



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Tesi di Dottorato

“Il sistema dell’uPAS nei tumori della tiroide”

Relatore :

Prof. Massimino D’Armiento
Dip. di Medicina Sperimentale

Coordinatore:

Prof. Andrea Lenzi
Dip.di Medicina Sperimentale

Dottoranda:

Dott.ssa Iolanda Coletta

***Dottorato di Ricerca in
Scienze Endocrinologiche, Metaboliche e Andrologiche, XXVI Ciclo***

Indice

CAPITOLO 1	4
IL SISTEMA DI ATTIVAZIONE DEL PLASMINOGENO (PAS)	4
1.1 Il plasminogeno	4
1.2 Il recettore di membrana cellulare del plasminogeno	5
1.3 La plasmina	5
1.4 L'attivatore urochinasico del plasminogeno (uPA)	6
1.5 Il recettore dell'attivatore del plasminogeno urochinasico (uPAR)	9
1.6 L'attivatore del plasminogeno tissutale (tPA)	11
1.7 Serpine (inibitori dell'attivatore del plasminogeno 1 e 2 o PAI-1 e PAI-2), alfa ₂ antiplasmina.	12
CAPITOLO 2	15
RUOLO MUTIFUNZIONALE DELL'uPAS NELLA PROGRESSIONE DEL CANCRO	15
2.1 Proteolisi della membrana basale e della matrice extracellulare da parte dell'uPAS	15
2.2 Coinvolgimento dell'uPAS nella proliferazione cellulare	16
2.3 Coinvolgimento dell'uPAS nell'adesione e migrazione cellulare	17
2.4 Coinvolgimento dell'uPAS nell'angiogenesi tumorale	18
CAPITOLO 3	20
<i>Carcinoma della mammella</i>	22
<i>Carcinoma dell'ovaio</i>	22
<i>Carcinoma dell'endometrio</i>	23
<i>Carcinoma della cervice</i>	23
<i>Carcinoma renale</i>	23
<i>Carcinoma della vescica</i>	24
<i>Carcinoma della prostata</i>	24
<i>Carcinoma a cellule squamose del capo e del collo</i>	25
<i>Carcinoma dell'esofago</i>	25
<i>Carcinoma gastrico</i>	26
<i>Carcinoma del colon-retto</i>	26
<i>Carcinoma epatico</i>	27
<i>Carcinoma del pancreas</i>	27
<i>Carcinoma della tiroide</i>	28
<i>Glioma</i>	29
<i>Carcinoma polmonare</i>	29
<i>Leucemia</i>	30
<i>Altri tumori</i>	31
CAPITOLO 4	32
CENNI SULL'UTILIZZO DELL'uPAS NELLA TERAPIA DEI TUMORI	32

4.1 Inibizione dell'espressione dei componenti dell'uPAS.....	32
4.2 Inibizione dell'attività dei componenti dell'uPAS.....	36
4.3 Inibizione dell'interazione uPA/uPAR	38
SCOPO DELLO STUDIO	40
MATERIALI E METODI.....	41
<i>Linee cellulari e materiali.....</i>	<i>41</i>
<i>Culture cellulari e tessuti tiroidei umani</i>	<i>41</i>
<i>Estrazione delle proteine da colture cellulari e tessuti</i>	<i>43</i>
<i>Determinazione del contenuto proteico</i>	<i>44</i>
<i>Zimografia</i>	<i>44</i>
<i>Western-Blotting</i>	<i>45</i>
<i>Estrazione e quantificazione dell'RNA</i>	<i>46</i>
<i>RT-PCR e PCR.....</i>	<i>47</i>
<i>Real Time pCR o PCR quantitativa</i>	<i>47</i>
<i>Determinazione dei geni di riferimento più stabili e analisi dei dati.....</i>	<i>50</i>
ANALISI STATISTICA	51
RISULTATI.....	52
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	63
BIBLIOGRAFIA.....	68

CAPITOLO 1

IL SISTEMA DI ATTIVAZIONE DEL PLASMINOGENO (PAS)

I componenti del sistema di attivazione del plasminogeno (PAS) includono:

- due serin-proteasi, l'attivatore del plasminogeno urochinasico (uPA) e l'attivatore del plasminogeno tissutale (tPA);
- due inibitori serpinici, l'inibitore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1) e quello di tipo 2 (PAI-2);
- il recettore di membrana per l'uPA (uPAR).

Il ruolo fisiologico del sistema è quello di convertire il plasminogeno nella sua forma attiva: la plasmina.

1.1 Il plasminogeno

È una glicoproteina a singola catena con peso molecolare di 92 kDa, sintetizzata nel fegato. La forma nativa, che ha come aminoacido NH₂-terminale l'acido glutammico (Glu-plasminogeno), viene convertita mediante digestione plasminica in Lys-plasminogeno. Quest'ultimo contiene numerosi siti di legame per la lisina, che gli permettono di interagire con il fibrinogeno e la fibrina, per cui, quando si forma il coagulo, la maggior parte di questo pro-enzima rimane all'interno dell'aggregato di fibrina. La porzione N-terminale di 77 aa contiene due ponti disolfuro, essenziali per il riconoscimento di diverse proteine di legame, come il fibrinogeno, l' α_2 – antiplasmina e il recettore della superficie cellulare o i fosfolipidi.

In condizioni normali, solo circa il 60% del plasminogeno circolante è disponibile per essere attivato. Il rimanente è legato, seppure reversibilmente, ad una glicoproteina circolante ricca di istidina (PM 60.000 Da), la cosiddetta "glicoproteina ricca di istidina", che ne impedisce il legame alla fibrina.

Il gene del plasminogeno (PLG) è situato sul braccio corto del cromosoma 6 (6q26) ed è costituito da 19 esoni. La regione promoter comprende due sequenze regolatorie che agiscono in sinergismo: il sito di legame del fattore nucleare 1 dell'epatocita (HNF-1), situato sulla porzione non traslata del primo esone, e il sito di riconoscimento per un attivatore simil fattore nucleare la proteina 3 (AP3) (1,2). Questi siti sono responsabili della

trascrizione e della specificità tissutale del gene PLG, che è principalmente espresso nel fegato. L'induzione della risposta di fase acuta a un danno tissutale, alla crescita tumorale o alle infezioni causa un incremento del livello sierico del plasminogeno. Recenti studi hanno dimostrato che l'interleuchina 6 (IL-6), mediatore della fase acuta, induce l'espressione epatica del gene PLG attraverso un elemento responsivo dell'IL-6 (IL-6RE) localizzato tra il -791 e -783 del promoter. Questo stimolo sembra essere mediato dall'attivazione della proteina chinasi mitogena-attivata (MAPK) e dal fattore di trascrizione C/EBP β (3,4). Anche le neurotropine, come il fattore di crescita neuronale (NGF), sono capaci di up-regolare l'espressione del PLG attraverso l'attivazione di due siti di legame SP1 localizzati tra i nucleotidi -255 e -106 del gene promoter (5).

L'aggiunta di carboidrati conferisce molte proprietà al plasminogeno, come la suscettibilità all'attivazione da parte delle proteasi, l'efficienza della generazione dell'angiostatina, il legame sia del plasminogeno che della plasmina ai recettori della superficie cellulare e il tipo di risposta cellulare (6).

1.2 Il recettore di membrana cellulare del plasminogeno

Il legame del plasminogeno ai recettori della membrana plasmatica avviene su diverse superfici cellulari e si ritiene che faciliti la migrazione cellulare mediante la degradazione della membrana extracellulare. Sono state caratterizzate almeno cinque sottotipi di recettori di membrana del plasminogeno: le integrine $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_5\beta_1$, l' α -enolasi, l'annessina II, il fattore tissutale e l'actina dell'endotelio della superficie cellulare (7).

1.3 La plasmina

Il plasminogeno viene convertito nell'enzima attivo, chiamato plasmina, dagli attivatori del plasminogeno tissutale e urochinasico (tPA e uPA). Tale conversione avviene mediante taglio proteolitico di un singolo legame peptidico corrispondente ad Arg560-Val561: si forma così una molecola costituita da due catene, la catena A (NH₂-terminale) e quella B (COOH-terminale, contenente il sito catalitico). Il lys-plasminogeno viene attivato più rapidamente rispetto al glu-plasminogeno.

La catena A contiene 5 strutture ad "ansa", detti "kringle", identificabili con i cosiddetti "siti di legame per la lisina", che conferiscono alla plasmina, così come al plasminogeno, una notevole affinità per la fibrina. La plasmina può degradare il fibrinogeno, la fibrina solubile

e la fibrina stabilizzata, quale prodotto finale della coagulazione, formando prodotti di degradazione caratteristici, importanti nella diagnosi di varie condizioni patologiche.

1.4 L'attivatore urochinasico del plasminogeno (uPA)

L'attivatore urochinasico del plasminogeno (uPA) è una proteina di 53 kDa, sintetizzata da molte cellule del tessuto connettivo (soprattutto fibroblasti, cellule epiteliali e macrofagi) e secreta in forma inattiva come singola catena di zimogeno (pro-uPA o sc-uPA) nel sangue (8-9). La sua concentrazione ematica è di circa 8 ng/ml.

L'sc-uPA, secreto nella matrice extracellulare, è esposto all'azione di proteasi che possono generare forme attive o inattive ad alto peso molecolare di uPA (HMW-uPA). La plasmina, la catepsina B ed L, la callicreina, la tripsina o la termolisina clivano la sc-uPA convertendo quest'ultimo nella forma attiva a doppia catena legata da un ponte disolfuro (tc-uPA) o uPA attivo. L'elastasi e la trombina, clivano il pro-uPA a differenti posizioni dando origine alla forma inattiva HMW-uPA(9). La tc-uPA ha come specifico substrato il plasminogeno. La plasmina è l'attivatore primario dell'sc-uPA ed è attivata a sua volta dal tc-uPA. Questo fenomeno noto come "reciproca attivazione dei zimogeni" si verifica più frequentemente quando l'sc-uPA è associato al suo recettore uPAR (10,11). Di conseguenza la generazione di uPA attivo è concentrata nella zona pericellulare, dove è presente una rapida fonte di plasmina durante la migrazione e l'invasione cellulare sia fisiologica che patologica.

Il tc-uPA può essere ulteriormente degradato in due catene a basso peso molecolare (LMW-uPA) attraverso delle proteasi, proteoliticamente attive, ma incapaci di legarsi al recettore dell'uPA.

L'uPA attivo consiste in due catene, A e B, legate da un ponte disolfuro tra la cys148 e la cys279; la catena A (158 aa) contiene un dominio "EGF-like" che lega l'uPAR e un dominio "kringle" a funzione sconosciuta; la catena B invece contiene il sito catalitico (*figura 1.1*).

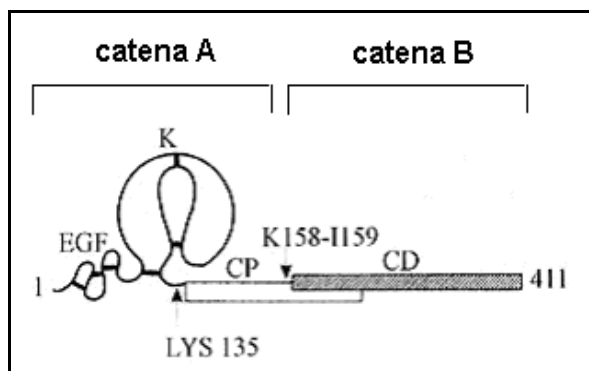


Figura 1.1 – Struttura dell'uPA. Sono rappresentati: il dominio “EGF like” e il dominio “kringle” della catena A, il dominio catalitico (CD) della catena B e il sito di clivaggio (K158-I159) essenziale per l’attivazione dell’uPA.

L’uPA è considerato una proteina multifunzionale coinvolta sia nei processi di proteolisi che di trasduzione del segnale. E’ una proteasi ad elevata specificità di substrato, in quanto in grado di convertire il plasminogeno nella forma attiva, la plasmina (12) (figura 1.2).

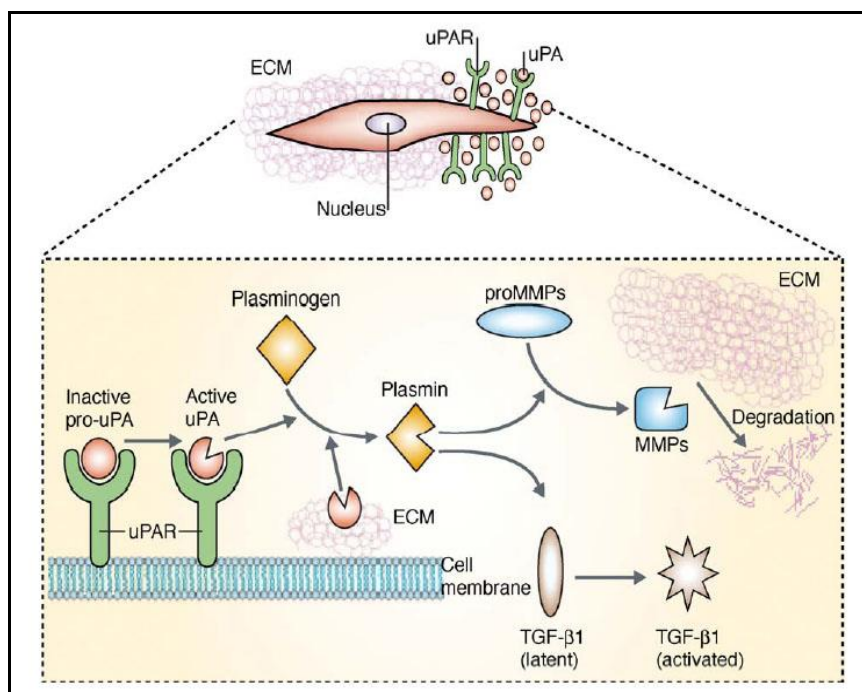


Figura 1.2 – Rappresentazione schematica della cascata di attivazione del plasminogeno

Il gene che codifica per l'uPA è localizzato sul cromosoma 10q22 e nonostante sia espresso a bassi livelli in una varietà di cellule, può essere anche indotto in seguito a diversi segnali, quali fattori di crescita, citochine, ormoni peptidici, ormoni steroidei, agenti genotossici e cambiamenti della morfologia cellulare.

L'uPA è inoltre secreto da molte cellule tumorali, tra cui i tessuti neoplastici della mammella, dell'ovaio, dello stomaco, del rene, dell'endometrio e del cervello, in quantità maggiore rispetto ai tessuti sani (13). Ad esempio, l'espressione costitutiva dell'uPA è stimolata sia dalla proteina p65 (RelA) nell'adenocarcinoma pancreatico (tramite l'interazione con il sito di legame dell'NF-kB) sia dalla β -catenina nei tumori colon-rettali. Studi più recenti hanno dimostrato che la differente espressione dell'uPA nelle varie linee cellulari neoplastiche è correlata con il potenziale invasivo ed è una diretta conseguenza dello stato di metilazione del promotore: se quest'ultimo viene ipometilato aumenta l'espressione dell'uPA insieme all'invasività del tumore; se è ipermetilato, la crescita cancerosa rallenta (13).

Alterazioni epigenetiche, come modificazioni nella metilazione del DNA e nell'acetilazione dell'istone, possono giocare un ruolo importante nella genesi tumorale dando origine ad una inappropriata espressione genica (14). Le linee cellulari tumorali altamente invasive MDA-MB-231, che mostrano un'iperespressione dell'uPA, sono caratterizzate da una ipometilazione del promoter uPA, mentre nelle linee cellulari a basso indice metastatico MCF-7 la mancata espressione dell'uPA è associata ad una ipermetilazione del promoter.

La deacetilazione dell'istone è coinvolta nella repressione della trascrizione genica dell'uPA. Recentemente è stato anche riportato che gli inibitori dell'istone deacetilasi (HDAC) - come la ticostatina, il sodio butirrato e la scriptaid - inducono l'espressione dell'uPA e l'invasività della cellula neoplastica (15). Queste osservazioni suggeriscono la possibilità che la somministrazione degli inibitori HDAC come chemioterapici antitumorali può essere deleteria per i pazienti più che benefica.

