avvalendoci dei dati presenti in letteratura, un inibitore del proteosoma, l' MG132, sia da solo che associato a trattamento con IGFBP-3. Come è possibile osservare dalla figura 53, utilizzando insieme sia IGFBP-3 che l'inibitore MG132, non si osserva alcuna riduzione della β -catenina, in virtù del blocco dell'attività proteosomica.

Un prova aggiuntiva del ruolo fondamentale di IGFBP-3 sul pathway Wnt- β -catenina viene da un ulteriore esperimento attraverso il quale abbiamo valutato il comportamento di LRP6, uno dei più importanti corecettori di Wnt; come mostrato in figura 54, il trattamento con IGFBP-3 comporta una riduzione sia di β -catenina che dell'espressione di LRP6: è lecito, dunque, ipotizzare che l'azione inibitoria di IGFBP-3 sul sistema WNT si eserciti proprio tramite il recettore LRP6.

Queste premesse ci hanno naturalmente portato ad indagare anche l'attività migratoria, mediata da β -catenina, delle cellule di melanoma in seguito al trattamento con IGFBP3.

Come è noto, la β -catenina è stata originariamente isolata come proteina associata alla regione citoplasmatica della E-caderina, una proteina transmembrana coinvolta nei processi di comunicazione e adesione cellulare omotipica; di conseguenza, una sua alterazione si riflette necessariamente sulla capacità migratoria delle cellule di melanoma.

Infatti, come si evince dalla figura 55, le cellule di controllo, ossia non trattate, sottoposte a scratch test presentano un normale grado di motilità e sono in grado di spostarsi e rapidamente occupare gli spazi liberi; aggiungendo solo IGFBP3 alla coltura cellulare, si nota una netta riduzione della motilità cellulare, fenomeno visibile anche aggiungendo in coltura solo FH535, un inibitore di β -catenina; ma è interessante notare come, combinando insieme sia IGFBP3 che FH535 le cellule sembrano aver perduto la capacità migratoria e non sono più in grado di ripristinare l'interruzione riempiendo gli spazi liberi: tutto ciò sottolinea ulteriormente il ruolo sia di IGFBP3 che della β -catenina nella capacità di invasione metastatica delle cellule di melanoma.

Figura 53: la β -catenina non viene degradata dal proteosoma

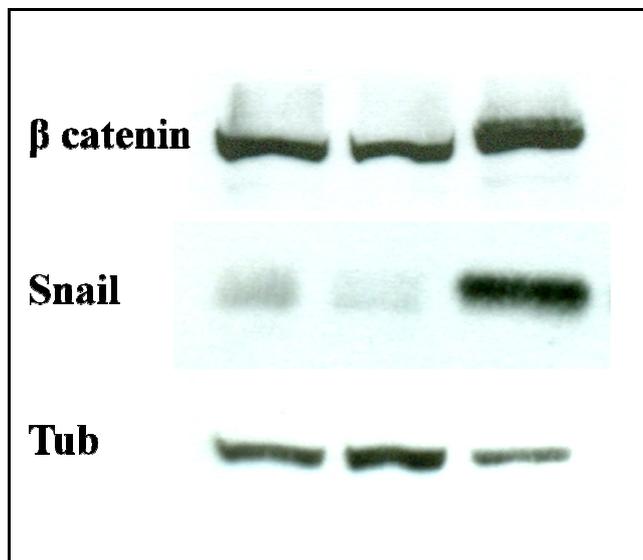
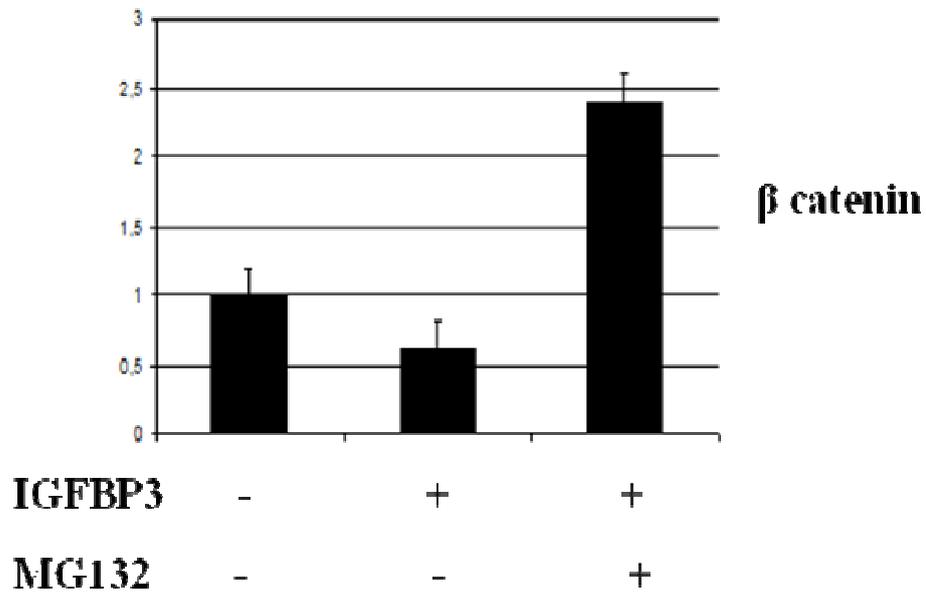


Figura 54: inibizione del sistema WNT da parte di IGFBP-3 mediata da LRP6

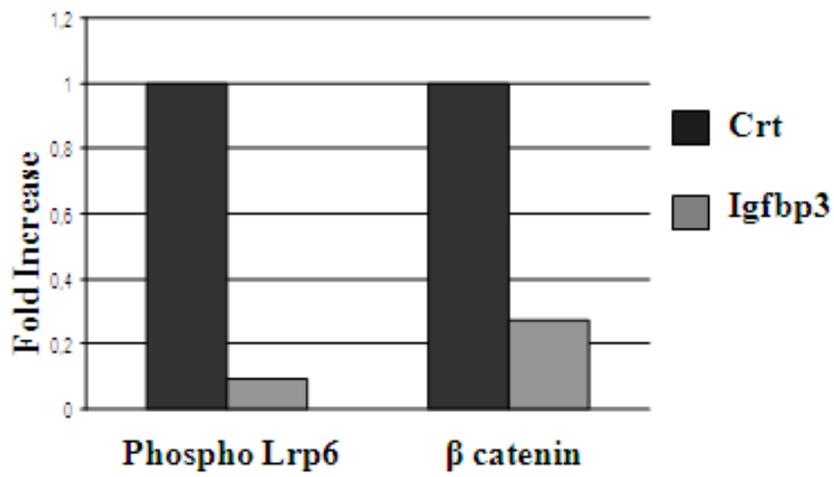
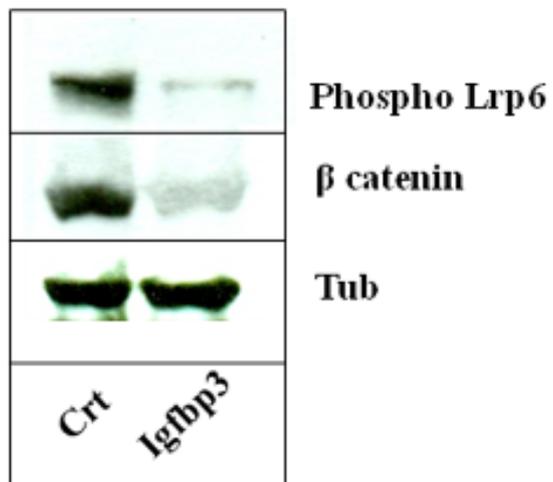
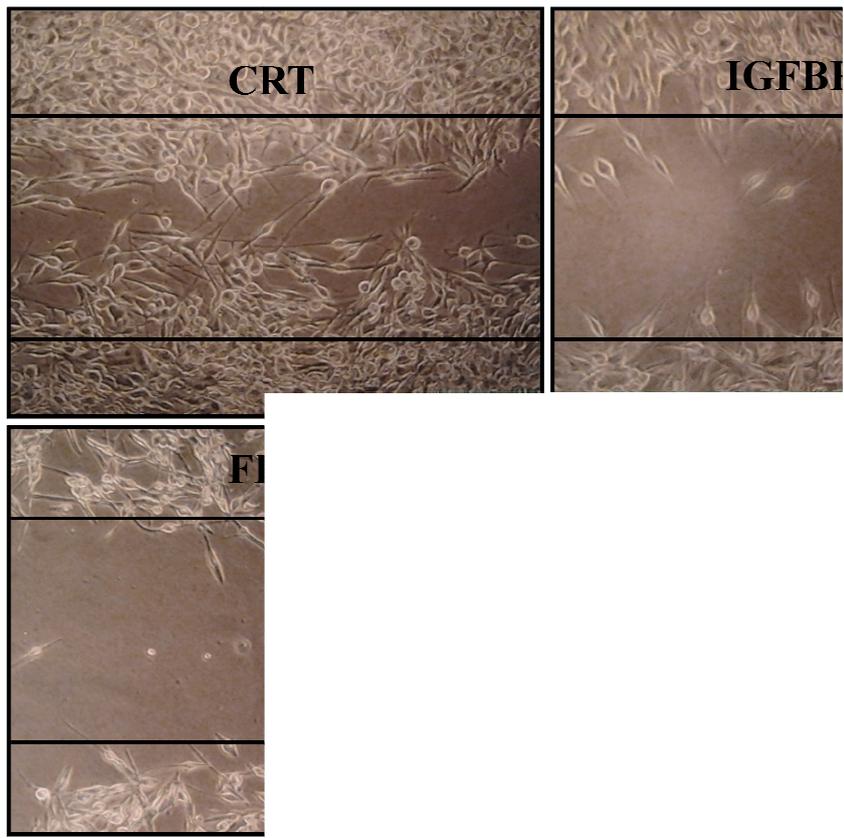