Un ruolo rilevante potrebbe essere svolto anche dalla regolazione nelle cellule neoplastiche dell'espressione del promotore del gene umano PLA1, che codifica per il sito di legame NFkB, influenzando in tal modo sulla sua espressione. Infatti l'attivazione aberrante NFkB è stata riscontrata in molti cancro umani, dove l'iperespressione dell'uPA è stata dimostrata essere sostenuta dall'attivazione costitutiva RelA, la subunità p65 dell'NFkB. Allo stesso

modo sono stati identificati due elementi leganti il fattore cellulare T: il fattore T cellulare (TCF) e la β -catenina. Nel cancro colon-rettale l'attivazione della cascata della β -catenina è stata dimostrata indurre l'espressione dell'uPA attraverso i due siti sopra menzionati.

1.5 Il recettore dell'attivatore del plasminogeno urochinasico (uPAR)

L'attivazione del plasminogeno catalizzata dall'uPA in vivo avviene solo se la proteasi si lega al recettore di membrana uPAR o CD87, che è una proteina altamente glicosilata di 55-60 kDa, costituita da tre domini, D1, D2 e D3 (*figura 1.2*). Esistono due forme di uPAR: una forma ancorata alla membrana plasmatica, tramite un glucosil-fosfatidil-inositolo (GPI) e una forma solubile. L'uPA, sia in forma inattiva che attiva, interagisce con l'uPAR con un'elevata affinità a livello di una sequenza che comprende gli aminoacidi dal 18 al 32, mentre la regione dall'aminoacido 136 al 143 sembra inibire il legame col recettore (16,17,12). Nell'uPAR la sequenza critica di legame è stata trovata nel dominio 1, soprattutto al livello dell'Arg 53, Leu 55, Tyr 57 e Leu 66, anche se l'integrità del recettore è comunque necessaria per l'elevata affinità di interazione (16). Il legame simultaneo dell'uPA all'uPAR e al plasminogeno comporta un'elevata attività proteolitica dell'enzima al livello della membrana cellulare, in quanto il plasminogeno legato alla membrana viene attivato più velocemente rispetto a quello in forma libera. La plasmina, una volta formata, è in grado di attivare il pro-uPA, innescando così un feed-back di reazione che porta ad una maggiore produzione di plasmina. La plasmina associata alla membrana viene parzialmente protetta dall'inibitore solubile α -2-antiplasmina. L'uPAR, oltre all'uPA, possiede anche altri partner di legame, tra cui la vitronectina, la caveolina, specifiche integrine e i "rafts" lipidici (16). L'interazione con la vitronectina è potenziata in presenza dell'uPA e diminuita dal PAI-1, che compete per il legame con l'uPAR nella regione amino-terminale. L'uPAR interagisce anche con altre integrine, ma sembra avere una maggiore affinità con i recettori per la fibronectina $\alpha_3\beta_1$ e $\alpha_5\beta_1$, con il recettore $\alpha_{IIb}\beta_3$ dei leucociti che lega il fibrinogeno e le integrine le quali a loro volta legano la vitronectina. Il legame dell'uPAR con la vitronectina e con le altre integrine è reso possibile grazie all'interazione del recettore con la proteina caveolina e con i rafts. I rafts sono piccoli corpi intracellulari ricchi in colesterolo, glicosfingolipidi, gangliosidi, integrine, tirosin-chinasi e G-protein-coupled receptor (GPCR) (16). L'abilità dell'uPAR di interagire con la vitronectina e con specifiche integrine permette al

recettore di modulare processi importanti per l'invasione e le metastasi, come l'adesione e la migrazione cellulare. L'uPAR è espresso in molti tessuti e tipi cellulari, tra cui i monociti del sangue periferico, i granulociti, le cellule endoteliali, i linfociti B, le cellule T-attive, i fibroblasti, le cellule del midollo osseo, i cheratinociti e i trofoblasti della placenta (13). I suoi livelli in circolo sono regolati da vari fattori, tra i quali i più importanti sono i promotori tumorali, le citochine, gli ormoni e i fattori di crescita. Poiché esiste una forte relazione tra la presenza dell'uPAR e il fenotipo invasivo tumorale, se ne trovano livelli elevati in numerose cellule neoplastiche, ad esempio, della mammella, del colon, dello stomaco e di alcuni carcinomi del polmone (13).

Il recettore per l'uPA è codificato dal gene PLAUR localizzato sul braccio corto del cromosoma 19 (19q13) ed è costituito da sette esoni. Il promoter del gene PLAUR contiene elementi di consenso che agiscono in posizione cis per i fattori di trascrizione AP1, AP2, PEA3, NFkB e SP1. La stimolazione dell'espressione genica del PLAUR sia PMA che Ras dipendente è coinvolta nell'attivazione del MAPK Erk e/o JNK seguita dalla traslazione nucleare e attivazione del complesso cJun/JunD AP1. Recentemente è stato identificato un nuovo elemento regolatore intragenico richiesto per l'espressione costitutiva e PMA-inducibile del gene PLAUR. La stabilità post trascrizionale dell'mRNA uPAR è indotta da alcuni agenti, quali PMA, TGF- β o cicloeximide, che aumentano l'emivita dei trascritti dell'uPAR. Altri elementi destabilizzano l'mRNA come l'ARE e la p53, che incrementa la degradazione dell'mRNA dell'uPAR. L'uPAR è una lipoproteina di 55-60 kDa caratterizzata dalla presenza di tre domini di circa 90 aa chiamati D1, D2, D3, la cui struttura tridimensionale è dettata dai ponti disolfuro costituiti da cisteine. L'alta affinità di legame dell'uPAR all'uPA richiede la cooperazione tridimensionale di tutti e tre i domini. L'uPAR può essere clivato dando origine a una forma solubile suPAR. Sia l'uPAR che il suPAR possono essere clivate nelle regioni di legame D1 e D2 dando origine a frammenti D1 e D2 D3 incapaci di legare l' uPA. Nel plasma di pazienti affetti da cancro sono stati trovati elevati livelli di suPAR, ritenuto derivare dal clivaggio dell'uPAR sulle membrane cellulari maligne.

1.6 L'attivatore del plasminogeno tissutale (tPA)

L'attivatore del plasminogeno tissutale (tPA) è prodotto da differenti tipi cellulari: cellule endoteliali, cheratinociti, osteoblasti, osteoclasti, melanociti e neuroni. Viene anche secreto dalle cellule neoplastiche di melanoma, neuroblastoma, cancro dell'ovaio, della mammella e del pancreas (13). E' sintetizzato e secreto in forma di catena singola e la sua concentrazione plasmatica di base è 5-10 ng/ml. La forza di trascinamento (shear stress) esercitata dallo scorrimento del sangue sul rivestimento endoteliale vascolare sembra il più importante stimolo alla sua produzione (aumenta in condizioni di stress e dopo lo sforzo fisico ed è quindi più alta negli atleti). Il tPA è costituito da una singola catena di 527 aminoacidi, già proteoliticamente attiva. Questa viene scissa dalla plasmina, tra l'Arg 275 e la Ile 276, in una molecola che esibisce un'attività proteolitica 100 volte maggiore ed è formata da due catene legate da un ponte disolfuro. L'estremità N-terminale del tPA contiene un dominio "fibronectin-type 2", un dominio "EGF-like" e due domini "kringle", mentre l'estremità C-terminale contiene il dominio catalitico (18) (figura 1.3).

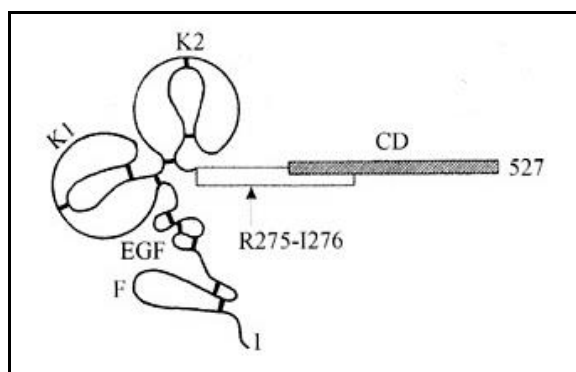


Figura 1.3 – Struttura del tPA: sono rappresentati il dominio "fibronectin-type 2", il dominio "EGF-like", i due domini "kringle", il sito di clivaggio (R275-I276) e il dominio catalitico (CD).

Il tPA presenta alta affinità per la fibrina. Infatti, sulla fibrina esiste un sito di legame per particolari strutture ad “ansa” presenti nella catena A del tPA (attività fibrinolitica localizzata a livello del coagulo di fibrina).

Il tPA, oltre ad interagire con la fibrina, è in grado di legarsi anche a specifici siti di legame presenti sulla superficie delle cellule, l’annessina II. Esiste quindi anche un’attivazione del plasminogeno da parte del t-PA associato alle cellule. Questi “binding sites” sono stati trovati sulla superficie delle cellule endoteliali, che sono quindi in grado di “concentrare” la formazione di plasmina a livello del coagulo presente sulla superficie del vaso lesso.

E’ stato anche dimostrato che le piastrine rappresentano una superficie idonea per l’attivazione del plasminogeno a livello del trombo, del quale costituiscono una componente fondamentale.

L’espressione del gene tPA è regolata da diversi ormoni attraverso “regioni responsive agli ormoni”, ovvero sequenze enhancer attivate da tutti gli ormoni steroidei classici (glucocorticoidi, progesterone, androgeni e mineralcorticoidi), eccetto gli estrogeni (13).

Il ruolo principale del tPA è quello di degradare nei vasi sanguigni la fibrina, la quale stimola l’attività proteolitica dell’enzima interagendo con i suoi domini “kringle 2” e “EGF-like”, specialmente durante una condizione di ischemia (19).

Inoltre, il tPA svolge una funzione sulle cellule neurali ed in particolare è coinvolto nel differenziamento morfologico cellulare del neuroblastoma. Diversi studi hanno anche dimostrato che nel SNC promuove gli eventi associati alla plasticità sinaptica (come la memoria e l’apprendimento) e regola la permeabilità nell’unità neurovascolare (19). Peraltro queste ultime attività del tPA sono plasminogeno-indipendenti, e ciò indica l’esistenza di altri suoi possibili substrati non ancora identificati.

1.7 Serpine (inibitori dell’attivatore del plasminogeno 1 e 2 o PAI-1 e PAI-2), alfa₂ antiplasmina.

L’attività dell’uPA e del tPA può essere neutralizzata da due inibitori chiamati PAI-1 e PAI-2, che appartengono alla famiglia delle serpine (inibitori delle serino-proteasi) e hanno una bassa identità di sequenza tra loro. Entrambi gli inibitori degli attivatori del plasminogeno presentano nella loro molecola sequenze “esca” simili alle sequenze di consenso per l’attività enzimatica presenti nelle molecole substrato degli attivatori del plasminogeno. In seguito al “morso enzimatico” scatta un meccanismo che porta alla

formazione di un legame covalente tra l'inibitore ed un aminoacido del sito catalitico dell'enzima, con conseguente inibizione irreversibile dell'attività enzimatica.

Il PAI-1 è una glicoproteina a singola catena che pesa 43 kDa ed è il principale inibitore dell'uPA, con il quale forma un complesso stabile (20, 21) (figura 1.4).

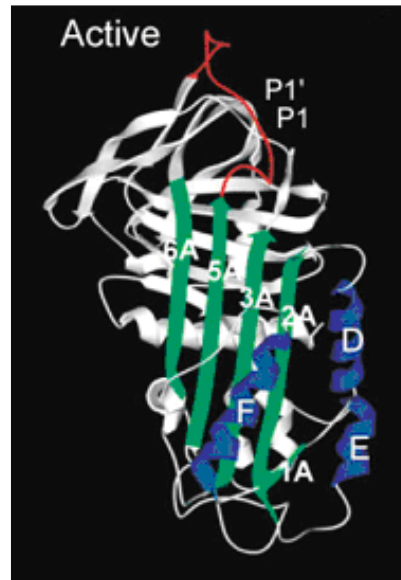


Figura 1.4 – Struttura tridimensionale cristallografica del PAI-1 nella forma attiva;

in rosso è indicato il loop esposto in superficie, in verde sono indicati i foglietti β (1A-6A), in blu sono rappresentate le α eliche (D, E e F)

Il PAI-1 è espresso in tutti i tipi cellulari, soprattutto negli adipociti, epatociti e cellule endoteliali; i suoi livelli in circolo sono regolati da una varietà di segnali: lo stress meccanico o fisiologico (ad esempio l'ipossia) e molecole endocrine o autocrine (il TGF- β) (13).

La funzione biologica del PAI-1 non consiste solo nel modulare l'attività catalitica dell'uPA e del tPA, ma anche nel mediare l'interazione tra molecole di adesione (integrine) e matrice extracellulare (ECM), attraverso il legame con varie proteine extracellulari tra cui la vitronectina. Per questo è considerato un componente regolatorio importante per i processi di adesione e migrazione cellulare, sia fisiologici che patologici (20).

Recentemente è stato dimostrato che il PAI-1 riesce a inibire l'apoptosi secondo un meccanismo uPA-indipendente (4).

Il PAI-2, invece, esiste in due forme, una intracellulare non glicosilata di 47 kDa e una glicosilata extracellulare di 60 kDa, entrambe inibitori meno potenti dell'uPA (20).

Vari agenti controllano l'espressione del gene del PAI-2, tra cui i fattori di crescita (TGF- β , EGF, M-CSF e GM-CSF), ormoni (acido retinoico, dexametazone e vitamina D3), citochine (TNF- α , IL-1 e IL-2), peptidi vasoattivi (angiotensina II), tossine (diossine e endotossina) e promotori tumorali (esteri del forbolo) (13). Anche il PAI-2 sembra poter bloccare l'apoptosi, non è invece in grado di controllare l'adesione e la migrazione cellulare (4).

L' α_2 antiplasmina è una glicoproteina a singola catena, sintetizzata dal fegato, con un peso molecolare di circa 70.000 Da, contenente il 13% di carboidrati. La sua concentrazione plasmatica è di 70 μ g/ml, ed eccede di circa 10 volte la quantità di plasmina presente in condizioni normali. Appartiene anch'essa alla famiglia delle serpine. Esiste in due forme, una attiva (70%) ed una inattiva (30%).

Come gli altri inibitori delle proteasi, ha un ampio spettro di inibizione in vitro, ma il suo ruolo biologico in vivo è quello di inibire la plasmina. Forma un complesso stechiometrico 1:1 con la plasmina, legandosi dapprima in modo reversibile ai siti leganti lisina della plasmina stessa e formando successivamente un complesso stabile che inibisce in modo irreversibile l'enzima. Inoltre l' α_2 -antiplasmina inibisce il legame del plasminogeno alla fibrina, in quanto compete con il plasminogeno stesso per i siti di legame per la lisina, impedendone l'attacco alla fibrina. Lo stesso meccanismo d'azione è utilizzato da un analogo della lisina, l'acido ϵ -aminocaproico, utilizzato come inibitore della fibrinolisi. L' α_2 -antiplasmina può inibire anche altre proteasi, come l'uPA, il Fattore XIIa, XIa, Xa, la callicreina e la trombina.

L' α_2 -antiplasmina è il principale inibitore della plasmina, mentre gli inibitori dell'attivatore del plasminogeno, PAI-1 e PAI-2, inibiscono l'uPA formando un complesso inattivo. Il PAI-1 inibisce in maniera moderata anche la plasmina. Altre due serpine, la nexina -1 proteasi e l'inibitore della proteina C (PAI-3), sono anche capaci di bloccare l'attività dell'uPA, ma in modo meno rilevante rispetto ai due PAI. Le serpine sono note anche come "inibitori suicida" dal momento che sono degradati irreversibilmente dalle proteasi target. Recentemente è stato dimostrato che anche il rene umano è un sito di produzione dell' α_2 - antiplasmina.

CAPITOLO 2

RUOLO MUTIFUNZIONALE DELL'UPAS NELLA PROGRESSIONE DEL CANCRO

L'UPAS è coinvolto in numerosi processi fisiopatologici che richiedono un rimodellamento della membrana basale (BM) e della matrice extracellulare (ECM), come guarigione delle ferite, rigenerazione e involuzione dei tessuti, risposta immune, angiogenesi e progressione tumorale (22,23,24,8,25,26,27).

All'inizio si riteneva che la principale funzione dell'UPAS, insieme ai membri della matrice della famiglia delle metalloproteasi (MMPs), fosse limitata alla degradazione dell'ECM e della BM nei fenomeni di diffusione locale e a distanza delle cellule maligne, e dell'angiogenesi tumorale. Recentemente è divenuto chiaro che l'UPAS risulta implicato in molteplici aspetti dell'evoluzione neoplastica, inclusa la proliferazione cellulare, l'adesione intercellulare e la migrazione delle cellule neoplastiche, e la crescita e l'invasione vasale del tumore nei siti metastatici (22,23,25,26,27).

2.1 Proteolisi della membrana basale e della matrice extracellulare da parte dell'UPAS

Durante la progressione del cancro e il successivo fenomeno della metastatizzazione le cellule maligne devono essere capaci di degradare e quindi muoversi attraverso l'ECM e la BM nei siti del tumore primitivo, e successivamente in quelli dei tessuti bersaglio sani, sede di invasione e colonizzazione delle metastasi. Queste capacità sono acquisite dalle cellule maligne attraverso l'incrementata espressione e l'attività di enzimi proteolitici, soprattutto la plasmina e la famiglia delle MMPs.

Come riportato nella *figura 1*, la plasmina è il primo attivatore dell'sc-uPA, mentre la trasformazione del plasminogeno in plasmina è sostenuta da tc -uPA, che potenzia la produzione della stessa plasmina. Così la "reciproca attivazione dello zimogeno" si verifica più efficientemente quando la sc-uPA è associata al suo noto recettore di membrana plasmatica uPAR. Considerato che molti tipi cellulari esprimono recettori per il plasminogeno sulla superficie, la concomitante espressione dell'uPAR migliora in modo sostanziale le concentrazioni locali dei reagenti (1,28). Di conseguenza la formazione di uPA attivo è concentrato nell'area pericellulare, dove è presente una efficace e pronta fonte di plasmina. In particolare per la sua capacità di muoversi sulla membrana plasmatica e di

interagire con le integrine e la vitronectina, l'uPAR può accumularsi nell'area dove è richiesta la produzione di plasmina: quella dove avvengono i contatti cellula-ECM e cellula-cellula e dove ha inizio la migrazione cellulare (8,29,30). La plasmina formata è capace di degradare molte componenti dell'ECM e della BM, inclusa la fibronectina, laminina, vitronectina, collagene di tipo IV, proteoglicani e fibrina, o direttamente o attraverso l'attivazione delle MMPs latenti, come la proMMP-1, proMMP-2, proMMP-3, proMMP-9, proMMP-10 e proMMP-13. Importanti per la proliferazione delle cellule maligne, per la migrazione e la neoangiogenesi è la capacità del tc-uPA, della plasmina e delle MMPs di rilasciare o attivare fattori mitogenici associati all'ECM, fattori di crescita motogenici e angiogenici, quali il bFGF (fattore basico di crescita dei fibroblasti), il VEGF (fattore di crescita endoteliale vascolare), l'HGF (fattore di crescita epatocitario), l'ILGF (fattore di crescita simil-insulina), l'EGF (fattore di crescita epidermoide) e il TGF- β (fattore di crescita trasformante) (23). Molti di questi fattori in modo paracrino regolano l'espressione dell'uPA, uPAR e PAI-1. Inoltre la proteolisi di alcune componenti dell'ECM, come la laminina e la fibronectina, genera nuove molecole bioattive capaci di promuovere la migrazione e l'invasione della cellula tumorale.

2.2 Coinvolgimento dell'uPAS nella proliferazione cellulare

Diversi studi in vitro e in vivo hanno documentato la capacità dell'uPAS di indurre la proliferazione delle cellule tumorali (10,27,28). Ciò può avvenire o per attivazione proteolitica dei fattori di crescita (HGF, TGF- β , bFGF) o attraverso l'interazione dell'uPAR con $\alpha_5\beta_1$ integrina, che induce l'attivazione dei recettori tirosin-chinasi FAK e EGF. Questi sono anche responsabili della sostenuta attivazione della cascata del segnale Erk/MAPK e della soppressione del segnale inibente la crescita p38/MAPK (10,31,32). In accordo con queste osservazioni, si è visto che nelle cellule di carcinoma HEP3 la riduzione dell'espressione dell'uPAR distrugge il legame uPAR/integrina, disattiva il segnale MAPK e obbliga le cellule tumorali in uno stato di quiescenza, arrestandole nella fase G0/G1 del ciclo cellulare (31,32). Quindi l'interazione del PAI-1 con l'uPA smaschera il sito ad alta affinità per LRP e VLDLR che, accanto all'internalizzazione del complesso PAI-1/uPA/uPAR, possono trasmettere attraverso i loro domini citoplasmatici segnali per il legame dell'uPA al suo noto recettore (33,35).

2.3 Coinvolgimento dell'uPAS nell'adesione e migrazione cellulare

Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato il coinvolgimento dell'uPAS nella modulazione sia dell'adesione che della migrazione cellulare (22,36). L'uPAS può prendere parte a questi processi con:

- a) incremento della disponibilità dei fattori di crescita mitogeni come l'HGF, il bFFGF e il TGF- β rilasciato dall'ECM;
- b) direttamente promuovendo la adesività intercellulare;
- c) modulando l'adesività intercellulare integrina-dipendente e il segnale intracellulare;
- d) fornendo i segnali chemotattici;
- e) promuovendo la proteolisi dei recettori di adesione.

L'adesività intercellulare è mediata dalle integrine e dagli eterodimeri trans membrana α e β , fattori che connettono le proteine della matrice extracellulare a quelle del citoscheletro. Seguendo il legame delle proteine all'ECM, la coda citoplasmatica delle integrine può attivare il FAK e la chinasi cellulare ematopoietica (UCK o Src), che dà origine a varie cascate di segnali, compresa la chinasi-3-fosfatidilinositolo (PI3K), il Rac GTPasi, il MAPK e la calpaina, capaci di modulare la forma cellulare, la migrazione e la proliferazione.

Anticorpi anti integrine o anti uPAR, come peptidi che contengono sequenze integrine che legano l'uPAR, inibiscono la migrazione cellulare mediata dalle integrine e la crescita, indicando che le integrine mediano la migrazione cellulare e la proliferazione elicitata dai complessi uPA/uPAR (22,10,37). L'uPAR legato all'uPA interagisce direttamente con il dominio N-terminale della subunità α dell'integrina, e possiede una elevata affinità per il recettore $\alpha_3\beta_1$ e $\alpha_5\beta_1$ della fibronectina integrina, e anche per $\alpha_v\beta_5$ e $\alpha_v\beta_3$, capaci di legare Vn, Mac 1 (10,8). Una conseguenza funzionale di queste interazioni è che l'uPAR legato all'uPA induce un'attivazione integrina-dipendente dei MAPKs Erk1 e Erk2, che stimolano attraverso la fosforilazione MCLK, la migrazione cellulare.

Inoltre è stato dimostrato che l'adesione cellulare è stimolata dal legame diretto dell'uPAR al dominio somatomedina B del Vn; questa interazione richiede la presenza di tutti e tre i domini dell'uPAR ed è fortemente stimolata dal legame con uPA ma inibita dal PAI-1. Anche il PAI-1 si lega con elevata affinità al dominio somatomedina B del Vn, stabilizzando l'inibitore nella sua forma attiva. Al contrario, il legame del PAI-1 al complesso uPA/uPAR riduce l'affinità del PAI-1 per Vn. La conseguente internalizzazione

del PAI-1/uPA/uPAR è stata responsabile per l'inibizione PAI-1 dell'adesione cellulare uPAR mediata al Vn. Ulteriori studi hanno dimostrato che il sito di legame del PAI-1 sul Vn si sovrappone a quelli dell'uPAR e dell'integrina $\alpha_v\beta_3$. E' stato dimostrato inoltre che il PAI-1 blocca l'interazione $\alpha_v\beta_3$ /Vn e inibisce la migrazione sul Vn di molti tipi cellulari (38,39). Tutte queste osservazioni suggeriscono che alti livelli di PAI-1 potrebbero inibire l'adesività intercellulare mediata da uPAR e integrine, mentre un'azione contraria potrebbe verificarsi per elevati livelli di uPA.

Il movimento cellulare in una data direzione si verifica sotto l'influenza di un gradiente di sostanze chemotattiche, come le chemochine, che sono riconosciute da specifici recettori di membrana cellulare. Anche l'uPA, così come il pro-uPA o l'ATF rappresentano stimoli chemotattici per molti tipi cellulari che esprimono uPAR. Il legame uPA/uPAR smaschera una sequenza chemotattica tra il dominio D1 e D2 dell'uPAR, per cui guida un'interazione laterale dell'uPAR con la proteina G accoppiata al recettore FPRL1 (un omologo del recettore peptide del formile), che trasduce il segnale chemiotattico del complesso uPAR/uPA.

2.4 Coinvolgimento dell'uPAS nell'angiogenesi tumorale

In assenza di micro-vascolarizzazione i tumori non sono in grado di progredire oltre un diametro di 2 mm, per cui una delle capacità funzionali che il tessuto tumorale deve acquisire allo scopo di progredire è di promuovere la neoangiogenesi (40,41). L'angiogenesi tumorale è stata descritta per la prima volta all'inizio del XX secolo e la sua inibizione era riconosciuta come un potenziale bersaglio per la terapia anticancro già 40 anni fa (42,43). La formazione di nuovi vasi, oltre a garantire l'ossigeno e i nutrienti alla cellula tumorale, provvede anche a promuovere la disseminazione metastatica. Molti sistemi sperimentali hanno dimostrato un ruolo importante dell'uPAS nel promuovere l'angiogenesi tumorale (22,27,44). L'uPA e l'uPAR sono indosabili nelle cellule endoteliali quiescenti. Nel corso della crescita tumorale la loro espressione è indotta dalle cellule endoteliali dei nuovi microvasi e dei macrofagi associati al tumore sotto l'azione di stimoli angiogenetici come bFGF, VEGF o l'ipossia. La plasmina prodotta localmente attiva fattori latenti mitogenici e angiogenici legati all'ECM, che promuovono la mitosi delle cellule endoteliali, l'invasione e la formazione di capillari. Tra questi il VEGF induce iperpermeabilità vascolare creando la possibilità per le cellule tumorali di metastatizzare e

di seguire la diffusione del fibrinogeno e di altre proteine del plasma nello spazio extracellulare. La trasformazione del fibrinogeno in fibrina da parte della plasmina dà origine alla formazione di una matrice di transizione, che forma un supporto strutturale per la migrazione delle cellule endoteliali (23,10,24,44).

Sulla base di molti dati sperimentali, il PAI-1 è attualmente considerato un fattore proangiogenico piuttosto che antiangiogenico. Il PAI-1 è presente nei vasi maturi, dove previene sia la proteolisi mediata dalla plasmina che l'adesione cellulare all'ECM uPAR dipendente. È stato dimostrato che la somministrazione di PAI-1 a concentrazioni terapeutiche inibisce l'angiogenesi indotta dall'FGF-2 nelle membrane corioallontiche del pulcino. Inoltre esperimenti condotti sul PAI-1 in topi knock-out hanno dimostrato che l'angiogenesi tumorale delle cellule maligne transfette era completamente abolita (45,46). Il PAI-1 potrebbe promuovere l'angiogenesi in conseguenza dell'internalizzazione dei complessi uPA/uPAR/PAI-1, dopo la quale l'uPAR è riciclato nella membrana plasmatica e localizzato su nuove aree di adesione al bordo della cellula. Perciò la rilocalizzazione dell'uPAR sembra essere cruciale sia per le cellule endoteliali che per la mortalità delle cellule tumorali (25,47,44).

Nel valutare l'effetto antigenico dell'uPAS, è necessario considerare che potenti inibitori dell'angiogenesi, detti angiostatine, derivano dalla digestione proteolitica del plasminogeno o della plasmina dall'uPA, dalla stessa plasmina o dalle MMPs (48,17).

Tutti antagonizzano i segnali indotti dai fattori di crescita, la proliferazione e la migrazione, e causano l'apoptosi nelle cellule endoteliali (49,50).

CAPITOLO 3

RILEVANZA CLINICA DELL'ESPRESSIONE DEI COMPONENTI DELL'uPAS NEI TUMORI UMANI

Il ruolo dell'attivatore del plasminogeno e della proteolisi della ECM era già noto 30 anni fa. Il valore prognostico dell'uPA è stato dimostrato nel 1988 da Duffy et al che ha documentato l'attività primaria dell'uPA nel cancro della mammella correlato con il volume del tumore e il numero di linfonodi ascellari metastatici. Comunque pazienti con elevati livelli di uPA nel tessuto tumorale mammario avevano un intervallo libero da malattia significativamente più basso rispetto a quelli con livelli inferiori. Difatti l'iperespressione di uno o più componenti dell'uPAS si è dimostrata associata con l'aggressività della neoplasia e uno scarso outcome clinico in molti tumori. Come riportato nella *tabella 3.1* i componenti dell'uPAS sono stati indicati come potenziali markers prognostici nei tumori della mammella, polmone, vescica, stomaco, colon, retto, endometrio, cervice, ovaio, pancreas, rene, tiroide e cervello, così come nei sarcomi dei tessuti molli. La variante solubile dell'uPAR è stata riportata predire l'invasione della membrana basale e una prognosi peggiore nei pazienti con mieloma multiplo, e la progressione della malattia dopo la terapia chirurgica e la metastatizzazione nel cancro della prostata (51,52). Paradossalmente elevati livelli di PAI-1 sono associati con una prognosi peggiore in molti tumori (*tabella 3.1*). È stato dimostrato che il PAI-1, interagendo con la vitronectina e i con complessi uPA/uPAR, fa sì che le cellule possano attaccarsi, staccarsi dal loro substrato e migrare. Comunque l'azione inibitoria del PAI-1 potrebbe favorire la progressione tumorale prevenendo l'eccessiva degradazione dell'ECM da parte dell'uPA, sostenendo lo stimolo mitogenico sulle cellule e promuovendo l'angiogenesi tumorale.

Al contrario alcuni studi che includono diversi tipi di tumori hanno dimostrato risultati contrastanti tra i livelli tumorali di PAI-2 e la sopravvivenza dei pazienti. Elevate concentrazione di PAI-2 nel tessuto tumorale sono associate con una buona prognosi nel cancro della mammella, dell'ovaio e del pancreas, mentre con una peggiore prognosi nel cancro del colon retto e dell'endometrio (53,58).

Tabella 3.1: Espressione dei componenti del PAS in relazione alla prognosi in diversi tipi di tumore

Tumore	uPA	uPA Sierico	uPAR	suPAR	PAI-1	PAI-2
Mammella	-	ND	-	ND	-	+
Ovaio	-/NA	-	NA	-	-	NA
Endometrio	-	ND	-	ND	-	-
Cervice	-/NA	ND	ND	ND	-/NA	-
Rene	-	ND	-	ND	-	ND
Vescica	-/NA	-	-	NA	ND	ND
Prostata	-	-	-	-	ND	ND
Capo e Collo	-	ND	-	NA	-	+
Esofago	-	ND	-	ND	-	+
Stomaco	-	ND	-	ND	-	ND
Colon-retto	-	ND	-	-	-	-
Fegato	-	-	-	-	-	ND
Pancreatic	-	ND	-	ND	-	+
Thyroid	-	ND	-	ND	-	NA
Glioma	-	ND	-	ND	-	ND
Polmone	-/NA	NA	-/NA	-	-/NA	ND
Leucemia	-	ND	-	-	-	ND

(-) prognosi infausta; (+) prognosi buona; (NA) nessuna associazione; (ND) non determinata.

Carcinoma della mammella

L'espressione del PAS, in particolare dell'uPAR, è stato studiato nei tessuti sani, nei tumori benigni e nei carcinomi della mammella. Nei tessuti sani e benigni i livelli di uPAR sono o completamente assenti o estremamente bassi, mentre nei tessuti tumorali si riscontra un aumento considerevole dell'espressione dell'uPAR (17,55). Non solo l'uPAR è maggiormente presente nelle neoplasie metastatiche della mammella, ma ha anche una precisa localizzazione, ovvero si trova sul fronte di invasione del carcinoma e in quelle cellule epiteliali che protrudono verso lo stroma. Oltre che dai tessuti tumorali l'uPAR viene espresso dai macrofagi e dai fibroblasti circostanti. A partire da queste evidenze sperimentali è stato proposto un modello di self-regolazione del PAS nel tumore della mammella. Le cellule cancerose e stromali, in seguito a un segnale paracrino, producono uPA. Quest'ultimo, dopo il legame col proprio recettore sulle cellule neoplastiche e sui fibroblasti, catalizza l'attivazione del plasminogeno a plasmina, che degrada l'ECM e promuove i processi invasivi. Quando però i livelli di uPA prodotto sono troppo elevati per mantenere il potenziale metastatico, le cellule tumorali o producono PAI-1 o internalizzano direttamente il complesso uPA-uPAR, rispondo in seguito il recettore libero sulla membrana (17).