Figura 55: scratch test di valutazione dell'attività migratoria delle cellule



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

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

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

Come detto in precedenza, nella maggior parte dei melanomi sono state riscontrate delle mutazioni “attivanti” (ad esempio, BRAF V600E) di uno o più segnali intracellulari che fisiologicamente sono innescati dal legame di IGF-1 al proprio recettore, IGF1R (156). Un’aumentata biodisponibilità di IGF-1 nei pazienti affetti da melanoma potrebbe perciò essere un fattore legato all’eventuale progressione di malattia.

IGFBP-3 è nota come la principale proteina di trasporto per gli IGFs circolanti, nonché la più importante proteina modulatrice dell’attività di questi fattori. In particolare, IGFBP-3 controlla la disponibilità degli IGFs, che non possono esercitare la loro attività favorente la proliferazione cellulare, se legati a tale proteina.

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

Nel nostro studio abbiamo dimostrato l'esistenza di una stretta correlazione tra i livelli sierici di IGFBP-3 intatta, glicosilata e lo stadio di malattia nei pazienti affetti da melanoma (189). Infatti la diffusione metastatica è risultata associata ad una marcata riduzione della concentrazione sierica di IGFBP-3, che diventa addirittura indosabile negli stadi più avanzati. Inoltre, è stato possibile valutare questo dato nella storia clinica dei singoli pazienti, osservando una riduzione di IGFBP-3 in quelli andati in progressione e, al contrario, livelli stabili di tale proteina in coloro che non sono andati incontro a progressione.

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

Tale concetto è rafforzato dai dati del nostro studio riguardanti la reale biodisponibilità sierica dell'IGF-1 nei nostri pazienti. I nostri dati, infatti, sottolineano come il rapporto IGF-1/IGFBP-3 possa essere considerato un affidabile marker sierico prognostico. Tale rapporto ci consente infatti di differenziare due sottogruppi di pazienti, aventi non solo diversa prognosi quod vitam (sopravvivenza a 18 mesi 89,1% vs 48%) ma anche differenti intervalli liberi da malattia. Sulla base di questo dato potremmo ipotizzare che, laddove siano presenti un maggior numero di cellule tumorali, ci sia anche una maggiore

produzione di proteasi specifiche per IGFBP-3, con conseguente aumentata biodisponibilità di IGF-1.

I livelli sierici di IGFBP-3 valutati, utilizzando la metodica ELISA ed aggiustati per sesso ed età, come precedentemente descritto in letteratura (186), pur non avendo fornito dati relativi all'integrità della proteina, sono risultati statisticamente correlati non solo allo stadio della malattia al momento del prelievo ma anche al volume metastatico. Infatti, pazienti con più di 15cm³ di metastasi al momento del prelievo, mostravano livelli sierici significativamente più bassi di IGFBP-3. Bassi valori di questa proteina nel siero, seppur misurati con una metodica meno raffinata quale l'ELISA, sono risultati comunque correlati ad una prognosi più infausta (sopravvivenza a 18 mesi 88,3% vs 56,7%).

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

Il decremento dei valori sierici di IGFBP-3 nei pazienti portatori di metastasi viscerali, potrebbe dipendere da diversi fattori; alcuni Autori (147) hanno messo in evidenza, attraverso indagini immunistochemiche, come, nel tessuto di metastasi da melanoma, tale proteina sia maggiormente espressa in forma legata alla membrana delle cellule metastatiche stesse; secondo questo dato, potremmo ipotizzare che, nei pazienti al IV stadio di malattia, il livello sierico di IGFBP-3 diminuisca in seguito al sequestro della stessa proteina da parte dei tessuti metastatici; i nostri dati immunistochemici confermano solo parzialmente tali

osservazioni; infatti, a livello del tessuto metastatico, le maggiori concentrazioni di IGFBP-3 sembrano osservarsi più a livello dello stroma connettivale peritumorale che a livello delle cellule tumorali stesse. Inoltre, la nostra analisi, effettuata in immunistochemica sui melanomi primitivi e sulle metastasi dermiche, ha confermato che lo stroma peritumorale nei tumori primitivi esprime quantità maggiori di IGFBP-3 rispetto a quello delle metastasi dermiche. Questo a sottolineare che, come precedentemente supposto, un ambiente povero in IGFBP-3 è più suscettibile all'impianto ed alla proliferazione del tessuto metastatico. Come già dimostrato in altre neoplasie (158), si può ipotizzare che anche le cellule di melanoma siano in grado di produrre proteasi specifiche per IGFBP-3 determinandone una riduzione della concentrazione sierica. Infatti, le cellule di melanoma interagiscono attivamente con il microambiente circostante non solo attraverso il contatto intercellulare o con la matrice extracellulare ma anche attraverso la produzione di fattori di crescita, citochine e di proteasi.

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

positivo, in cui la riduzione di IGFBP-3 renderebbe maggiormente disponibili gli IGFs e promuoverebbe, attraverso l'attivazione del RAS/RAF/ERK pathway, l'ulteriore produzione di MMP-1, determinando una progressiva crescita del potenziale metastatico e la disseminazione della malattia. Molti Autori sottolineano il ruolo svolto anche da altre MMP, come la 2 e la 9, nella progressione di malattia. Come descritto in letteratura, anche nel nostro studio, l'immunoistochimica condotta sui melanomi primitivi e sulle metastasi dermiche ha dimostrato la positività per la MMP-9 sia a livello tumorale che stromale; inoltre, abbiamo osservato che il progressivo aumento di MMP-9 si accompagnava ad una riduzione dell'immunoreattività a livello stromale per IGFBP-3 e che questa diversa distribuzione delle proteine era più evidente a livello metastatico. Inoltre, è stato possibile valutare, attraverso la zimografia, la presenza di MMP 1, 2, 7 e 9 anche nel siero dei pazienti al IV stadio di malattia. I nostri risultati suggeriscono che la frammentazione di IGFBP-3 rappresenti una delle vie attraverso le quali le cellule di melanoma possano acquisire una maggiore capacità invasiva, indicando, perciò, un possibile utilizzo terapeutico di questa proteina.