Di conseguenza, l'uPA, il PAI-1 e l'uPAR sono tutt'ora i più importanti e validi fattori prognostici nel cancro della mammella, tanto da essere considerati più attendibili rispetto ai fattori classici, ovvero la grandezza e lo stadio tumorale. Inoltre il PAS costituisce un indicatore prognostico più affidabile di altri "markers" biologici come il recettore degli estrogeni, p53, HER-2 e la catepsina D (17,14).

Carcinoma dell'ovaio

Si conosce relativamente poco sul ruolo delle proteasi nel cancro dell'ovaio e del loro ruolo nel processo di metastasi intraperitoneale. Alcuni studi recenti, però, hanno documentato la presenza del PAS nel cancro dell'epitelio ovarico e il suo eventuale utilizzo come marker prognostico (17,14). Secondo tali dati, i tumori maligni possiedono livelli di uPAR molto più elevati rispetto ai tessuti normali, inoltre in questi ultimi l'uPAR è localizzato nel sottile monostrato epiteliale e in quantità minima nello stroma; invece nel tessuto neoplastico l'uPAR si trova nella massa centrale tumorale e in prossimità dello stroma. È stato dimostrato anche che l'uPA e l'uPAR sono entrambi coinvolti nel sito di

colonizzazione del tumore, sono presenti in uguale concentrazione ed aumentano l'invasività del tumore (17).

Carcinoma dell'endometrio

L'adenocarcinoma dell'endometrio è il più comune dei tumori ginecologici, per il quale non sono noti attualmente markers diagnostici e prognostici. In uno studio prospettico, l'espressione dell'uPAR è stata studiata su 65 tessuti endometriali iperplastici con noto stadio e grado istopatologico di malattia, recidiva e mortalità (56). I risultati hanno dimostrato una correlazione positiva tra l'espressione dell'uPAR e lo stadio del carcinoma endometriale, il grado istologico, l'intervallo libero di malattia (ILM) e la sopravvivenza. In uno studio recente, i livelli citosolici del PAI-1 e dell'uPA sono stati valutati con il metodo ELISA (57). Sia l'uPA e il PAI-1 sono associate con l'ILM, mentre solo l'uPA era correlato con la sopravvivenza. Anche elevati livelli di PAI-2 misurati con ELISA in estratti del carcinoma endometriale sono stati associati con prognosi peggiore e ridotto ILM (54,59,60). Queste evidenze mostrano che la determinazione della concentrazione di uPAR, uPA e PAI-1 in questo tumore può essere un utile marker prognostico nella stratificazione dei pazienti a basso e alto rischio di recidiva e mortalità.

Carcinoma della cervice

Il cancro della cervice, legato all'infezione da virus papilloma umano (HPV), rappresenta la terza causa più frequente di cancro tra le giovani donne con un'incidenza più elevata nei paesi in via di sviluppo. E' stato studiato il ruolo dei componenti dell'uPAS come fattori prognostici anche nel cancro della cervice. I risultati hanno mostrato che l'uPA, il PAI-1 e il PAI-2 erano aumentati rispetto ai tessuti normali nelle lesioni intraepiteliali squamose ed erano ancora più elevati nel cancro invasivo. Segni più evidenti erano osservati negli estratti di tumore di pazienti dallo Stadio II al IV (61,62). In particolare l'immunodeterminazione del PAI-1 in 108 specie del carcinoma della cervice era fortemente correlato con una ridotta sopravvivenza e con ridotto ILM.

Carcinoma renale

Il cancro a cellule renali è il più comune istotipo dei tumori urologici degli adulti, rappresentando il 3% di tutti i tumori dell'adulto. Il ruolo clinico di uPA, uPAR e PAI-1

nel cancro renale è stato valutato per la prima volta in uno studio prospettico che valutava 152 pazienti i cui livelli delle tre proteine venivano valutati con ELISA nel tessuto sano e tumorale. I risultati hanno dimostrato che i livelli di uPA e PAI-1 del tessuto tumorale erano significativamente correlati con la prevalenza delle metastasi a distanza così come con lo sviluppo di nuove metastasi post operatorie. Inoltre, usando un determinato cut-off i pazienti potevano essere suddivisi in alto e basso rischio di recidiva metastatica. Queste osservazioni sono poi state confermate con studi successivi, uno dei quali ha descritto una correlazione negativa della sopravvivenza con i livelli di uPA, uPAR e PAI-1 (63-65).

Carcinoma della vescica

I tumori della vescica originano in più del 90% dei casi dalle cellule transizionali costituite da diverse popolazioni cellulari con differente potenziale metastatico. Nel tessuto tumorale del cancro è stata documentata un'incrementata espressione dei geni per l'uPA e l'uPAR, ma la rilevanza prognostica dell'uPAR non è stata universalmente attestata (66-68). Molti studi hanno poi dimostrato che l'incrementata espressione dell'uPAR (ma non dell'uPA) rappresenta un vero fattore prognostico indipendente nel tumore della vescica (67,69). Infine è stato riportato che sia i livelli sierici dell'uPA che dell'uPAR sono aumentati rispetto ai controlli sani e che un elevato livello plasmatico di uPA rappresenta un fattore prognostico indipendente di ridotta sopravvivenza dopo la cistectomia radicale, mentre i livelli plasmatici di uPAR non erano correlati alla sopravvivenza (29,70).

Carcinoma della prostata

Il cancro della prostata è seconda causa di morte nell'uomo. Sono stati fatti pochi studi sull'espressione dei componenti dell'uPAS nel tessuto tumorale prostatico. Uno studio recente ha dimostrato che un'iperespressione dell'uPA è associata all'estensione extracapsulare del tumore (71). Uno studio condotto successivamente ha confermato che l'iperespressione dell'uPA o dell'uPAR è stata trovata in più dell'85% dei tumori ad alto grado, mentre livelli bassi o nulli di uPA o uPAR sono stati riscontrati nel tumore a basso grado e nell'iperplasia prostatica benigna (72). Inoltre è stato dimostrato che i livelli di uPA e uPAR sono direttamente correlati con i livelli sierici di PSA e lo sviluppo delle metastasi, e inversamente correlati con l'OS (73,74). Uno studio condotto recentemente ha analizzato l'espressione dell'uPA e dell'uPAR in 429 pazienti con cancro prostatico, 44

soggetti sani, 19 con metastasi linfonodi loco-regionali e 10 con metastasi ossee (52). I risultati hanno dimostrato che i livelli di uPA e uPAR sono più elevati nei pazienti con cancro rispetto ai soggetti sani e decrescono dopo la prostatectomia radicale. Inoltre, nei pazienti con cancro prostatico i livelli di uPA e uPAR aumentano in maniera esponenziale a partire dai pazienti con tumore non metastatico a quelli con metastasi linfonodali ed ossee. In un'analisi univariata, i valori preoperatori di uPA e uPAR erano significativamente elevati nei pazienti con estensione extracapsulare, coinvolgimento delle vescicole seminali e invasione linfonodale, vascolare e nervosa. Questi studi indicano che i valori dell'uPA e uPAR possono avere un ruolo diagnostico nell'identificare i tumori prostatici biologicamente aggressivi e nel predire la progressione del tumore e delle metastasi.

Carcinoma a cellule squamose del capo e del collo

Il carcinoma a cellule squamose del capo e del collo è una neoplasia ad elevata malignità ed è la sesta causa di morte nel mondo. Nonostante trattamenti aggressivi chirurgici, radioterapici e chemioterapici, il carcinoma a cellule squamose del capo e del collo ha un elevato tasso di morbidità e mortalità e una sopravvivenza a cinque anni inferiore al 50% per la recidiva loco regionale e le metastasi a distanza. Il coinvolgimento dell'uPA nel carcinoma a cellule squamose della laringe è stato descritto per la prima volta in un caso che metteva in relazione un significativo incremento dei livelli di uPA con la sua attività nel tessuto tumorale, più pronunciata in caso di metastasi linfonodali (75). Successivamente sono stati fatti altri studi che hanno meglio chiarito l'espressione dei componenti del PAS in questi tipi di tumore. I livelli di uPA, uPAR e PAI-1 sono incrementati nel tessuto tumorale rispetto alla mucosa normale e si associano a un comportamento altamente invasivo, stadio avanzato e prognosi peggiore (76,77). Livelli elevati di PAI-2 sono correlati a una più lunga sopravvivenza rispetto ai pazienti con livelli di PAI-2 indosabili, suggerendo un ruolo protettivo per questo inibitore (76).

Carcinoma dell'esofago

Il cancro dell'esofago è uno dei tumori più aggressivi e a più basso tasso di sopravvivenza. Molti studi hanno dimostrato una incrementata espressione di uPA, uPAR e PAI-1 nel tessuto tumorale e una bassa espressione di PAI-2, anche se il loro valore prognostico non

è stato unanimamente confermato da tutti gli studi clinici condotti (78). Nei pazienti con tumore uPA positivi è stata descritta l'invasione neoplastica della tonaca muscolare propria e metastasi linfonodali, che correla con una sopravvivenza ridotta rispetto agli uPA negativi e ai PAI-2 positivi (79). Il valore prognostico indipendente dell'uPA è stato dimostrato associato con una più bassa sopravvivenza nei pazienti uPA fortemente positivi rispetto a quelli con debole positività o negativi per uPA (80). Inoltre 2 studi quantitativi RT-PCR hanno proposto PAI-1 come nuovo parametro prognostico per il carcinoma a cellule squamose dell'esofago poiché è stato osservato un incremento significativo dell'espressione dell'm-RNA-PAI-1 nei tumori con stadio avanzato e metastasi (81).

Carcinoma gastrico

Il cancro gastrico è un tumore con prognosi infausta, a patogenesi ancora sconosciuta. Sulla base di osservazioni sperimentali l'uPAS è considerato il principale promotore dello sviluppo del cancro e delle metastasi. È stata dimostrata una correlazione tra l'espressione di uPA, uPAR and PAI-1 e il potenziale invasivo tumorale, la differenziazione, l'invasione linfatica e vascolare, le dimensioni del tumore e il tipo di infiltrazione (82). Lo sviluppo dei microvasi risultava marcatamente potenziato nei pazienti positivi per l' uPA e uPAR mRNAs e la proteina VEGF. Il valore prognostico indipendente di uPA, PAI-1 e uPAR è stato accertato in diversi studi. In particolare, uno studio prospettico che includeva 156 pazienti con cancro gastrico ha rivelato che l'uPAR espresso nelle cellule tumorali disseminate al momento del primo intervento chirurgico è un parametro prognostico indipendente per un intervallo libero da malattia più breve e ridotta sopravvivenza (83). Sembra che anche l'*Helicobacter Pylori* sia capace di indurre l'espressione di uPA, uPAR e PAI-2 mediante NK-kB(84).

Carcinoma del colon-retto

Il cancro colon-retto è uno dei tumori più diffusi nel mondo occidentale. Il tasso di sopravvivenza a 5 anni va dal 10% al 90% e dipende dal TNM. Molti studi hanno documentato un'incrementata espressione e attività dell'uPAS nelle cellule tumorali, sebbene sia ancora dibattuto il tipo cellulare coinvolto in tale processo (cellula maligna versus cellula stromale adiacente al tumore) (85). Elevati livelli di uPA e uPAR sono associati a una scarsa sopravvivenza e sono predittori indipendenti di metastasi epatiche e

di sopravvivenza dopo resezione chirurgica del tumore. Il livello di suPAR è un fattore prognostico indipendente dimostrato con varie analisi multivariate (86). Anche il PAI-1 e PAI-2 risultano incrementati nel cancro colon-retto e sono associati con l'estensione del tumore e una prognosi infausta (87).

Carcinoma epatico

Il cancro epatico è la quarta causa di morte nel mondo per cancro e la seconda in Cina. È caratterizzato da una ridotta sopravvivenza per il rischio di recidiva intraepatica o extraepatica dopo l'intervento. Molti studi hanno descritto elevati livelli di uPA, uPAR e PAI-1 nel tessuto tumorale rispetto a quello sano (88-90). Una valutazione immunoenzimatica dei livelli di uPA, PAI-1 e PAI-2 nel tessuto tumorale ha rivelato un'associazione positiva con coinvolgimento della vena porta, metastasi intraepatiche e grado istologico, indicando in particolare l'uPA come predittore di sopravvivenza libera da malattia (91). Un altro studio ha dimostrato che la coesistenza di tutte e tre le proteine è legata a una maggiore invasività e a una più alta mortalità (88). Altri studi hanno dimostrato livelli di uPA e suPAR nei casi di epatocarcinoma con metastasi linfonodali, extraepatiche, trombi neoplastici portali e cirrosi associate al tumore (89).

Carcinoma del pancreas

Il cancro pancreatico è una rara neoplasia che può insorgere spontaneamente o in associazione con una sindrome endocrina multipla. In entrambi i casi l'incidenza e il tasso di mortalità sono identici e sono richiesti nuovi strumenti diagnostici e prognostici per un precoce riconoscimento del tumore e una corretta valutazione della sua resecabilità e trattamento. Markers predittivi della sopravvivenza del paziente sono le proteine p16, MMP-7 e VEGF (92). Molti studi hanno dimostrato che la cascata del plasminogeno è coinvolta nella progressione e invasività del tumore e che l'incrementata espressione di uPA, uPAR e PAI-1 è associata allo stesso, indipendentemente dal suo stadio (93). Elevati livelli di mRNA-uPA sono associati a tumore scarsamente differenziato, mentre tessuto tumorale E-caderina negativo e uPA positivo sono stati correlati con aumentata estensione del tumore, metastasi a distanza, stadio clinico avanzato e tempo medio di sopravvivenza più breve (94). L'espressione dell'uPA e dell'uPAR è stata riscontrata in cellule stromali morfologicamente normali vicine al tumore ed è stato dimostrato che l'espressione

dell'uPA tumorale e dell'uPAR dei fibroblasti li correla positivamente con metastasi epatiche del cancro pancreatico (95).

Carcinoma della tiroide

Il tumore della tiroide rappresenta circa l'1% di tutti i tumori maligni ed è la sesta causa di tumore nelle donne negli Stati Uniti. La maggior parte dei tumori tiroidei è rappresentata dai carcinomi differenziati papillare e follicolare i quali, se si sdifferenziano, danno origine al carcinoma anaplastico altamente aggressivo e inevitabilmente fatale (96). Uno studio recente ha dimostrato un'incrementata attività dell'uPA e dell'MMPs nelle linee cellulari di carcinoma tiroideo di tipo follicolare estratte da metastasi polmonare (FTC-238) rispetto al clone cellulare meno invasivo derivato da metastasi linfonodale (FTC-133) (97). Uno studio ha descritto una diffusa espressione di uPA, uPAR e PAI-1, ma non è stata osservata nessuna correlazione con i parametri clinico-patologici (98). Al contrario un altro studio ha riportato l'associazione di elevati livelli di uPAR con carcinomi tiroidei scarsamente differenziati e più aggressivi, indicando questa proteina come un possibile fattore prognostico (99). I livelli degli attivatori del plasminogeno e del PAI-1 sono stati valutati anche con ELISA nella frazione citosolica del tessuto tumorale tiroideo benigno e maligno e di varie malattie non tumorali della ghiandola (100). Questi studi hanno dimostrato che campioni di tessuto tumorale maligno presentavano bassi livelli di tPA e alti livelli di uPA e PAI-1, mentre quelli di tessuto tiroideo benigno presentava una più alta concentrazione di tPA e più bassi livelli di uPA e PAI-1. Recentemente l'espressione dei componenti dell'uPAS nel carcinoma papillare tiroideo rispetto a quella del tessuto sano è stata valutata con le medie di metodi quantitativi di RT-PCR e Western blot. I risultati hanno dimostrato che la trasformazione maligna dei tireociti umani è associata con un'aumentata espressione di uPA, uPAR e PAI-1, sia sottoforma di mRNA che di proteina, mentre il tPA e il PAI-2 erano immodificati o ridotti. In particolare i livelli di uPAR e uPAR-mRNA erano significativamente più alti nel cancro tiroideo papillare metastatico, ed è emersa una correlazione tra incrementata espressione di uPA e le dimensioni del tumore. Uno studio più recente ha analizzato il livello delle proteine uPA e PAI-1 nella frazioni citosoliche del tessuto tiroideo tumorale e sano con ELISA (101). Le concentrazioni di entrambe le proteine erano diverse nei vari istotipi di cancro tiroideo, mostrando valori più bassi nell'adenoma e più alti nel carcinoma anaplastico. Inoltre uPA e PAI-1 erano più alti nel

carcinoma anaplastico rispetto a quello ben differenziato, così come nei tumori con invasione extratiroidea e con metastasi a distanza e quelli superiori a 1 cm di diametro. L'analisi della sopravvivenza ha dimostrato poi un significativo impatto sia di uPA che di PAI-1 sul tasso di sopravvivenza libero da malattia, conferendo un potenziale ruolo prognostico ai componenti del PAS nei tumori tiroidei. Nell'insieme questi studi hanno dimostrato nel cancro tiroideo una chiara correlazione tra l'espressione dei componenti dell'uPAS e alcuni dei maggiori fattori prognostici del tumore tiroideo, come le dimensioni del tumore e le metastasi linfonodale e a distanza.