È stato dimostrato, in linee cellulari provenienti da cancro del polmone, che la somministrazione esogena di IGFBP-3 riduca significativamente la migrazione e l'invasione delle cellule neoplastiche in vitro (186). Abbiamo pertanto voluto valutare l'effetto della somministrazione esogena di IGFBP-3 su linee cellulari di melanoma osservando che, nelle cellule addizionate con IGFBP-3, la motilità

era fortemente ridotta. Somministrando invece, alle cellule un anticorpo specifico per IGFBP-3, queste non solo riacquistavano la motilità, ma perdevano l'aderenza dal substrato, rimanendo comunque vitali, come dimostrato dal test del Trypan blue.

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

L'attività inibitoria di IGFBP-3 sulla motilità ed invasività cellulare è IGF-1 indipendente: innanzitutto, perché i test di invasione e migrazione sono stati effettuati in assenza di siero e quindi di IGF-1 esogeno; in secondo luogo, perché le linee cellulari di melanoma considerate nello studio non producevano quantità misurabili di IGF-1, come è stato osservato mediante analisi western blot con i lisati cellulari di entrambe le linee cellulari. Infine, perché in assenza di siero, il recettore di IGF-1 delle linee cellulari analizzate rimaneva in uno stato inattivo defosforilato, indipendentemente dal trattamento con IGFBP-3.

Mediante WB effettuato sul lisato delle cellule Me501, che, come precedentemente dimostrato, sono dotate di elevata capacità proliferativa, migratoria ed invasiva, si è osservato la presenza della proteina Akt in forma fosforilata e quindi attivata. Trattando queste cellule con IGFBP-3 si è potuto osservare, con la stessa metodica, un'assenza della forma attivata di Akt senza

però una riduzione della concentrazione della proteina stessa. Questo dato deve essere sottolineato, considerando l'importanza che l'alterazione dell'attività di Akt (presente tra il 43-67% dei melanomi) ha nella genesi del tumore, regolando diversi aspetti cellulari come la proliferazione, la sopravvivenza, la crescita, l'angiogenesi e la capacità di metastatizzare, favorendo lo switch tra E-caderina e N-caderina e la produzione di MMP-2 e 9 (190). Inoltre, è stato osservato che l'overespressione o l'attivazione di Akt correla con una prognosi peggiore nei pazienti affetti da melanoma (191). Il risultato da noi osservato può essere spiegato dal sequestro di IGF-1 da parte di IGFBP-3, che notoriamente è un fattore in grado di attivare Akt, ma poiché, il nostro esperimento è stato eseguito anche su linee cellulari in coltura, senza siero, quindi senza IGF-1 esogeno, è possibile ipotizzare anche un'azione di IGFBP-3 indipendente da IGF-1. Questo dato deve essere considerato in maniera rilevante anche alla luce dell'esistenza di diversi studi volti a sperimentare nuovi farmaci che hanno come target il pathway Akt. La possibilità di disporre di un inibitore proteico fisiologico, quale IGFBP-3, contro l'attivazione di Akt può rappresentare un importante passo in avanti nella lotta contro il melanoma. I dati emersi dal nostro studio pongono IGFBP-3 sotto una nuova luce. L'attività antitumorale di tale molecola, infatti, potrebbe non essere considerata solo grazie alla sua azione endocrina (189) né autocrina (192); infatti, IGFBP-3 presente maggiormente nello stroma dei tumori primitivi e secreta dalle cellule infiammatorie peritumorali, potrebbe possedere anche un'attività paracrina. A seguito di queste osservazioni, IGFBP-

3 dovrebbe essere considerata non più come una semplice proteina di trasporto ma come una vera e propria citochina, che a livello intracellulare produce un effetto contrario a quello del suo ligando, inibendo la fosforilazione di Akt.

Dai risultati del nostro studio è emerso, inoltre, che nelle cellule di melanoma Me501 sottoposte a trattamento con IGFBP-3, l'attività tirosinasi subiva un notevole incremento. Questa osservazione potrebbe essere spiegata attribuendo all'IGFBP-3 una capacità differenziativa sulle cellule neoplastiche; in effetti, abbiamo notato come le cellule che mostravano un'aumentata pigmentazione, esibivano un fenotipo più simile a quello dei melanociti, con l'aspetto dendritico maggiormente evidente. Tale dato è stato confermato anche dall'analisi immunohistochimica effettuata sia sui melanomi primitivi che sulle metastasi dermiche, nella quale abbiamo riscontrato una stretta correlazione tra la presenza di pigmento e la positività delle cellule tumorali per IGFBP-3. Questa osservazione è risultata ancor più significativa esaminando i soli melanomi primitivi.

In base a questi risultati ci siamo, quindi, proposti di valutare l'utilità dell'IGFBP-3 a scopo terapeutico, nell'ipotesi che il ripristino dei livelli sierici fisiologici di IGFBP-3 potesse avere un effetto inibitorio sul potenziale metastatico del melanoma. A tale proposito, abbiamo studiato un modello murino per evidenziare l'attività dell'IGFBP-3 su tumori xenotrapiantati e con una tempistica differente di trattamento; il primo gruppo di cavie (A) è stato utilizzato come controllo, il secondo gruppo (B) è stato trattato con IGFBP-3

contestualmente all'inoculo delle cellule tumorali Me501, mentre il terzo (C) ha ricevuto il trattamento dopo una settimana dall'inoculo delle cellule tumorali. Il confronto tra i gruppi trattati (B+C) e quello non trattato (A), ha messo in evidenza una differente cinetica di crescita della massa tumorale. Al termine dell'esperimento, il volume medio del tumore nei gruppi trattati era inferiore alla metà di quello del gruppo di controllo, con una differenza statisticamente significativa. Più nel dettaglio, come si evince dal grafico, il volume medio dei tumori espianati dai topi che erano stati trattati sin dall'inoculo delle cellule tumorali, era due volte e mezzo inferiore rispetto a quelli del gruppo di controllo.

Successivamente, dall'analisi microscopica dei campioni, il nostro studio ha messo in evidenza come la percentuale di necrosi fosse, seppur non in modo statisticamente significativo, minore nei tumori espianati dal gruppo di controllo, rispetto a quella dei tumori espianati dai gruppi trattati. Pertanto, i tumori del gruppo A, mostravano non solo un volume maggiore ma anche una percentuale di necrosi inferiore, forse a causa di un'umentata vascolarizzazione del tumore stesso, dato ancora da approfondire.

Abbiamo successivamente voluto verificare se il trattamento di IGFBP-3 fosse in grado di modulare lo stato di attivazione di Akt anche sui tumori xenotrapiantati, come già osservato a livello cellulare. Pur senza evidenze statisticamente significative, probabilmente a causa del basso numero di campioni, l'attività di Akt è risultata inferiore nei tumori dei gruppi trattati;

infatti, la media delle cellule Akt positive era 1,28 volte inferiore rispetto a quella del gruppo di controllo (73,25% vs 57%). Nelle lesioni analizzate le cellule Akt positive risultavano maggiormente distribuite a livello periferico, quindi sul margine di accrescimento del tumore, ad indicare che in tale sede le cellule di melanoma acquisiscono un fenotipo maggiormente aggressivo e più resistente agli stimoli apoptotici.

L'efficacia antiproliferativa dell'IGFBP-3 è stata messa in evidenza, per di più in modo statisticamente significativo, valutando l'indice proliferativo delle cellule tumorali mediante immunoreattività al Ki-67. A fronte di un Ki-67 espresso nel 31,45% delle cellule dei tumori del gruppo di controllo, solo il 13,5% delle cellule erano positive nei tumori trattati ($P=0.0062$). La differenza diventa ancor più marcata se consideriamo le cellule dei tumori appartenenti al gruppo B, positive solo nel 10,82% dei casi. Questa osservazione pone l'accento su quanto la tempestività del trattamento abbia una notevole influenza sull'indice proliferativo del tumore. Tali dati assumono una valenza maggiore in quanto ottenuti a parità di indice apoptotico; infatti, la metodica TUNEL non ha messo in evidenza alcuna differenza tra i gruppi in esame.

Infine, basandoci anche sui numerosi dati presenti in letteratura circa il ruolo cruciale della β -catenina nella progressione del melanoma, abbiamo indagato questo ulteriore aspetto, verificando come il trattamento con IGFBP-3 sia in grado di incrementare la degradazione della β -catenina ad opera del proteosoma.

La β -catenina sembra essere un fattore di sopravvivenza essenziale per le cellule di melanoma metastatico (193) e sarebbe un fattore chiave nel determinare la capacità invasiva e la tumorigenicità delle linee cellulari di melanoma primitivo e metastatico; inoltre, una downregolazione di β -catenina indurrebbe apoptosi nelle linee cellulari metastatiche e ne incrementerebbe la chemioresponsività (193).

Diversi studi hanno dimostrato che l'attivazione di β -catenina costituisce uno step cruciale nella trasformazione iniziale dei melanociti in melanoma: in un modello murino è stato dimostrato che la β -catenina è in grado di bloccare il fenomeno della senescenza dei melanociti interrompendo l'espressione di p16INK4A, un fattore di soppressione neoplastica, di fatto portando i melanociti verso l'immortalizzazione; inoltre, la β -catenina coopera con N-Ras nel promuovere lo sviluppo del melanoma nel topo (194).

E' stato, altresì, dimostrato che la sopravvivenza delle cellule neoplastiche dei tumori cutanei dipende anche dal pathway di β -catenina (195, 196): un blocco dell'espressione di β -catenina di fatto comporterebbe l'eliminazione di queste cellule con completa regressione della neoplasia.

La riduzione di β -catenina comporta una minore espressione delle proteine antiapoptotiche Mcl-1 e Bcl-xl, dimostrando, così, l'importanza della β -catenina stessa per la sopravvivenza delle cellule di melanoma metastatico (193); inoltre, è stato visto come la β -catenina svolga un ruolo nell'organizzazione dei microtubuli e del centromero durante la mitosi (197-199).

In corso di progressione del melanoma, l'attività trascrizionale della β -catenina aumenta (193). È stato dimostrato che essa svolge un ruolo sia nel complesso di adesione cellulare β -catenina/E-caderina, che come fattore di regolazione nucleare nel pathway Wnt canonico (200). Sappiamo che, durante la progressione del melanoma, l'espressione di E-caderina viene perduta (201) e, come conseguenza di un'alterazione dell'alta affinità caderina/ β -catenina, quest'ultima viene rilasciata nel citoplasma e nel nucleo, allo scopo di incrementare la propria attività trascrizionale (182, 202); questo significa che, quando viene perduta la capacità adesiva intercellulare, ad esempio a causa di una ridotta espressione di E-caderina, la β -catenina può liberamente svolgere le proprie funzioni nucleari e citoplasmatiche, con aumento del proprio pool e conseguente perdita del controllo dell'adesione intercellulare, crescita incontrollata e, infine, capacità delle cellule di metastatizzare.

Nel melanoma è stato dimostrato che la β -catenina attivata è frequentemente espressa nelle cellule con fenotipo migratorio (203) e che l'attivazione di β -catenina è importante durante la migrazione transendoteliale delle linee cellulari di melanoma (204)

La β -catenina è essenziale per la crescita invasiva delle linee cellulari di melanoma primitivo e metastatico; è stato ipotizzato che un aumento della traslocazione nucleare e dell'attività di β -catenina sia in grado di promuovere la proliferazione delle cellule di melanoma (205-207) e, di conseguenza, peggiorare la prognosi dei pazienti (208)

D'altra parte, bisogna precisare che alcuni Autori, invece, sostengono che elevati livelli di β -catenina nucleare siano correlati a una maggiore sopravvivenza (209) e che la downregolazione della β -catenina sia in grado di promuovere la formazione di metastasi nel modello murino (210): nel nostro studio, tuttavia, abbiamo dimostrato l'evento contrario, ossia che, in virtù del trattamento delle cellule di melanoma con IGFBP3 e conseguente aumento della degradazione di β -catenina proteosoma-dipendente, le cellule perdono la propria capacità invasiva.

E' lecito ipotizzare che nei primi stadi di sviluppo del melanoma le cellule possiedano un pool di molecole di β -catenina localizzato principalmente a livello del complesso di adesione cellulare, il che risulterebbe in un aumento dell'adesione intercellulare e in una conseguente limitazione del potenziale invasivo.

Durante la progressione del melanoma, il livello di β -catenina citoplasmatica e nucleare aumenta soprattutto a causa della perdita di attività di CK1a, che comporta una maggiore attività trascrizionale della β -catenina (207) e, di conseguenza, si può supporre che MITF, un importante target dell'attività trascrizionale di β -catenina, rivesta un ruolo cruciale nella sopravvivenza e proliferazione delle cellule di melanoma metastatico con elevata attività trascrizionale di β -catenina (206, 211).

Dai dati ottenuti emerge, in maniera chiara, come l'IGFBP-3 si dimostri particolarmente efficace se somministrata tempestivamente. In conclusione,

sebbene siano necessari ulteriori studi, possiamo affermare che IGFBP-3 abbia le potenzialità per essere utilizzata, in futuro, come terapia adiuvante nei pazienti liberi da malattia ma con alto rischio di ripresa o in associazione con altre target therapy nei pazienti con malattia metastatica.

BIBLIOGRAFIA

1. Dennis LK. Analysis of the melanoma epidemic, both apparent and real: data from the 1973 through 1994 surveillance, epidemiology, and end results program registry. *Arch Dermatol* 1999;135:275-80.
2. Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 2004;351:998-1012.).
3. Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Vachon CM, Schild SE, McWilliams RR, Hand JL, Laman SD, Kottschade LA, Maples WJ, Pittelkow MR, Pulido JS, Cameron JD, Creagan ET; Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 2007 Mar;82(3):364-80. Review
4. P Carli, A Biggeri, B Giannotti. Malignant melanoma in Italy: risks associated with common and clinically atypical melanocytic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: pp 734-739
5. M Breitbart, C Garbe, P Buttner, J Weib, et al. Ultraviolet light exposure, pigmentary traits and the development of melanocytic naevi and cutaneous melanoma. *Acta Derm Venereol* 1997; 77: pp 374-378.
6. C Garbe, P Buttner, J Weib, H P Soyer, et al. Risk factor for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying person

- at risk: multicenter case-control study of the central malignant melanoma registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994; 102: pp 695-699
7. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1970 Nov;172(5):902-8
 8. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggert AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 20;27(36):6199-206.
 9. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001 Aug 15;19(16):3635-48.
 10. Pehamberger H, Steiner A, Wolff K. In vivo epiluminescence microscopy of pigmented skin lesions. I. Pattern analysis of pigmented skin lesions. *J Am Acad Dermatol* 1987;17:571-83

11. Stolz W, Riemann A, Cagnetta AB et al. ABCD rule of dermoscopy: a new practical method for early recognition of malignant melanoma. *Eur J Dermatol* 1994; 4: 521–527
12. Nachbar F, Stolz W, Merkle T et al. The ABCD rule of dermatoscopy. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 551–559
13. Abbasi NR, Shaw HM, Rigel DS, Friedman RJ, McCarthy WH, Osman I, Kopf AW, Polsky D. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria *JAMA*,2004 Dec 8;292(22):2771-6
14. Menzies SW. A method for the diagnosis of primary cutaneous melanoma using surface microscopy. *Dermatol Clin* 2001;19:299–305
15. Argenziano G, Fabbrocini G, Carli P, et al. Epiluminescence microscopy for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions: comparison of the ABCD rule of dermatoscopy and a new 7-point checklist based on pattern analysis. *Arch Dermatol* 1998;134:1563–70
16. V. Dal Pozzo, C. Benelli, E. Roscetti. The seven features for melanoma: a new dermoscopic algorithm for the diagnosis of malignant melanoma. *Eur J Dermatol* 1999 Jun; 9 (4): 303-8
17. M. J. Scott Henning, S. W. Dusza, S. Q. Wang, A. A. Marghoob, H. S. Rabinovitz, D. Polsky, A.W. Kopf. The CASH (color,