Glioma

I glomi includono tutti i tumori del sistema nervoso centrale (SNC) che originano dalle cellule gliali, rappresentando circa il 50% delle neoplasie cerebrali. Tipicamente hanno un pattern di crescita diffuso, infiltrante, e raramente metastatizzano al di fuori del SNC. Studi su proteasi hanno indicato un ruolo prominente di uPA, uPAR, catepsina B e gelatinasi (MMP-2 e MMP-9) nella progressione tumorale, e nei casi di recidiva e inefficacia degli agenti chemioterapici convenzionali (102). In numerosi studi si sono dimostrati la presenza, la distribuzione e l'attività di uPAS nei glomi umani. Si è potuto verificare la presenza o l'assenza di uPA, uPAR e PAI-1 nella glia non neoplastica e nei gliomi a basso grado; al contrario si è riscontrata un'intensa espressione di tutte e tre le proteine nei gliomi ad alto grado, ovvero l'astrocitoma anaplastico e il glioblastoma (103). Studi IHC hanno mostrato un'elevata espressione di uPA nei siti di proliferazione microvascolare e di invasione della massa neoplastica (104). Inoltre la quantità di uPA e uPAR e l'attività enzimatica dell'uPA aumentano durante la crescita del glioblastoma inoculato nel topo nudo, suggerendo che l'iperespressione dell'uPA e dell'uPAR giocano un ruolo maggiore nella progressione tumorale (105). I livelli di uPA-mRNA nel tessuto tumorale correlano positivamente con la recidiva post-operatoria e una più bassa sopravvivenza e l'inibizione dell'espressione dell'uPA e della sua attività dà capo a una down regulation del potenziale invasivo delle cellule del glioma (106).

Carcinoma polmonare

Il tumore del polmone è la più comune causa di morte per cancro nel mondo e nonostante le avanzate scoperte terapeutiche molti pazienti hanno una bassa sopravvivenza a lungo

termine. La prognosi è criticamente influenzata dallo stadio della malattia alla diagnosi con una sopravvivenza a cinque anni per lo stadio I di circa il 70%. È stato valutato un possibile ruolo come fattore prognostico delle catepsine e dei componenti dell'uPAS in 147 casi di tumore polmonare non a piccole cellule (107). In questo studio i livelli medi delle proteine uPA, uPAR e PAI-1 misurate con ELISA erano più alti nel tessuto tumorale rispetto al parenchima polmonare sano. In particolare il PAI-1 era significativamente aumentato nelle cellule scarsamente differenziate rispetto a quelle bene e moderatamente differenziate e correlava con il tipo istologico essendo più alto nell'istotipo a cellule larghe e nel carcinoma atipico. Un altro studio ha valutato l'impatto prognostico del dominio 1 libero di uPAR [uPAR (I)] negli estratti di carcinoma a cellule squamose con immunofluorescenza (108). L'analisi multivariata che comprendeva uPAR (I), sesso, età, coinvolgimento linfonodale, dimensione del tumore e uPAR, valutato con il metodo ELISA, ha dimostrato un impatto prognostico statisticamente significativo per l'uPAR e le dimensioni del tumore. Un altro studio ha valutato il contenuto sierico di uPAR e suPAR nei pazienti con carcinoma non a piccole cellule e a piccole cellule allo stadio III e IV vs pazienti sani. È stata dimostrata una differenza significativa di suPAR tra i due gruppi, ma non per l'uPAR. Successivamente altri studi hanno messo in correlazione i livelli di suPAR, quale valore prognostico per la recidiva del tumore, con altri markers sierici, come la selectina-E e il CD44(109). I risultati ottenuti non permettono di riconoscere in modo univoco il valore prognostico di ciascuna proteina per cui sono necessari ulteriori studi.

Leucemia

Uno dei primi studi sul coinvolgimento dell'uPAS nella leucemia ha dimostrato la presenza di tPA nel midollo normale e dell'uPA nel midollo leucemico e che i complessi plasmina- α 2-antiplasmina sono generati localmente nel midollo leucemico (110). Successivamente studi *in vivo* hanno dimostrato la presenza di uPAR, uPA e PAIs nelle cellule del sangue normali, con una marcata iperespressione nelle cellule blastiche o nel siero dei pazienti con leucemia acuta, indicando il loro ruolo nel potenziale invasivo del tumore. I pazienti con alti livelli di uPAR avevano una maggiore tendenza all'infiltrazione cutanea e tissutale e una più alta frequenza di anomalie cromosomiche (111). L'espressione dell'uPAR è stata trovata ridursi nei pazienti con leucemia mieloide acuta che mostravano una remissione dopo terapia rispetto ai non responders, ed era

inversamente correlata alla probabilità di sopravvivenza libera da malattia (112). È stata riscontrata anche un'elevata espressione di PAI-1 nei pazienti con leucemia mieloide acuta. Altri studi hanno dimostrato la presenza di più alti livelli di suPAR nei pazienti con leucemia linfatica acuta e mieloide acuta e con correlazione con le cellule blastiche periferiche. Nei pazienti con leucemia mieloide acuta alti livelli erano riscontrati nelle forme M5 e in quelli con malattia residua dopo molti cicli di chemioterapia (113).

Altri tumori

Un'alterata espressione dei componenti dell'uPAS sono descritti anche in altri tipi di tumore, anche se i dati disponibili sono preliminari e sono necessari ulteriori studi. L'uPA è stato ritrovato aumentato nella frazione citosolica di tumori ossei, quali osteosarcoma, condrosarcoma, tumore a cellule giganti e sarcoma di Ewing, e una correlazione positiva è stata riscontrata tra il contenuto di PAI-1 e il volume dell'osteosarcoma e del condrosarcoma (114). Nei pazienti con condrosarcoma l'iperespressione dell'uPA è associato con un incrementato tasso di metastasi, una più bassa sopravvivenza libera da metastasi e una sopravvivenza ridotta a 5 aa (115).

Molti studi hanno dimostrato che l'uPAS è necessario per la migrazione delle cellule del melanoma e la metastatizzazione e uPA, PAI-1 and PAI-2 sono esclusivamente espressi nelle linee cellulari metastatiche (116,117).

CAPITOLO 4

CENNI SULL'UTILIZZO DELL'uPAS NELLA TERAPIA DEI TUMORI

Considerando il ruolo prominente che i componenti del sistema di attivatore del plasminogeno rivestono nella progressione tumorale, è stato ipotizzato l'utilizzo dell'uPAS nella terapia anticancro (22,23,29). La prima evidenza che l'inibizione dell'uPA potrebbe essere efficace nel prevenire le metastasi tumorali è stata riportata in uno studio condotto nel 1983, dove si dimostrò che anticorpi che inibiscono l'attività dell'uPA prevenivano la formazione di metastasi polmonari da carcinoma epidermoide umano (118). Da allora sono state messe a punto diverse strategie terapeutiche capaci di inibire l'espressione dei componenti dell'uPAS, l'attività dell'uPA, della plasmina o del PAI-1, e l'interazione uPA/uPAR.

4.1 Inibizione dell'espressione dei componenti dell'uPAS

L'inibizione dell'espressione genica dei componenti dell'uPA nei tessuti tumorali può avvenire a vari livelli:

- 1) segnali extracellulari che modulano negativamente la trascrizione genica dell'uPA o dell'uPAR;
- 2) interferenza con il legame degli effettori extracellulari (es. fattori di crescita) al loro recettore di membrana plasmatica o inibizione del loro segnale intracellulare postrecettoriale;
- 3) silenzio genico trascrizionale o post trascrizionale

4.1.1) Regolatori negativi della trascrizione del gene uPA o uPAR

Sono stati identificati diversi regolatori negativi dell'espressione genica di uPA e uPAR con potenziale rilevanza terapeutica per alcuni tumori umani, come gli analoghi del GnRH per il cancro prostatico (119), i ligandi del PPAR- γ per il carcinoma del pancreas (120), la calcitonina (CT) per il carcinoma della mammella (121) e i glucocorticoidi (GC) per il cancro del cavo orale, dell'ovaio, del pancreas, della prostata e per la leucemia promielocitica (122).

Queste osservazioni non vanno estese a tutti i tipi di tumori. La CT, ad esempio, sebbene

sia in grado di inibire l'espressione genica di uPA e uPAR e l'invasività delle cellule del carcinoma mammario, stimola l'interazione uPA-uPAR nel carcinoma della prostata (121). Inoltre stimola la down regulation dei suoi recettori attenuando la crescita tumorale e l'angiogenesi, incrementando l'apoptosi delle cellule maligne e riducendo notevolmente i livelli di uPA (123).

Il razionale per l'uso degli agonisti e antagonisti del GnRH nel cancro della prostata si basa sulla stretta dipendenza della crescita tumorale dagli androgeni circolanti. Questi tumori dopo un'iniziale risposta alla deprivazione ormonale diventano androgeno-indipendenti e crescono e metastatizzano. È stato dimostrato che il trattamento delle linee cellulari di carcinoma prostatico androgeno-indipendenti con GnRH agonisti (Leuprolide) o GnRH antagonisti (Cetrorelix) inibisce in modo significativo la proliferazione cellulare, riduce la secrezione di uPA e incrementa quella di PAI-1, riducendo così la capacità migratoria e invasiva delle cellule neoplastiche (119).

I ligandi per il PPAR- γ , usati come farmaci antidiabetici orali, sembrano avere un ruolo antitumorale nelle linee cellulari di tumore pancreatico. Essi infatti riducono l'invasività delle cellule pancreatiche trasformate, aumentando i livelli di PAI-1 e riducendo quelli di uPA (120).

I glucocorticoidi (GC) riducono il potenziale invasivo delle cellule neoplastiche inibendo la trascrizione dei geni per l'uPA e l'uPAR e sopprimono inoltre, l'attivazione trascrizionale mediata da AP-1 e da NF- κ B (124,125). In particolare è stato dimostrato che il desametasone sopprime l'espressione dell'NF- κ B nelle cellule di carcinoma squamoso del cavo orale.

Molte evidenze sperimentali hanno identificato nel p75 (NTR) (recettore per la neurotropina p75) il fattore di soppressione tumorale nel carcinoma della prostata e nel retinoblastoma (126).

Un ulteriore esempio di azione antitumorale legata alla soppressione del gene uPA è la proteina di legame del fattore di crescita simil-insulina di tipo 3 (IGFBP-3), che regola la crescita delle cellule del tumore polmonare non a piccole cellule mediante meccanismi IGF dipendenti e indipendenti.

4.1.2) Interferenze con stimoli extracellulari che inducono l'espressione dei componenti dell'uPAS

I fattori di crescita oltre a stimolare la crescita tumorale inducono anche l'espressione dei componenti dell'uPAS. Pertanto con l'inibizione del legame dei fattori di crescita al loro recettore o del segnale intracellulare post-recettoriale si prevengono i processi mediati dal legame uPA/uPAR, quali la migrazione cellulare, la formazione di metastasi e l'invasività della cellula neoplastica.

L'espressione, ad esempio, o la funzione aberrante dell'HGF o del suo recettore Met hanno un ruolo rilevante nella progressione di molti tipi di tumori associati a una prognosi infausta (127). Il legame dell'HGF al Met induce l'espressione genica di uPA e uPAR, dando inizio alla produzione di plasmina. La classe di antibiotici gentamicina (GA) è in grado di ridurre a concentrazioni nanomolari l'espressione di molte tirosinchinasi, incluso il Met. Pertanto la GA potrebbe esser un utile agente terapeutico nei tumori in cui l'interazione HGF/Met conferisce al tumore un potenziale invasivo o metastatico (128).

Sono stati sviluppati anche dei farmaci che si basano sull'uso di anticorpi specifici per il recettore EGF (EGFR). La famiglia EGFR comprende 4 tipi di recettori: c-erbB1, c-erbB2, c-erbB3 e c-erbB4, tutti iperespressi nei tumori di origine epidermoidale e associati a una prognosi infausta (129). L'EGFR è coinvolto nella traduzione dello stimolo per l'uPAR, contribuendo alla proliferazione delle cellule maligne che iperesprimono l'uPAR, inoltre l'EGF regola le proteine e l'mRNA dell'uPA, uPAR e PAI-1 e la formazione dei complessi uPA/uPAR/PAI-1 nelle cellule di carcinoma ovarico (130). Studi clinici condotti con anticorpi diretti contro il dominio extracellulare dell'EGFR, l'ICM-225, ne hanno dimostrato un incremento degli effetti terapeutici, specie se associati a chemioterapia o radioterapia convenzionali, in pazienti con tumore a uno stadio avanzato e che iperesprimevano l'EGFR.

Nei tumori altamente invasivi spesso si osserva un'iperattivazione delle vie di segnale della Proteina Chinasi C (PKC), della PI3K e della MAPK, responsabili dell'attivazione costitutiva dei fattori di trascrizione NF- κ B e AP1, i quali stimolano la trascrizione di uPA e uPAR (131). A tale scopo sono state messe a punto delle strategie terapeutiche con lo scopo di inibire o down-regolare l'espressione degli effettori coinvolti nelle vie di segnale sopramenzionate. In uno studio di fase I è stato dimostrato che l'inibizione della PKC con un oligonucleotide antisense ISIS 3521, determina una riduzione del volume del tumore in

8 di 14 pazienti senza nessun effetto tossico (132). Al contrario in uno studio di fase II è stato dimostrato che l'uso dell' ISIS 3521 non è efficace nel cancro colon rettile metastatico (133).

Sono state descritte numerose classi di PI3K comprendenti diversi isomeri con subunità catalitiche (p110) e regolatorie (p85 o p101) (134). È stato dimostrato che il PI3K è costitutivamente attivo nelle linee cellulari altamente invasive MDA-MB-231 del tumore della mammella e sostiene la migrazione cellulare mediante una persistente attivazione dell' NF-kB, potenziando la produzione di uPA. L'uso di specifici inibitori della subunità p110 (LY294002) riduce la secrezione di uPA, suggerendone un possibile ruolo terapeutico (135).

La ciclossigenasi 2 (COX-2) ha un ruolo fondamentale nella tumorigenesi. I suoi livelli, infatti, sono aumentati in molti tumori umani sia benigni che maligni, inclusi i carcinomi della prostata, del colon-retto, della mammella, del polmone e del collo (136). Studi epidemiologici hanno dimostrato che l'uso di inibitori della COX-2 riduce il rischio di molti tumori umani (136,137). È stato dimostrato che il celecoxib (Celebrex) riduce i livelli di uPA e di mRNA nel cancro della mammella, inibisce la mobilità cellulare e arresta le cellule nella fase G2M del ciclo cellulare (138).

Altri studi hanno dimostrato l'effetto chemio-preventivo dei polifenoli del the verde, in quanto inibiscono l'angiogenesi, l'invasività e la formazione di metastasi nel tumore del cavo orale e della mammella e inducono l'arresto della crescita e l'apoptosi mediante la regolazione di differenti vie di segnale (139).