- architecture, symmetry, and homogeneity) algorithm for dermoscopy *J Am Acad Dermatol* 2007;56:45-52
18. Panasiti V, Devirgiliis V, Curzio M, Roberti V, Gobbi S, Masciangelo R, Mastrecchia B, Calvieri S, Bottoni U. The reticular point of view in dermoscopy. *J Am Acad Dermatol*. 2009 Aug 22
 19. Amersi F, Morton DL. The role of sentinel lymph node biopsy in the management of melanoma. *Adv Surg*. 2007;41:241-56.
 20. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*. 1992 Apr;127(4):392-9
 21. Panasiti V, Devirgiliis V, Curzio M, Roberti V, Gobbi S, Rossi M, Bottoni U, Clerico R, Scuderi N, Calvieri S. Predictive factors for false negative sentinel lymph node in melanoma patients. *Dermatol Surg*. 2010 Oct;36(10):1521-8.
 22. Balch C. M., Houghton A. N., Milton G. W.: Diagnosis of metastatic melanoma at distant sites. In: Balch C. M., Houghton eds. *Cutaneous melanoma*. 439-467, JB Lippincott, Philadelphia, 1992
 23. Balch CM. Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. *Semin Surg Oncol*. 1992;8(6):400-14

24. Philip PA, Flaherty LE. Biochemotherapy for melanoma. *Curr Oncol Rep.* 2000;2(4):314-21
25. Dillman RO, Church C, Barth NM, Oldham RK, Wiemann MC. Long-term survival after continuous infusion interleukin-2. *Cancer Biother Radiopharm.* 1997 Aug;12(4):243-8
26. Meyer LJ, Zone JH. Genetics of cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 1994;103(5 suppl):112S-116S.
27. Cannon-Albright LA, Meyer LJ, Goldgar DE, et al. Penetrance and expressivity of the chromosome 9p melanoma susceptibility locus (MLM). *Cancer Res.* 1994;54(23):6041-6044
28. Hussussian CJ, Struwing JP, Goldstein AM, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet.* 1994;8(1):15-21.
29. Sekulic A et al for the melanoma study group of the Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(7):825-846
30. Zuo L, Weger J, Yang Q, et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet.* 1996;12(1):97- 99.
31. Soufir N, Avril MF, Chompret A, et al; French Familial Melanoma Study Group. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma- prone families in France [published correction

- appears in Hum Mol Genet. 1998;7(5):941]. Hum Mol Genet. 1998;7(2):209-216.
32. Wolfel T, Hauer M, Schneider J, et al. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. Science. 1995;269(5228):1281-1284.
 33. Tsao H, Benoit E, Sober AJ, Thiele C, Haluska FG. Novel mutations in the p16/CDKN2A binding region of the cyclin-dependent kinase-4 gene. Cancer Res. 1998;58(1):109-113.
 34. Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma. Curr Opin Oncol. 2008;20(2):183-189.
 35. Braig M, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. Cancer Res. 2006;66(6):2881-2884
 36. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D IV, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. Hum Pathol. 1984;15(12):1147-1165.
 37. Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, et al. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. Clin Cancer Res. 2002;8(12):3728-3733.
 38. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002 Jun 27;417(6892):949-954. Epub 2002 Jun 9.

39. Gray-Schopfer VC, da Rocha Dias S, Marais R. The role of B-RAF in melanoma [published correction appears in *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24(2):367]. *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24(1):165-183.
40. Ackermann J, Frutschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated NRasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res.* 2005;65(10):4005-4011.
41. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature.* 2007;445(7130):851-857.
42. Ball NJ, Yohn JJ, Morelli JG, Norris DA, Golitz LE, Hoeffler JP. Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *J Invest Dermatol.* 1994;102(3):285-290.
43. Chin L, Tam A, Pomerantz J, et al. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature.* 1999;400(6743):468-472.
44. Glinsky GV, Glinsky VV. Apoptosis and metastasis: a superior resistance of metastatic cancer cells to programmed cell death. *Cancer Lett.* 1996; 101(1):43-51.
45. Glinsky GV, Glinsky VV, Ivanova AB, Hueser CJ. Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. *Cancer Lett.* 1997;115(2):185-193.

46. Valente P, Fassina G, Melchiori A, et al. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis [published correction appears in *Int J Cancer*. 1999;80(3):485]. *Int J Cancer*. 1998;75:246-253.
47. Stahl JM, Cheung M, Sharma A, Trivedi NR, Shanmugam S, Robertson GP. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res*. 2003;63(11):2881-2890.
48. Meier F, Schitteck B, Busch S, et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Front Biosci*. 2005;10:2986-3001
49. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene*. 2003;22(20):3113-3122.
50. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol*. 2004;122(2):337-341.
51. Zhuang L, Lee CS, Scolyer RA, et al. Progression in melanoma is associated with decreased expression of death receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Hum Pathol*. 2006 Oct;37(10):1286- 1294. Epub 2006 Jul 18

52. Tsao H, Zhang X, Fowlkes K, Haluska FG. Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer Res.* 2000;60(7):1800-1804
53. Lerner AB, Shiohara T, Boissy RE, Jacobson KA, Lamoreux ML, Moellmann GE. A mouse model for vitiligo. *J Invest Dermatol.* 1986;87(3): 299-304.
54. Steingrimsson E, Moore KJ, Lamoreux ML, et al. Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. *Nat Genet.* 1994;8(3):256-263.
55. Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol.* 2003;163(1):333-343.
56. Banerjee D. Genasense (Genta Inc). *Curr Opin Investig Drugs.* 2001; 2(4):574-580.
57. Hsu M, Andl T, Li G, Meinkoth JL, Herlyn M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci.* 2000;113(pt 9):1535-1542.
58. Danen EH, de Vries TJ, Morandini R, Ghanem GG, Ruiter DJ, van Muijen GN. E-cadherin expression in human melanoma. *Melanoma Res.* 1996;6(2):127-131.

59. Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1996;1(2):188-194.
60. Scott RA, Lauweryns B, Snead DM, Haynes RJ, Mahida Y, Dua HS. Ecadherin distribution and epithelial basement membrane characteristics of the normal human conjunctiva and cornea. *Eye.* 1997;11(pt 5):607-612.
61. Satyamoorthy K, Li G, Gerrero MR, et al. Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res.* 2003;63(4):756-759.
62. Liu J-P, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A: Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (IGF-I) and type 1 IGF receptor (IGF-I-R). *Cell* 1993;75:59–72
63. DeChira TM, Efstratiadis A, Robertson EJ: A growth deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 1990;296:78–80 G.
64. Fürstenberger, H. J Senn. Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol* 2002; 3: 298–302

65. W.H. Daughaday, D. M. Kipnis, The growth promoting and anti-insulin actions of somatotropin, *Recent Prog Horm Res* (1966) 22: 49-99
66. E. R. Froesch, H. Buergi, Antibody-suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity, *J Clin. Invest.*(1963) 42:1816-34
67. A. Jakob, C. Hauri, Nonsuppressible insulin-like activity in human serum 3. Differentiation of two distinct molecules with nonsuppressible IL A, *J Clin. Invest.*(1968) 47(12):2678-88
68. Jones JI, Clemmons DR: Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3–34
69. Wajapeyee, N., Serra, R.W., Zhu, X., Mahalingam, M., and Green, M.R. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* 2008 Feb 8;132(3):363-74
70. H. Yu, T. Rohan, Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression, *Journal of the National Cancer Inst.*(2000) 92 (18): 1472-89