4.1.3) Silenziamento genico trascrizionale o post-trascrizionale dei componenti dell'uPAS

Il fattore di trascrizione NF-kB gioca un ruolo fondamentale nella progressione, metastatizzazione e angiogenesi tumorale, incrementando non solo la trascrizione di uPA, uPAR e MMP-9, ma anche delle cicline D1, Bcl-2/Bcl_{XL} e VEGF, che stimolano rispettivamente la proliferazione, la sopravvivenza e l'angiogenesi della cellula tumorale (131). In un recente studio su 59 pazienti con tumore della mammella con recettori per estrogeni positivi l'incremento di NF-kB e di AP-1 è stato identificato come predittore di rilascio di metastasi. L'attività dell'NF-kB è regolata dalle proteine IκB che legano l'NF-kB nel citoplasma, impedendone l'interazione con il DNA. La riduzione dei livelli di

I κ B, fisiologicamente dovuta alla fosforilazione da parte di alcune chinasi e alla degradazione da parte di proteosomi, consente all'NF- κ B di migrare nel nucleo e attivare la trascrizione genica (140). Alcuni approcci terapeutici hanno lo scopo di inibire la degradazione dell'I κ B, usando un inibitore proteosomiale PS-341 (Bortezomib). Attualmente sono in corso studi di fase II sull'uso di tali inibitori (141).

Per alcuni tipi di carcinoma è stato proposto l'uso terapeutico di oligonucleotidi diretti contro fattori di trascrizione nucleare, quali l'NF- κ B, l'Sp-1, l'HNF-1, l'E2F e il CRE, allo scopo di inibirne l'espressione genica (142). Gli oligonucleotidi sono molecole instabili e sono state modificate in molecole chimeriche con l'aggiunta di acidi nucleici (PNA:DNA o PNA:RNA), resistenti alle proteasi e alle nucleasi, eccellenti candidati alle terapie antisenso e antigeniche (143).

Sono state messe a punto delle terapie atte a interferire con la metilazione del promoter CpG, che ha un ruolo importante nell'espressione genica di uPA, uPAR e PAI-1 (144). Da evidenze sperimentali è noto che il DNA della cellula neoplastica è globalmente ipometilato, pur coesistendo delle regioni ipermetilate, e che il DNA iper o ipo-metilato inibisce la trascrizione di fattori di soppressione tumorali, la regolazione della crescita e l'attivazione di geni che promuovono la progressione cellulare e la metastatizzazione. Sulla base di tali evidenze sono in corso studi clinici sull'uso di oligonucleotidi antisenso che hanno come target la DNA-metiltransferasi (145). Allo stato attuale solo l'MBD2b, una proteina che lega il DNA metilato, è stato identificato come possibile enzima demetilante il DNA (146). Difatti l'MBD2b inibisce l'invasività delle cellule tumorali, la metastatizzazione e l'espressione di uPA (144). Di notevole interesse sono esperimenti che mostrano come piccoli interferenti dell'RNA (siRNAs), che inducono il silenziamento genico post-trascrizionale, possono anche dirigere la metilazione del DNA e la repressione genica a livello trascrizionale (147).

4.2 Inibizione dell'attività dei componenti dell'uPAS

4.2.1) Inibizione dell'attività dell'uPA

La prima evidenza che ha dimostrato la possibilità di arrestare la progressione tumorale inibendo l'attività dell'uPA è stata la messa a punto di anticorpi anti-uPA (118). Successivamente l'attenzione è stata posta sull'uso di piccole molecole sintetiche, inibitori

dell'uPA, dotate di appropriata potenza, selettività e proprietà farmacocinetiche tali da poter essere usate come terapia antitumorale. Lavori più recenti hanno riconosciuto due composti del 4-sostituitobenzo[*b*]thiophene-2-carboxamidine, il B428 e il B623, come inibitori selettivi dell'uPA (148). In diversi lavori, le loro proprietà antitumorali sono state testate nelle linee cellulari in coltura ed è stata dimostrata la proprietà di inibire la proliferazione e l'angiogenesi delle cellule tumorali, entrambi processi mediati dall'uPA (149). Negli ultimi anni sono state proposte numerose molecole inibitori dell'uPA, ma solo il WX-UK1, un derivato della 3-aminophenylalanina, è entrato a far parte degli studi clinici di fase I e II, dove è stato dimostrato la sua efficacia nell'inibire la crescita e l'invasività tumorale (150).

Un'altra classe di inibitori selettivi dell'uPA molto studiata su modelli animali è l'ecotina, un inibitore serinproteasi, che ha una elevata affinità per l'uPA (151).

Recentemente è stato sviluppato un inibitore irreversibile dell'uPA, il difenilfosfonato, che reagisce col residuo di serina del sito attivo per formare un enzima inibente, ma sono necessari altri studi per ottimizzarne le proprietà inibitorie (152).

4.2.2) Inibizione dell'attività della plasmina

La bikunina, nota anche come HI-30 or UTI, è una glicoproteina che appartiene alla superfamiglia Kunitz, costituita da inibitori delle serinproteasi, costitutivamente prodotta e secreta dagli epatociti e si trova nel siero, nelle urine e nel liquido amniotico (153). La bikunina ha un effetto inibitorio su molte proteasi, si associa alla membrana plasmatica di molti tipi di cellule tumorali e agisce come modulatore negativo dell'invasione neoplastica. Tale proprietà risiede nel suo dominio C terminale di tipo II (HI-8) e in particolare nelle sequenze che inibiscono la plasmina (154). Inoltre la bikunina determina la down-regulation dell'espressione di uPA e uPAR, probabilmente attraverso la soppressione della cascata del segnale MAPK (155).

Un altro potente inibitore della plasmina è stato individuato nella proteina DX-1000, una variante del primo dominio Kunitz dell'inibitore della coagulazione associato alla lipoproteina umana. In uno studio è stato dimostrato che il trattamento della leucemia promielocitica acuta con DX-1000 blocca l'attivazione della MMP-9 mediata dalla plasmina (156).

4.2.3) *Inibizione dell'attività del PAI-1*

Poco si sa sul ruolo degli inibitori del PAI-1 nei tumori maligni. Studi preliminari hanno dimostrato la possibilità di inibire l'attività del PAI-1 mediante anticorpi anti PAI-1 (157). Successivamente sono state selezionate piccole molecole inibitorie del PAI-1, il PAI-039/tiplaxtinina, un derivato dell'acido indolacetico, che sembra impedire *in vitro* il legame PAI-1/Vn, inibendo così l'angiogenesi (158). Altri due inibitori, l'SK-216 e l' SK116, riducono l'espressione e l'attività del PAI-1, impedendo la formazione di polipi intestinali, indicando in tal modo il PAI-1 come possibile nuovo target terapeutico per la prevenzione dei tumori colon-retto (159).

4.3 Inibizione dell'interazione uPA/uPAR

Alcuni studi hanno dimostrato l'efficacia antineoplastica di anticorpi anti-uPAR che ostacolano le vie di attivazione del segnale (160). Uno studio molto recente riporta l'effetto antitumorale di nuove molecole simil anticorpi, che comprendono il frammento N-terminale (FNT) dell'uPA umano legato alla porzione Fc delle IgG1 umane, attraverso un legame flessibile (FNT-Fc). Questa molecola ha un effetto citotossico e un'attività antiangiogenica su molti tipi di cellule tumorali *in vitro*. Il distacco competitivo *in vitro* dell'uPA dal suo recettore da parte di un analogo cataliticamente inattivo ha determinato un decremento della proteolisi mediata dalla plasmina, suggerendo così la possibilità di avere un effetto antitumorale *in vivo* (161). A tale proposito è stato condotto uno studio su cellule di carcinoma prostatico metastatico, PC3, per valutare le conseguenze del legame dell'uPAR a un mutante dell'uPA non funzionante: è risultata una potente inibizione della formazione di metastasi, mentre la crescita del tumore primario in topi transfetti con cellule PC3 è simile ai controlli (162). Negli anni successivi sono stati fatti esperimenti con transfettanti stabili che esprimevano ATF o che venivano esposti all'ATF mediata da virus. L'ATF compete con il legame uPA/uPAR. Si è visto che la trasfezione cDNA ATF umano nelle cellule di carcinoma gigante-cellulare altamente metastatico del polmone riduceva significativamente la loro capacità invasiva *in vitro* (163). Oltre all'ATF è stato proposto un altro peptide sintetico che riproduce la regione dell'ATF che lega il recettore dell'uPA. Alcuni studi hanno dimostrato una significativa riduzione del tumore nelle cellule tumorali ovariche (164). Altri studi invece hanno testato la capacità delle forme solubili ricombinanti di uPAR (suPAR) di prevenire la proteolisi tumorale (165).

Sebbene il legame uPA/uPAR è mediato dal dominio simil-EGF, una seconda regione rappresentata dai residui 136-143 è in grado di legare l'uPAR. È stato dimostrato che un antagonista non competitivo sintetico (Ac-KPSSPPEE-Am), derivato da questa regione, inibisce la crescita neoplastica, la neovascolarizzazione e la metastatizzazione del tumore della mammella (166).

Un altro farmaco con proprietà antineoplastiche è la suramina, antiparassitario, le cui proprietà antitumorali derivano dalla capacità di bloccare alcuni recettori di fattori di crescita e l'interazione enzima-substrato, necessaria per la proliferazione e l'invasione cellulare (167).

SCOPO DELLO STUDIO

L'espressione aberrante dei componenti dell'uPAS nei tessuti maligni determina l'acquisizione da parte delle cellule neoplastiche di nuove competenze funzionali: self-sufficienza nei segnali di crescita, insensibilità ai segnali anticrescita, evasione dell'apoptosi, limitatezza del potenziale replicativo, sostenuta angiogenesi, invasione dei tessuti e potere metastatico. Negli ultimi anni oltre al ruolo dei componenti del PAS nella degradazione della matrice extracellulare, cui segue la progressione tumorale e la metastatizzazione, numerose evidenze sperimentali hanno evidenziato l'impatto dell'uPAS in molti aspetti dell'evoluzione neoplastica, quali la proliferazione cellulare, l'adesione e la migrazione intravasale ed extravasale, la crescita tumorale nei siti metastatici e la neangiogenesi.

In accordo con queste teorie le osservazioni su modelli animali sperimentali hanno mostrato che l'inibizione dell'uPAS riduce la crescita tumorale e la formazione di metastasi. E' stata inoltre documentata una stretta correlazione tra l'iperpressione di uno o più componenti dell'uPAS e una prognosi peggiore in molti tipi di tumori umani.

Alla luce di tali evidenze, nel presente studio abbiamo indagato il ruolo prognostico dell'urochinasi attivatore del plasminogeno (uPA), del recettore dell'uPA (uPAR) e dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) nelle linee di colture cellulari di tiroide normale, adenoma follicolare, carcinoma papillare, follicolare e anaplastico. Questa analisi è stata poi estesa in un primo momento a frammenti di tessuto tiroideo umano normale e tumorale prelevati da pezzi chirurgici ottenuti da 13 pazienti di sesso femminile di età comprese tra 26 e 76 anni, affette da carcinoma papillare variante classica (n=7) e variante follicolare (n=6) e successivamente a frammenti di tessuto tiroideo umano normale e tumorale prelevato da pezzi chirurgici ottenuti da 99 pazienti con carcinoma papillare tiroideo (PTC), di età compresa tra 11-83 anni, di cui 21 uomini e 78 donne, affetti da carcinoma papillare variante classica (n=77), variante follicolare (n=15), variante a cellule alte (n=4), variante con oncociti (n=3). Tutti i pazienti sono stati sottoposti a intervento di tiroidectomia totale.

MATERIALI E METODI

Linee cellulari e materiali

Le linee cellulari CAL-62, 8305C e B-CPAP sono state comprate dalla German Collection di Microorganismi e Colture Cellulari (DMSZ, Germania), mentre le FTC-133 e le MDA-MB-231 dalla Interlab Cell Line Collection (ICLC, Italia).

I terreni di coltura DMEM, RPMI 1640 e HAM'S F12, il tampone fosfato salino (PBS), il siero bovino fetale (FBS), la soluzione di tripsina 0,05% ed EDTA 0,02%, la L-glutammina (200mM) e la soluzione 100X di penicillina/streptomicina sono stati comprati da EuroClone (Paignton-Devon, UK). Il reagente Trizol, il primer oligo (dT)₁₂₋₁₈ 0,5 µg/µl, il mix di deossiribonucleotidi trifosfati (10 mM) e la trascrittasi inversa M-MLV (200 U/µl) sono stati acquistati dalla Invitrogen (Carlsbad, CA). La HotMaster™ Taq DNA polimerasi (5U/µl) e il Perfectprep® Gel Cleanup Kit sono stati comprati dalla Eppendorf (Hamburg, Germany). Tutti i primers sono stati ordinati alla Labtek Eurobio (Milano, Italia). La caseina bovina, il plasminogeno umano, l'aprotinina, il fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), il Blu di Comassie R-250, il Nonidet P-40 (N-P40) e il Tween 20 sono stati forniti dalla Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Lo standard proteico dei pesi molecolari (Precision Protein Standard™), il reagente Bradford e i vari reagenti per l'elettroforesi sono stati ordinati alla Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). I microconcentratori Centricon 10 sono stati acquistati dalla Millipore (Bedford, MA). Gli anticorpi monoclonali per l'uPA e per il suo recettore uPAR sono stati comprati dall'American Diagnostica Inc. (Stamford, CT). L'anticorpo monoclonale per l'actina è stato ordinato dall'Immunological Sciences (Roma, Italia). Gli anticorpi secondari coniugati alla perossidasi di rafano, le soluzioni di rilevamento SuperSignal® West Pico e SuperSignal® West Dura e il mix di inibitori delle proteasi "Halt Protease Inhibitor Cocktail" sono stati acquistati dalla Pierce (Rockford, IL).

Colture cellulari e tessuti tiroidei umani

Le linee cellulari CAL-62 e MDA-MB-231 sono state coltivate in medium DMEM al 10% di FBS, le linee 8305C e B-CPAP in medium RPMI 1640 al 10% di FBS, mentre le FTC-133 in DMEM e HAM'S/F-12 in rapporto 1:1 al 10% di FBS. A tutti i terreni sono stati aggiunti 100 U/L di penicillina, 100 µg/ml di streptomicina e L-glutammina 2 mM.

Le linee cellulari di tireociti umani derivate da una tiroide normale (HTU5) e da un adenoma follicolare (HTU42) sono state coltivate secondo i protocolli presenti in letteratura ^(a, b).

REFERENZE:

- a) Curcio F, Ambesi-Impiombato FS, Perrella G, Coon HG: *Long-term culture and functional characterization of follicular cells from adult normal human thyroids*. Proc Natl Acad Sci 91: 9004-9008, 1994.
- b) Perrella G, Fabbro D, Damante G, Di Loreto C, Beltrami CA, Curcio F, Ambesi-Impiombato FS: *Expression of differentiation markers in cultured cells from various thyroid diseases*. Thyroid 7: 817-821, 1997.

Le cellule sono state mantenute in colture aderenti monostrato a 37°C e 5% di CO₂ in atmosfera umidificata ed utilizzate nelle diverse procedure sperimentali ad una confluenza del 70-80%.

Frammenti di tessuto tiroideo umano normale e tumorale sono stati prelevati da pezzi chirurgici ottenuti inizialmente da 13 pazienti di sesso femminile di età comprese tra 26 e 76 anni, affette da carcinoma papillare variante classica (n=7) e variante follicolare (n=6). Successivamente lo studio è stato esteso a frammenti di tessuto tiroideo normale e tumorale prelevato da pezzi chirurgici ottenuti da 99 pazienti sottoposti a tiroidectomia totale per PTC, variante classica (n=77), variante follicolare (n=15), variante a cellule alte (n=4), variante con oncociti (n=3), di cui 21 uomini e 78 donne, di età compresa tra 11-83 anni, provenienti dalle Università di Roma (42 pazienti) e Padova (57 pazienti). La diagnosi istologica è stata eseguita indipendentemente da due differenti anatomopatologi secondo la Classificazione della WHO (179).

I campioni di tessuto tiroideo sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80 C° fino al loro utilizzo.

Tutti i pazienti hanno dato il loro consenso informato.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a tiroidectomia totale seguita nell'ultimo gruppo da terapia con radioiodio.