71. P. Singh, Il sistema dei fattori di crescita insulino-simili nella crescita, nello sviluppo e nella carcinogenesi, *Journal of clinical ligand assay (Ed. Italiana)* (2000) 23: 210-228
72. C. Lalou, S. Sawamura, B. Segovia, Y. Ogawa, M. Binoux, Proteolytic fragments of insulin-like growth factor binding protein-3: N-terminal sequences and relationships between structure and biological activity, *Life Sciences* (1997) 320: 621-628
73. N. Bhattacharyya, K. Pechhold, H. Shahjee, G. Zappala, Nonsecreted insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) can induce apoptosis in human prostate cancer cells by IGF-independent mechanisms without being concentrated in the nucleus, *The Journal of Biological Chemistry* (2006) Vol. 281 (34): 24588-24601
74. Singh P, Rubin N. Insulin-like growth factors & binding proteins in colon cancer. *Gastroenterology* 1993;105:1218–1237
75. Blum WB, Albertsson-Wikland K, Rosbert S, Ranke MB: Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1610–1616
76. Grinspoon S, Clemmons D, Swearingen B, Klibanski A: Serum insulin-like growth factor-binding protein-3 levels in the diagnosis of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metal* 1999;80:927–932

77. Kristrom B, Jansson V, Rosbert S, Albertsson-Wikland K: Growth response to growth hormone (GH) treatment relates to serum insulinlike growth factor-1 (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in short children with various GH secretion capacities. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2889–2898
78. Gelande L, Blum WF, Larsson L, Rosberg S, Albertsson-Wikland K: Monthly measurements of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in healthy prepubertal children: characterization and relationship with growth: The 1-year growth study. *Pediatric Research* 1999;45:377–383 10
79. J. Massague, M. P. Czech, The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factor I-II and their relationship to the insulin receptor, *J Biol Chem* (1982) 257 (9): 5038- 45 11
80. K. M. Kelley, Y. Oh, S. E. Gargosky, Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (1996) 28: 619-637 6.
81. C. L. Neudauer, J. B. McCarthy, Insulin-like growth factor-1 stimulated melanoma cell migration requires phosphoinositide 3-kinase but not extracellular-regulated kinase activation, *Experimental Cell Res.* (2003) 286: 128-137
82. Valentinis B, Baserga R. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2001; 54: 133–37

83. Werner H, LeRoith D. The role of insulin-like growth factor system in human cancer. *Adv Cancer Res* 1996 68: 183–223.- 2
84. Baserga R, Sell C, Porcu P, Rubini M. The role of IGF-I receptor in the growth and transformation of mammalian cells. *Cell Proliferation* 1994; 27: 63–71
85. Baserga R. The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumour growth? *Cancer Res* 1995; 55: 249–52
86. Morrione A, DeAngelis D, Baserga R. Failure of the bovine papillomavirus to transform mouse embryo fibroblasts with a targeted disruption of the insulin-like growth factor receptor gene. *J Virol* 1995; 69: 5300–03.—2
87. Sell C, Dumenil G, Devaud C, et al. Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 3604–12
88. Sell C, Rubini M, Rubini R, et al. Simian virus 40 large tumour antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type I insulin-like growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11217–21
89. Harrington EA, Bennett MR, Fanidi A, Evan GI. c-Myc induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *EMBO J* 1994; 13: 3286–95

90. Rodriguez-Tarduchy G, Collins MKL, et al. Insulin-like growth factor-I inhibits apoptosis in IL-3-dependent hemopoietic cells. *J Immunol* 1992; 149: 535–40
91. Resnicoff M, Burgaud JL, Rotmann HL, et al. Correlation between apoptosis, tumorigenesis and levels of insulin-like growth factor I receptors. *Cancer Res* 1995; 55: 3739–41 13.
92. R. H. McCusker, W. H. Busby, Insulin-like growth factor (IGF) binding to cell monolayers is directly modulated by the addition of IGF-binding proteins, *Endocrinology* (1991) 129 (2): 939-49 14
93. Peruzzi F, Prisco M, Dews M, Salmoni P, Grassilli E, Romano G, Calabretta B, Baserga R: The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:166–173.
94. Prisco M, Romano G, Peruzzi F, Valentinis B, Baserga R: Insulin and IGF-I receptors signaling in protection from apoptosis. *Horm Metab Res* 1999;31:80–89.
95. Peruzzi F, Prisco M, Dews M, Salomoni P, Grassilli E, Romano G, Calabretta B, Baserga R: Multiple signaling pathways of the insulinlike growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999;19:7203–7215.

96. Baserga R, Hongo A, Rubini M, Prisco M, Valentinis B: The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1997;1332:F105–126
97. Valentinis B, Romano G, Peruzzi F, Morionne A, Prisco M, Soddu S, Cristofanelli B, Sacchi A, Baserga R: Growth and differentiation signals by the insulin-like growth factor 1 receptor in hemopoietic cells are mediated through different pathways. *J Biol Chem* 1999;274:12423–12430
98. Coppola D, Saunders B, Fu L, Mao W, Nicosia SV: The insulin-like growth factor 1 receptor induces transformation and tumorigenicity of ovarian mesothelial cells and down-regulates their Fas-receptor expression. *Cancer Res* 1999;59, 3264–3270
99. Harrison M, Dunger AM, Berg S, et al: Growth factor protection against cytokine-induced apoptosis in neonatal rat islets of Langerhans: Role of Fas. *FEBS Lett* 1998;435:207–210
100. O'Connor R, Kauffmann-Zeh A, Liu Y, et al: Identification of domains of the insulin-like growth factor I receptor that are required for protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997;17:427–435
101. Reiss K, Ferber A, Travali S, Porcu P, Phillips PD, Baserga R: The proto-oncogene *c-myb* increases the expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor I receptor messenger

- RNA by a transcriptional mechanism. *Cancer Res* 1991;51:5997–6000
102. Pietrzkowski Z, Sell C, Lammers R, Ullrich A, Baserga R: The role of IGF-I and the IGF-I receptor in epidermal growth factor-stimulated growth of 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 1992;12:3883–3889
 103. Villaudi J, Delbe J, Blat C, Deasuty G, Golda A, Harel L: An IGF binding protein is an inhibitor of FGF stimulation. *J Cell Physiol* 1991;149:492–496
 104. Stewart AJ, Johnson MD, May FEB, Westley BR: Role of insulinlike growth factor and the type 1 insulin-like growth factor receptor in the estrogen-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1990;265:21172–21178
 105. Sell C, Rubini M, Rubin R, Liu J-P, Efstratiadis A, Baserga R: Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:11217–11221
 106. Baserga R: The IGF-1 receptor in cancer research. *Exp Cell Res* 1999;253, 1–6.
 107. W. G. Hoeck, V. R. Mukku, Identification of the major sites of phosphorylation in IGF binding protein-3, *J Cell Biochem* (1994) 56 (2): 262-73 15

108. S. M. Firth, R. C. Baxter, Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins, *Endocr. Rev.* (2002) 23 (6): 824-854 16.
109. H. Shahjee, N. Bhattacharyya, G. Zappala, M. Wiench, S. Prakash, M.M. Rechler, An N-terminal fragment of insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP) induces apoptosis in human prostate cancer cells in an IGF-independent manner, *Growth Hormone & Research* (2008) 18: 188-197
110. A. G. Renehan, M. Zwahlen, C. Minder, S. T O'Dwyer, S. M. Shalet, M. Egger, Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis, *Lancet* (2004) 363: 1346-53
111. A. J. Butt, A. C. Williams. IGFBP-3 and apoptosis—a licence to kill? *Apoptosis* 2001; 6: 199–205
112. Oh Y, Muller HL, Lamson G, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 14964–14971
113. Rajah R, Valentinis B, Cohen P. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor- α 1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* 1997; 272: 12181–12188