I pazienti con più di 45 anni sono stati sottoposti a tiroidectomia totale con svuotamento

dei linfonodi del compartimento centrale (VI livello) mentre nei pazienti con meno di 45 anni, sottoposti a tiroidectomia totale, lo svuotamento linfonodale è stato effettuato solo in caso di interessamento tumorale del linfonodo.

La resezione chirurgica dei linfonodi del compartimento laterocervicale (II-V livello) è stata effettuata sui pazienti con interessamento tumorale dei linfonodi diagnosticato prima dell'intervento attraverso FNAC e/o dosaggio della Tireoglobulina nel washout del materiale ottenuto dall' FNAC. Al momento dell'intervento le metastasi linfonodali sono state trovate in 41 pazienti e dopo la stadiazione delle metastasi tumorali, 65 pazienti sono stati classificati allo stadio I, 3 pazienti allo stadio II, 24 pazienti allo stadio III e 7 pazienti allo stadio IV. Quasi tutti i pazienti dopo 40-50 giorni dall'intervento chirurgico sono stati sottoposti a terapia con radioiodio seguita da terapia sostitutiva ormonale. Per monitorare la loro condizione di intervallo libero da malattia (DFI), dopo 4-5 mesi tutti i pazienti sono stati sottoposti ad ecografia del collo e dosaggio della Tireoglobulina sierica. A quel momento 3 pazienti presentavano persistenza di malattia. Le recidive sono state diagnosticate mediante dosaggio della Tireoglobulina sierica sia basale che dopo stimolo con TSH umano ricombinante, FNAC e/o determinazione della Tireoglobulina nel washout del materiale ottenuto dall'FNAC dei linfonodi, scintigrafia total body con ¹³¹I, analisi istologica dopo resezione chirurgica della lesione. Durante il follow up sono state diagnosticate 16 recidive, 12 con interessamento dei linfonodi cervicali e 4 con metastasi a distanza. Il follow up ha incluso 76 pazienti (media 21.66±13.57 mesi, range 6-64 mesi), di cui 50 pazienti tutti allo stadio I secondo il sistema di classificazione TNM. Il limite più basso di tempo per la recidiva è stato a 6 mesi. Due pazienti sono morti per la persistenza di malattia a 4 mesi dalla diagnosi.

Estrazione delle proteine da colture cellulari e tessuti

Le cellule in coltura sono state lavate con PBS, quindi staccate dalle fiasche mediante uno scraper e raccolte in 200 µl di tampone di lisi RIPA (Tris-HCl pH 7.4 50 mM, EDTA 1 mM, SDS 0,25%, NaCl 500 mM, NP40 1%) a cui è stato aggiunto un mix di inibitori delle proteasi. I pezzi chirurgici sono stati immersi nello stesso tampone completo di inibitori e triturati con l'omogeneizzatore Ultra-Turrax. In seguito, tutti i campioni sono stati sottoposti a tre cicli di sonicazione per 10 secondi (90% di ampiezza degli ultrasuoni) intervallati da 10 secondi di pausa, e successivamente centrifugati a 15000 g per 15 minuti

a 4°C. I supernatanti sono stati raccolti e le proteine cellulari dosate come descritto in seguito. Tutti i passaggi dell'estrazione sono stati eseguiti mantenendo i campioni in ghiaccio.

Determinazione del contenuto proteico

La quantità di proteine presenti nei lisati cellulari o tissutali è stata determinata mediante il metodo Bradford (Bradford 1976). Tale metodo si basa sulla proprietà del Comassie Brilliant Blue di reagire in ambiente acido con le proteine, virando da un colore bruno ad un blu la cui intensità è proporzionale alla quantità di proteine presenti ed è determinabile spettrofotometricamente leggendo l'assorbanza a $\lambda=595$ nm. La concentrazione proteica totale di ogni campione è stata valutata costruendo una retta di riferimento con quantità note di una soluzione stock di BSA (albumina di siero bovino) 1 mg/ml. Nella preparazione degli standard è stato aggiunto un volume di tampone di lisi uguale a quello impiegato per i campioni, al fine di compensare la quota di assorbanza dovuta ai costituenti del tampone di lisi. Infine, le concentrazioni proteiche incognite sono state determinate per interpolazione dei valori ottenuti sulla retta di riferimento.

Zimografia

Le cellule in coltura sono state lavate per due volte nei rispettivi terreni privi di siero, dopo di che sono state incubate in assenza di siero per 24 ore. Al termine dell'incubazione, i media condizionati (CM) sono stati raccolti e poi centrifugati a 1200 rpm per 5 minuti per eliminare i residui cellulari; i supernatanti sono stati prelevati e concentrati mediante centrifugazione in unità filtranti (Centricon 10) fino a ridurre il volume iniziale di circa 35 volte. Le proteine presenti nei supernatanti delle diverse linee cellulari sono state normalizzate sulla base delle concentrazioni proteiche cellulari. Il supernatante della linea MDA-MB-231 di carcinoma mammario è stato impiegato come controllo positivo. Aliquote corrispondenti a 4 μ g di proteine cellulari sono state miscelate al tampone di caricamento (Tris-HCl 0.4 M pH 6.8, SDS 5%, glicerolo 20% e blu di bromofenolo 0.03%), uniformando i volumi con Tris-HCl 50 mM pH 7.4. Quindi i campioni sono stati caricati su un gel al 12.5 % di poliacrilammide contenente caseina 0.1% e plasminogeno 12 μ g/ml, e la corsa elettroforetica è stata condotta a 100 V per circa 2 h in tampone Tris-Glicina (Trisma base 125 mM, Glicina 1,25 M) con SDS al 10%. Quindi il gel è stato

lavato dapprima in una soluzione Tris-HCl 50 mM pH 7.4 contenente Triton X-100 al 2%, e successivamente in Tris-HCl 50 mM pH 7.4. Entrambi i passaggi sono stati eseguiti in agitazione costante a 37°C per 20 minuti. In seguito il gel è stato incubato in un tampone Tris-HCl 50 mM pH 7.4 con Triton X-100 0.1%, in agitazione costante a 37°C per circa 4 ore. Infine, il gel è stato colorato in una soluzione di Blu di Coomassie 0.1%, 25% di metanolo e 7% di acido acetico, e quindi decolorato in una soluzione analoga priva del colorante (Hawkes 2001; Kleiner 1994). Le zone chiare comparse sullo sfondo blu indicavano la presenza dell'attività proteolitica. Al fine di accertare la specificità enzimatica delle bande osservate, sono stati eseguiti in parallelo esperimenti di controllo nei quali il gel è stato incubato nelle stesse condizioni con l'aggiunta di aprotinina 10 µM e PMSF 1 mM, inibitori delle serin proteasi, che determinavano la completa scomparsa delle bande (dati non mostrati). Il peso molecolare di ogni banda è stato valutato per confronto con uno standard di proteine di peso molecolare noto con l'ausilio del sistema UVIPRO GEL (Eppendorf), e l'intensità relativa delle bande è stata misurata con uno scanning densitometrico, tramite il Molecular Analyst PCTM software per il densitometro a scansione Biorad model 670.

Western-Blotting

I campioni sono stati preparati con 50 µg di estratti proteici cellulari a cui è stato aggiunto il tampone Laemmli riducente (Tris-HCl 120 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerolo 10%, Blu di Bromofenolo 0.01%, 5% β-mercaptoetanol), uniformando i volumi con Tris-HCl 50 mM pH 7.4. Le miscele ottenute sono state riscaldate a 95°C per 5 minuti e poi caricate su un gel al 12.5% di poliacrilammide, unitamente ad un marker di pesi molecolari (Precision Protein StandardTM). La corsa elettroforetica è stata condotta a 120 V costanti per circa 2 ore in tampone Tris-Glicina (Trisma base 125 mM, Glicina 1,25 M) con SDS al 10%. Le proteine sono state quindi trasferite dal gel su una membrana di nitrocellulosa. Il trasferimento è stato effettuato a 80 V costanti per 2 ore a 4°C in un tampone Tris-Glicina (Trisma base 240 mM, Glicina 200 mM) contenente etanolo al 10%. La membrana è stata poi recuperata ed immersa in una soluzione acquosa di rosso Ponceau per visualizzare le bande delle proteine trasferite, controllando così l'efficienza di trasferimento. In seguito il colorante è stato rimosso mediante ripetuti lavaggi con acqua deionizzata.

I siti di legame aspecifici presenti sulla membrana sono stati saturati mediante una preincubazione con latte non grasso al 5% in tampone TBS-T (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, NaCl 50 mM, Tween-200 0.1%) per 2 ore a temperatura ambiente, in agitazione costante. Quindi, le membrane sono state lavate tre volte in una soluzione di TBS-T e latte non grasso al 2,5 % e poi incubate per una notte a 4°C in agitazione costante nella stessa soluzione con aggiunta degli anticorpi anti-actina (0,2 mg/ml), anti-uPA (1 mg/ml) o anti-uPAR (2 µg/ml). Successivamente, le membrane sono state lavate tre volte in TBS-T con latte non grasso al 2,5% per rimuovere l'anticorpo non legato ed incubate per 2 ore nella stessa soluzione con anticorpi secondari coniugati alla perossidasi di rafano (1:1000).

L'immunoreattività è stata rilevata tramite una reazione di chemiluminescenza utilizzando le soluzioni di rilevamento con luminolo (SuperSignal® West Pico) o perossidi stabili (SuperSignal® West Dura). Infine l'emissione di luce è stata rilevata esponendo le membrane su lastre fotografiche (CL-XPosure™ film, Kodak). I pesi molecolari di ciascuna banda sono stati valutati per confronto con lo standard di proteine di peso molecolare noto, con l'ausilio del sistema UVIPRO GEL (Eppendorf).

Estrazione e quantificazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto dalle linee cellulari e dai campioni di tessuto secondo la metodica del guanidinio tiocianato-fenol-cloroformio (Chomczynsky e Sacchi, 1987). Le cellule cresciute in monostrato sono state lavate con PBS e quindi lisate nella fiasca di coltura con 1 ml di reagente Trizol per 10⁷ cellule, mentre i pezzi chirurgici sono stati immersi in 1 ml di Trizol ed omogeneizzati con l'Ultra-Turrax. Quindi al lisato sono stati aggiunti 100 µl di cloroformio, e dopo una vigorosa agitazione i campioni sono stati centrifugati a 14000 rpm a 4°C per 15 minuti. Successivamente, la fase acquosa superficiale è stata prelevata e trasferita in un nuovo tubo, a cui è stato aggiunto un volume di isopropanolo pari alla metà del volume iniziale di Trizol. I campioni sono stati lasciati a temperatura ambiente per 15 minuti e poi centrifugati a 14000 r.p.m. per 15 minuti a 4°C. Il pellet così ottenuto è stato lavato con etanolo 75% (800 µl per 50-100 µg di RNA), nuovamente centrifugato per 10 minuti a 10000 rpm a 4°C, asciugato e infine risospeso in H₂O DEPC. L'integrità della preparazione di RNA è stata controllata sottoponendo 2 µg di ciascun campione ad elettroforesi in gel di agarosio all'1% in presenza di bromuro di etidio, al fine di visualizzare le bande di RNA ribosomiale. La concentrazione dell'RNA è

stata misurata per via spettrofotometrica (Ultrospec II, LKB BIOCHROM) tramite una lettura a $\lambda=260$ nm, mentre la purezza della preparazione finale è stata valutata tramite il rapporto di assorbanza 260/280 nm, che è risultato $\geq 1,8$ per tutti i campioni.

RT-PCR e PCR

Cinque μg di RNA sono stati impiegati per la reazione di retro-trascrizione dell'mRNA utilizzando come primer l'oligo(dT)₁₂₋₁₈, che si appaia alle code poliadenilate dell'mRNA. La reazione è stata attuata in quattro fasi:

1. Preparazione della miscela di reazione: 5 μg di RNA + 1 μl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + 1 μl di dNTP mix (10 mM) + H₂O DEPC fino ad un volume finale di 13 μl . Incubazione per 5 minuti a 65°C e rapido raffreddamento in ghiaccio.
2. Aggiunta di 4 μl di 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) + 2 μl DTT 0,1 M. Preincubazione per 2 minuti a 37°C.
3. Aggiunta di 1 μl di Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) (200 U/ μl). Incubazione 50 minuti a 37°C.
4. Disattivazione dell'enzima tramite incubazione per 15 minuti a 70°C.

L'mRNA totale è stato estratto dai tessuti tiroidei come precedentemente descritto e trascritto in forma inversa. Il DNA copia (cDNA) ottenuto è stato utilizzato come template per la successiva amplificazione in PCR. Il controllo per l'eventuale contaminazione da DNA genomico o esogeno è stato realizzato omettendo l'enzima trascrittasi inversa durante la fase di retro-trascrizione. Il cDNAs è stato usato per l'amplificazione PCR quantitativa dei componenti dell'uPAS e di sette differenti geni housekeeping utilizzando una serie di primers (*tabella 1*).

Real Time pCR o PCR quantitativa

La real time PCR è una tecnica altamente sensibile che permette di amplificare e quantificare in tempo reale specifiche sequenze di acidi nucleici. Nel presente studio è stato utilizzato il termociclatore LightCycler (Roche Applied Science), munito di una camera di reazione che amplifica il template all'interno di tubi capillari. I campioni sono stati allestiti con il LightCycler® FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I Kit (Roche

Diagnostic, Mannheim, Germany). Ciascuna miscela di reazione prevedeva un volume finale di 20 μ l con la seguente composizione: una “Master Mix” contenente l’enzima FastStart Taq DNA Polymerase, il SYBR Green I, dNTP (con dUTP anziché dTTP) e $MgCl_2$, specifici primers 0,5 μ M (Tabella 2), ~12,5 ng di cDNA ed acqua “DNAsi-free”. Il programma di PCR del LightCycler è stato impostato in tre fasi sequenziali:

- Denaturazione preliminare del template e contemporanea attivazione della polimerasi mediante una preincubazione a 95°C per 10 minuti;
- 40 cicli di amplificazione (denaturazione a 95°C per 10 secondi, appaiamento dei primers alle temperature ottimali di ciascuna coppia per 10 secondi ed estensione dei neofilamenti a 72°C per 25 secondi);
- Creazione delle curve di melting (denaturazione a 95°C per 1 secondo, appaiamento delle sequenze a 60°C per 15 secondi e denaturazione lenta [0,1°C/secondo] fino a 95°C).

Il SYBR Green è un fluoroforo che si lega specificamente al DNA duplex durante la fase di appaiamento del DNA, e tale interazione provoca un incremento della sua fluorescenza intrinseca. Nei primi 10-15 cicli la macchina rileva generalmente un segnale di fondo, mentre nei successivi compare un segnale di emissione che aumenta in modo direttamente proporzionale alla quantità delle doppie eliche amplificate. Il primo incremento significativo della fluorescenza viene definito *crossing point* (C_p) e rappresenta il valore di riferimento per la quantificazione del campione. Per tutti i geni in esame e per un gene di riferimento costitutivamente espresso (β -actina) sono state prodotte delle curve standard utilizzando diluizioni seriali di cDNA derivante dalla linea 8305C, che esprime tutti i geni in esame a livelli sufficientemente elevati. Al termine della PCR, la quantificazione relativa è stata effettuata tramite il metodo $\Delta\Delta C_p$, usando il Relative Quantification software 1.0 (Roche Applied Science). L’espressione dei geni del PAS nei tessuti tumorali della tiroide o nelle linee cellulari tumorali è stata normalizzata rispetto a quella trovata nei tessuti normali o nella linea cellulare HTU5, rispettivamente. La specificità degli amplificati è stata verificata inizialmente con la determinazione delle curve di melting e l’osservazione degli amplificati su gel di agarosio al 2% contenente bromuro di etidio. Inoltre, i cDNA sono stati eluiti dal gel, purificati con il Perfectprep® Gel Cleanup Kit

(Eppendorf) e sottoposti al sequenziamento in presenza di nucleotidi marcati con fluoresceina, utilizzando lo strumento ABI Prism 377TM DNA sequencer (Perkin Elmer), e le sequenze così ottenute sono state confrontate con quelle attese. Gli specifici ampliconi sono stati controllati da sequenze automatiche di DNA (Primm; San Raffaele Biomedical Science Park, Milano Italia).