114. Leal SM, Liu Q, Huang SS, Huang JS. The type V transforming growth factor $\beta\beta$ receptor is the putative insulin-like growth factor-binding protein 3 receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 20572–20576
115. Valentinis B, Bhala A, DeAngelis T, Baserga R, Cohen P. The human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the growth of fibroblasts with a targeted disruption of the IGF-I receptor gene. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 361–367
116. Oh Y. IGF-independent regulation of breast cancer growth by IGF binding proteins. *Breast Cancer Res. Treat* 1998; 47: 283–293
117. Ferry RJ, Katz LEL, Grimberg A, Cohen P, Weinzimer SA. Cellular actions of insulin-like growth factor binding proteins. *Horm Metab Res* 1999; 31: 192–202
118. Knabbe C, Lippman ME, Wakefield LM, et al. Evidence that transforming growth factor-beta is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell* 1987; 48: 417–428
119. Fontana JA, Burrows-Mezu A, Clemmons DR, LeRoith D. Retinoid modulation of insulin-like growth factor-binding proteins and inhibition of breast carcinoma proliferation. *Endocrinology* 1990; 128: 1115–1122
120. Besset V, Margueresse-Battistoni B, Collete J, Benahmed M. Tumor necrosis factor alpha stimulates insulin-like growth factor

binding protein-3 expression in cultured porcine sertoli cells. *Endocrinol* 1996; 137: 296–303

121. Huynh H, Yang X, Pollack M. Estradiol and anti-estrogens regulate a growth inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3 autocrine loop in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 1016–1021
122. Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, et al. Induction of the growth inhibitor IGF binding protein 3 by p53. *Nature* 1995; 377: 646–649
123. Huynh H, Pollak M, Zhang JC. Regulation of insuline-like growth factor (IGF) II and IGF binding protein 3 autocrine loop in human PC-3 prostate cancer cells by vitamin D metabolite 1, 25(OH) 2D3 and its analog EB1089. *Int J Oncol* 1998; 13: 137–143
124. Butt AJ, Firth SM, Baxter RC. The IGF axis and programmed cell death. *Immunol Cell Biol* 1999; 77: 256–262
125. Resnicoff M, Abraham D, Yutanawiboonchai W, et al. The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo. *Cancer Res* 1995; 55: 2463–2469
126. Rajah R, Valentinis B, Cohen P. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor- α 1 on programmed cell death through a

- p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* 1997; 272: 12181–12188
127. Martin JL, Baxter RC. Oncogenic ras causes resistance to the growth inhibitor insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) in breast cancer cells. *J Biol Chem* 1999;274:16407–11
 128. Nickerson T, Huynh H, Pollak M. Insulin-like growth factor binding protein-3 induces apoptosis in MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237: 690–3
 129. Gill ZP, Perks CM, Newcomb PV, et al. Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-3) predisposes breast cancer cells to programmed cell death in a non-IGFdependent manner. *J Biol Chem* 1997;272:25602–7
 130. Baxter RC. Signalling pathways involved in antiproliferative effects of IGFBP-3: a review. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2001; 54: 145–48
 131. Hoeflich A, Fetscher O, Lahm H, et al. Overexpression of insulinlike growth factor-binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumour cells. *Cancer Res* 2000; 60: 834–38
 132. Buckbinder L, Talbott R, Velasco MS, et al. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* 1995;377:646–9

133. Butt AJ, Firth SM, King MA, et al. Insulin-like growth factor-binding protein-3 modulates expression of Bax and Bcl-2 and potentiates p53-independent radiation-induced apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2000; 275:39174–81 18
134. S. Rajaram, D. J. Baylink, S. Mohan, Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions, *Endocr. Rev.* (1997) 18 (6): 801-831
135. Rechler MM, Nissley SP: Insulin-like growth factors, in Sporn MB, Roberts AB (eds): *Peptide Growth Factors & Their Receptors*, I Secaucus, NJ, Springer-Verlag 1990;263–367
136. Toretsky JA, Helman LJ: Involvement of IGF-II in human cancer. *J Endocrinol* 1996;149:367–372.
137. Werner H, LeRoith D: The role of the IGF system in human cancer, in Vande Woude GF, Klein G (eds): *Advances in Cancer Research* San Diego, Academic Press 1996;68:168–223.
138. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FE, Pollak M: Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *L a n c e t* 1998;351:1393–1396
139. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, Hennekens CH, Pollak M: Plasma insulin-like growth factor-I

- and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 1998;279:563–566
140. Adesanya OO, Zhou J, Samathanam C, Powell-Braxton L, Bondy CA: Insulin-like growth factor I is required for G-2 progression in the estradiol-induced mitotic cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:3287–3291
141. Lee AV, Jackson JG, Gooch JL, Hilsenbeck SG, Coronado Heinsohn E, Osborne CK, Yee D: Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Molecular Endocrinology* 1999;13:787–796
142. Bralke T: Type-2 IGF receptor: A multi-ligand binding protein. *Horm Metab Res* 1999;31:242–246
143. Byrd JC, Devi GR, DeSouza AT, Jirtle RL, MacDonald RG: Disruption of ligand binding to the insulin-like growth factor II/Mannose 6-phosphate receptor by cancer-associated missense mutations. *J Biol Chem* 1999;274:24408–24416
144. Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R: Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* 1999;19:3278–3288

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

- factor binding protein 3 (IGFBP-3) in malignant melanoma. *Int J Cancer*. 2009 Jul 8
151. Chan JM, Stampfer MJ, Ma J, Gann P, Gaziano JM, Pollak M, Giovannucci E. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-3 as predictors of advanced-stage prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1099-106
 152. Ju J, Rastelli L, Malyanker U, et al. The melanoma vascular mimicry phenotype defined in gene expression and microsome sequencing analysis. *Cancer Genomics Proteomics* 2004;1:355–62
 153. Goldstein S, Moerman EJ, Jones RA, Baxter RC. Insulin-like growth factor binding protein 3 accumulates to high levels in culture medium of senescent and quiescent human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9680–4
 154. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463-516.
 155. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003 May 2;92(8):827-39.
 156. Kleiner DE Jr, Stetler-Stevenson WG. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr Opin Cell Biol*. 1993 Oct;5(5):891-7

157. Bourdreau N, Bissell MJ: Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr Opin Cell Biol* 1998, 10: 640-646
158. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997, 91: 439-442
159. Fowlkes JL, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H: Matrix metalloproteases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem* 1994, 269: 25742-25746
160. Chien AJ, Conrad WH, Moon RT (2009a) A Wnt survival guide: from flies to human disease. *J Invest Dermatol* 129: 1614-1627
161. Clevers H, Nusse R (2012) Wnt/b-catenin signaling and disease. *Cell* 149: 1192-1205
162. Luciani F, Champeval D, Herbette A, Denat L, Aylaj B, Martinozzi S, Ballotti R, Kemler R, Goding CR, De Vuyst F, et al (2011) Biological and mathematical modeling of melanocyte development. *Development* 138: 3943-3954
163. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*; 20,781-810, 2004
164. Miller JR. The Wnts. *Genome Biol*; 3,1-15, 2001

165. Dubois L, Lecourtois M, Alexandre C, Hirst E, Vicent JP. Regulated endocytic routing modulates wingless signaling in *Drosophila* embryo. *Cell*; 105, 613-624, 2001
166. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci.* 2003 Apr 1; 116(Pt 7): 1175-86
167. Ferkey DM, Kimelman D. Glycogen synthase kinase-3 beta mutagenesis identifies a common binding domain for GBP and Axin. *J Biol Chem.* 2002 May 3; 277(18): 16147-52
168. Sayas CL, Avila J, Wandosell F. Glycogen synthase kinase-3 is activated in neuronal cells by Galpha12 and Galpha13 by Rho-independent and Rho-dependent mechanisms. *J Neurosci.* 2002 Aug 15; 22(16): 6863-75
169. Hardt SE, Sadoshima J. Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ Res.* 2002 May 31; 90(10): 1055-63
170. Jia J, Zhang L, Zhang Q, Tong C, Wang B, Hou F, Amanai K, Jiang J. Phosphorylation by double-time/CKIepsilon and CKIalpha targets cubitus interruptus for Slimb/beta-TRCP-mediated proteolytic processing. *Dev Cell.* 2005 Dec; 9 (6):819-30
171. Loberg RD, Vesely E, Brosius FC 3rd. Enhanced glycogen synthase kinase-3beta activity mediates hypoxia-induced apoptosis of

vascular smooth muscle cells and is prevented by glucose transport and metabolism. *J Biol Chem.* 2002 Nov 1; 277(44): 41667-73

172. Massi D, Carli P, Franchi A, Santucci M (1999) Naevus-associated melanomas: cause or chance? *Melanoma Res* 9: 85-91
173. Bachmann IM (2005) Importance of P-cadherin, b-catenin, and Wnt5a/ frizzled for progression of melanocytic tumors and prognosis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 11: 8606-8614
174. Smolle J, Kaddu S, Kerl H (1999) Non-random spatial association of melanoma and naevi-a morphometric analysis. *Melanoma Res* 9: 407-412
175. Urso C, Giannotti V, Reali UM, Giannotti B, Bondi R (1991) Spatial association of melanocytic naevus and melanoma. *Melanoma Res* 1: 245-249
176. Pham K, Milovanovic T, Barr RJ, Truong T, Holcombe RF (2003) Wnt ligand expression in malignant melanoma: pilot study indicating correlation with histopathological features. *MP, Mol Pathol* 56: 280-285
177. Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J. E-cadherin and APC compete for the interaction with β -catenin and cytoskeleton. *J Cell Biol*; 127, 2061- 2069;1994
178. Gumbiner BM. Regulation of Cadherin adhesive activity. *J Cell Biol*; 148, 399-404, 2000

179. Bejsovec A. Wnt signaling: an embarrassment of receptors. *Curr Biol*; 10, R919-R922, 2000
180. Pandur P, Kuhl M. An arrow for wingless to take-off. *Bioessays*; 23,:207-210, 2001
181. Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J. Cell Sci*; 119, 395-402, 2006
182. Nelson JW, Nusse R. Convergence of Wnt, β -catenin and Cadherin Pathways. *Science*; 303, 1483-1487, 2004
183. Van Dyke T, Merlino G β -catenin in metastatic melanoma – the smoking gun reloaded. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012 Mar;25(2):125-6
184. Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E., and Polakis, P. (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275, 1790–1792
185. Lucero, O.M., Dawson, D.W., Moon, R.T., and Chien, A.J. (2010). A re-evaluation of the “oncogenic” nature of Wnt / betacatenin signaling in melanoma and other cancers. *Curr. Oncol. Rep.* 12, 314–318
186. E.A. Eisenhauer,, P. Therasseb, J. Bogaertsc, L.H. Schwartzd, D. Sargente, R. Fordf, J. Danceyg, S. Arbuckh, S. Gwytheri, M. Mooneyg, L. Rubinsteing, L. Shankarg, L. Doddg, R. Kaplanj, D. Lacombec, J. Verweijkwith New response evaluation criteria in

- solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1), *Eur J Can* 45 (2009) 228–247
187. Friedrich N, Alte D, Völzke H, Spilcke-Liss E, Lüdemann J, Lerch MM, Kohlmann T, Nauck M, Wallaschofski H. Reference ranges of serum IGF-1 and IGFBP-3 levels in a general adult population: results of the Study of Health in Pomerania (SHIP). *Growth Horm IGF Res.* 2008 Jun;18(3):228-37. Epub 2007 Nov 7
188. Brien WT, Klein PS. Validating GSK3 as an in vivo target of lithium action. *Biochem Soc Trans.* 2009 Oct;37(Pt 5):1133-8
189. Panasiti V, Naspi A, Devirgiliis V, Curzio M, Roberti V, Curzio G, Gobbi S, Calvieri S, Londei P. Correlation between insulin-like growth factor binding protein-3 serum level and melanoma progression. *J Am Acad Dermatol.* 2011 May;64(5):865-72. Epub 2011 Mar 22
190. Robertson GP. Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2005 Jun;24(2):273-85. Review
191. Dhawan P, Singh AB, Ellis DL, et al: Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappaB and tumor progression. *Cancer Res* 62:7335-7342, 2002

192. Dar AA, Majid S, Nosrati M, de Semir D, Federman S, Kashani-Sabet M. Functional modulation of IGF-binding protein-3 expression in melanoma. *J Invest Dermatol.* 2010 Aug;130(8):2071-9.
193. Sinnberg T, Menzel M, Ewerth D, Sauer B, Schwarz M, Schaller M, Garbe C, Schittek B. β -Catenin signaling increases during melanoma progression and promotes tumor cell survival and chemoresistance. *PLoS One.* 2011;6(8):e23429
194. Delmas V, Beermann F, Martinozzi S, Carreira S, Ackermann J, et al. (2007) Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev* 21: 2923–2935
195. Lang D, Lu MM, Huang L, Engleka KA, Zhang M, et al. (2005) Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. *Nature* 433: 884–887
196. Malanchi I, Peinado H, Kassen D, Hussenet T, Metzger D, et al. (2008) Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature* 452: 650–653
197. Bahmanyar S, Kaplan DD, Deluca JG, Giddings TH, Jr., O'Toole ET, et al. (2008) beta-Catenin is a Nek2 substrate involved in centrosome separation. *Genes Dev* 22: 91–105

198. Huang P, Senga T, Hamaguchi M (2007) A novel role of phospho-beta-catenin in microtubule regrowth at centrosome. *Oncogene* 26: 4357–4371
199. Kaplan DD, Meigs TE, Kelly P, Casey PJ (2004) Identification of a role for betacatenin in the establishment of a bipolar mitotic spindle. *J Biol Chem* 279: 10829–10832
200. Daugherty RL, Gottardi CJ (2007) Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)* 22: 303–309
201. Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M (1996) Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1: 188–194
202. Li G, Fukunaga M, Herlyn M (2004) Reversal of melanocytic malignancy by keratinocytes is an E-cadherin-mediated process overriding beta-catenin signaling. *Exp Cell Res* 297: 142–151
203. Murakami T, Toda S, Fujimoto M, Ohtsuki M, Byers HR, et al. (2001) Constitutive activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway in migrationactive melanoma cells: role of LEF-1 in melanoma with increased metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 8–15
204. Qi J, Chen N, Wang J, Siu CH (2005) Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and

- activation of the beta-catenin signaling pathway. *Mol Biol Cell* 16: 4386–4397
205. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A (2004) WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 5: 691–701
206. Widlund HR, Horstmann MA, Price ER, Cui J, Lessnick SL, et al. (2002) Betacatenin- induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia- associated transcription factor. *J Cell Biol* 158: 1079–1087
207. Sinnberg T, Menzel M, Kaesler S, Biedermann T, Sauer B, et al. (2010) Suppression of Casein Kinase 1a in Melanoma Cells Induces a Switch in b-Catenin Signaling to Promote Metastasis. *Cancer Res* 70: 6999–7009
208. Kielhorn E, Provost E, Olsen D, D'Aquila TG, Smith BL, et al. (2003) Tissue microarray-based analysis shows phospho-beta-catenin expression in malignant melanoma is associated with poor outcome. *Int J Cancer* 103: 652–656
209. Chien AJ, Moore EC, Lonsdorf AS, Kulikauskas RM, Rothberg BG, et al. (2009) Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1193–1198

210. Takahashi Y, Nishikawa M, Suehara T, Takiguchi N, Takakura Y (2008) Gene silencing of beta-catenin in melanoma cells retards their growth but promotes the formation of pulmonary metastasis in mice. *Int J Cancer* 123: 2315–2320
211. Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Dobbeling U, Kobert N, et al. (2008) In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* 68: 650–656