Tabella 1: Primers utilizzati in real time PCR

	SEQUENZA
uPA	F 5'-GCTCAAGGCTTAACTCCAACAC-3' R 5'-TCCTTGGAACGGATCTTCAG-3'
tPA	F 5'-TCTTAGATTTTCGTGTGCCAG-3' R 5'-CTCTGAGCTGTACTTCCCCG-3'
uPAR	F 5'-GAAGATCACCAGCCTTACCG-3' R 5'-AACGGCTTCGGGAATAGG-3'
PAI-1	F 5'-ATACTGAGTTCACCACGCC-3' R 5'-GTGGAGAGGCTCTTGGTCG-3'
PAI-2	F 5'-GCTTCCAGATGAAATTGCCGA-3' R 5'-GCTTCAGTGCCCTCCTCATT-3'
β-Actina	F 5'-CAAGAGATGGCCACGGCTGCT-3' R 5'-TCCTTCTGCATCCTGTCCGCA-3'
gliceraldeide-3- fosfatodeidrogenasi	F 5'-ATCATCAGCAATGCCTCTG-3' R 5'-GGCCATCCACAGTCTTCTG-3'
ipoxantina fosforibosiltransferasi-1	F 5'-ATGCTGAGGATTTGGAAAGG-3' R 5'-AATCCAGCAGGTCAGCAAAG-3'
β2-microglobulina	F 5'-CAGCAGAGAATGGAAAGTC-3' R 5'-CATGCTGCTTACATGTCTCG-3'
Proteina ribosomiale L13a	F 5'-ACCGTGCGAGGTATGCTG-3' R 5'-TAGGCTTCAGACGCACGAC-3'
TATA box proteine binding	F 5'-GCAAGGGTTTCTGGTTTGC-3' R 5'-GGTCAGTCCAGTGCCATAAG-3'
complesso succinato deidrogenasi subunità A	F 5'-GCATAAGAACATCGGAACTGC-3' R 5'-GGTCGAACGTCTTCAGGTG-3'

Determinazione dei geni di riferimento più stabili e analisi dei dati

Sette geni di riferimento candidati sono stati amplificati dalla RT-PCR quantitativa in un sottogruppo campione composto da 15 tessuti normali e 15 tessuti tumorali abbinati e classificati in base alla loro stabilità con l'applicazione Visual Basic geNorm per Microsoft Excel (Richmond, CA) (180). I tre geni risultati più stabili sono gliceraldeide-3-fosfatodeidrogenasi, proteina ribosomiale L13a, e il complesso succinato deidrogenasi subunità A, assunti come geni di riferimento per tutti i campioni. La quantificazione relativa del campione tumorale rispetto alle sue controparti normali è stata realizzato mediante la Relative Expression Software Tool (2009) (180), utilizzando un fattore di normalizzazione calcolato come media geometrica dei tre geni di riferimento. I risultati sono stati riportati come $media \pm SEM$ e valori medi.

ANALISI STATISTICA

Tutti i risultati sono stati espressi come valor medio \pm errore standard di almeno tre esperimenti indipendenti. Le medie ottenute per le diverse linee cellulari sono state comparate statisticamente mediante il test di Student e considerate significativamente differenti qualora la probabilità di uguaglianza risultava inferiore a 0,05. Per valutare una possibile associazione dei livelli di espressione dei vari componenti del PAS con i parametri clinici dei pazienti, è stato calcolato il coefficiente di correlazione r di Bravais-Pearson attraverso il software SPSS (SPSS Inc., Chicago, Ill.). I dati non parametrici ottenuti dai prelievi chirurgici sono stati paragonati con il metodo Wilcoxon utilizzato anche per calcolare la significatività statistica della differente espressione dei vari componenti dell'uPAS nei tessuti tumorali, rispetto ai tessuti normali e nei tessuti tumorali metastatici rispetto ai tessuti tumorali non metastatici. La significatività statistica della differente espressione dei livelli dei componenti dell'uPAS nelle varianti di PTC, pT e gli stadi TNM è stata analizzata col metodo ANOVA seguito dal test Tukey post-ANOVA. L'analisi della correlazione tra l'mRNA di ogni componente dell'uPAS e gli altri parametri, come la grandezza del tumore, rappresentata dal diametro maggiore della lesione, o l'età del paziente, è stata valutata mediante l'indice di correlazione di Spearman. L'impatto dell'espressione dei componenti dell'uPAS sull'intervallo libero da malattia (DFI) è stata analizzata attraverso l'analisi Kaplan-Meier combinata al test di Mantel Cox log. Per l'analisi Kaplan-Meier tutti i campioni tumorali sono stati dicotomizzati usando i seguenti valori di cut-off: 3.8 per Upa; 3.0 per uPAR; 3.5 per PAI-1. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate usando il software GraphPadPrism (La Jolla CA). I risultati sono stati considerati come differenze statisticamente significative quando i valori di P risultavano inferiori a 0.05.

RISULTATI

L'attività enzimatica degli attivatori del plasminogeno è stata esaminata mediante zimografia nei medium condizionati (CM) delle diverse linee cellulari incubate per 24 h in assenza di siero, e confrontata con quella notoriamente presente in una linea cellulare di carcinoma mammario, MDA-MB-231.

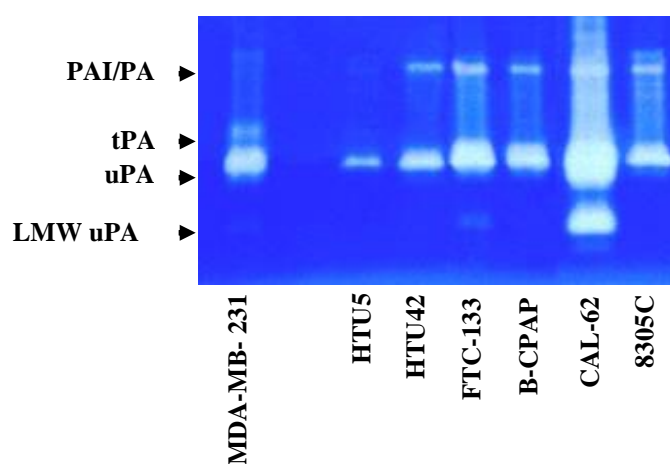


Figura 1: Analisi zimografica dell'attività dei PAs nei CM delle diverse linee cellulari tiroidee umane, normali e tumorali.

I risultati ottenuti hanno rivelato la presenza di attività dell'uPA (55 KDa) in tutte le linee cellulari testate (*figura 1*), e l'analisi densitometrica ha evidenziato che, rispetto alle HTU5, l'attività dell'uPA è significativamente incrementata nei supernatanti delle cellule HTU42 di 1.44 ± 0.16 ($p < 0.05$), in quelli delle FTC-133 di 2.97 ± 0.28 ($p < 0.01$), in quelle delle B-CPAP di 2.58 ± 0.14 ($p < 0.01$), in quelle delle CAL-62 di 4.41 ± 0.86 ($p < 0.05$) e in quelle delle 8305C di 2.30 ± 0.19 ($p < 0.01$) (*figura 2*). Nello zimogramma riportato in *figura 1* si può inoltre osservare la presenza di una banda enzimatica di circa 35 KDa nel CM delle CAL-62 e in misura minore anche in quello delle FTC-133, probabilmente dovuta alla forma a basso peso molecolare dell'uPA (LMW uPA). Inoltre, nel CM delle HTU5 si intravede una banda litica più alta (110 kDa), corrispondente ai complessi formati dall'uPA

con gli inibitori PAIs, che diviene più marcata in tutti i CM derivanti dalle linee tumorali. Contrariamente all'uPA, l'attività del tPA non è osservabile in alcuna linea.

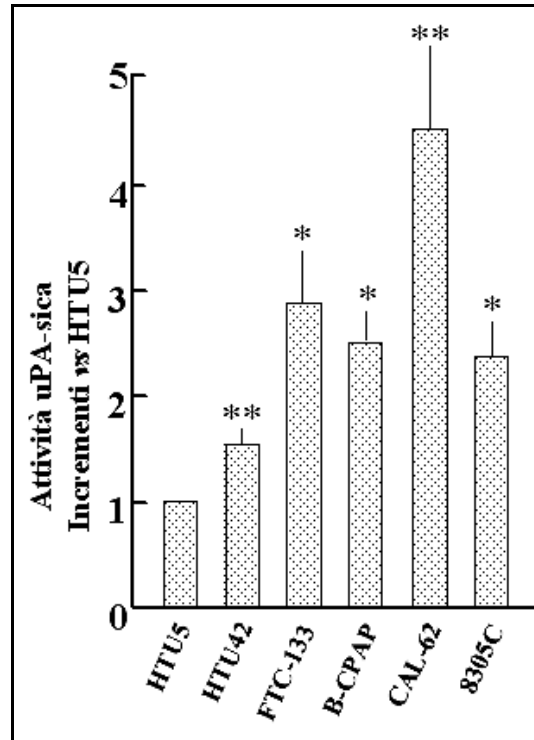
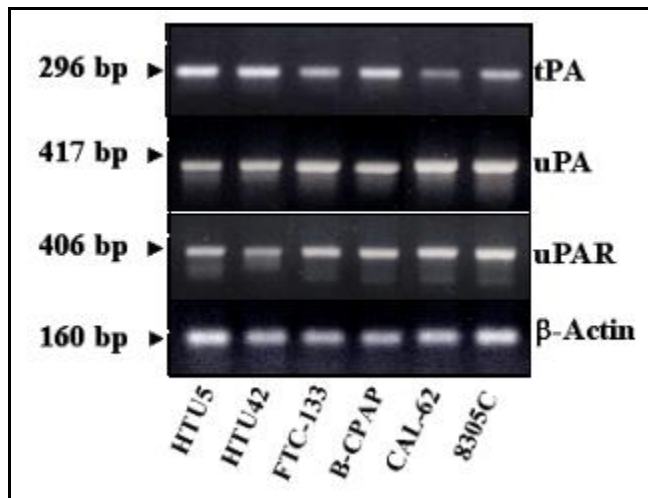


Figura 2: Analisi densitometrica dell'attività zimografica dei PAS nelle diverse linee cellulari (*= $p < 0,01$, **= $p < 0,05$).

L'incubazione del gel con PMSF o aprotinina comportava l'inibizione di tutte le attività enzimatiche (dati non mostrati) confermando la natura serin-proteasica degli enzimi.

Il livello di espressione dei geni costituenti il PAS è stato analizzato tramite esperimenti di real-time PCR. Dai dati ottenuti il livello di espressione dell'uPA risulta invariato nelle HTU42 rispetto alle HTU5, mentre incrementi statisticamente significativi sono stati riscontrati in tutte le linee tumorali maligne (*figura 3B*). Un profilo identico si evidenzia anche per l'espressione dell'mRNA dell'uPAR, il quale aumenta nelle linee cancerose rispetto alla linea normale e a quella derivante da adenoma (*figura 3A*). L'mRNA del tPA compare sia nelle cellule normali che in quelle neoplastiche, senza tuttavia mostrare differenze rilevanti (*figura 3B*).

A)



B)

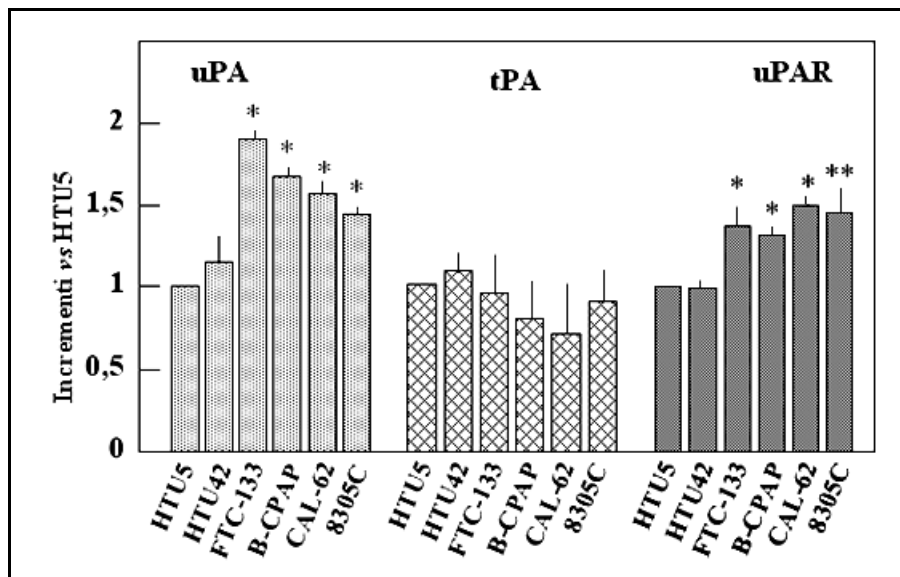
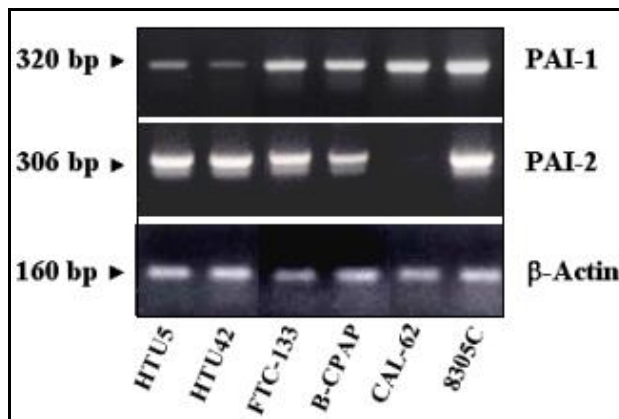


Figura 3 – A-B): Analisi quantitativa tramite real-time PCR dei livelli di mRNA del tPA, dell'uPA e dell'uPAR (*= $p < 0,01$, **= $p < 0,05$).

In secondo luogo è stata valutata l'espressione dei due inibitori specifici dei PAS, PAI-1 e PAI-2. L'mRNA del PAI-1 è presente sia nei tireociti umani normali che in tutte le linee tumorali, invece l'mRNA del PAI-2 è presente nelle linee cellulari normali e in quelle tumorali ad eccezione della linea derivante da carcinoma anaplastico CAL-62 (figura 4A).

L'analisi quantitativa tramite real-time PCR ha dimostrato che il livello di espressione dell'mRNA del PAI-1, nelle cellule HTU42 è simile a quello della linea cellulare normale (HTU5). Invece, nelle linee tumorali maligne il PAI-1 appare fortemente overespresso. Viceversa l'espressione del PAI-2 risulta ridotta del 40% ($p < 0.05$) nella linea derivante da carcinoma papillare (B-CPAP), e assente nella anaplastica CAL-62, mentre nelle altre linee rimane pressochè invariata. (figura 4B).

A)



B)

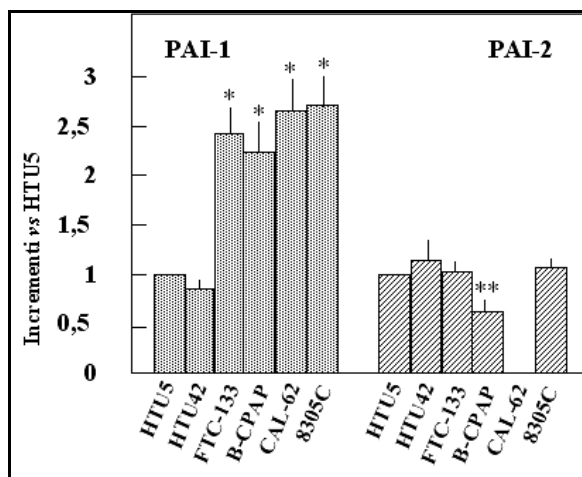


Figura 4 – A-B): Analisi quantitativa tramite real-time PCR dei livelli di mRNA del PAI-1 e del PAI-2 nelle diverse linee cellulari (*= $p < 0,01$, **= $p < 0,05$).

L'espressione dei componenti del PAS è stata successivamente analizzata in 13 pezzi chirurgici di PTC e in tessuti tiroidei normali prelevati dal parenchima tiroideo sano degli stessi pazienti.

Come si può notare dalla *figura 5*, nel caso dell'uPA l'espressione è in taluni casi assente nei tessuti normali e compare nella controparte tumorale dello stesso paziente, mentre per quanto riguarda l'uPAR e il PAI-1 notiamo una bassa o assente espressione nei tessuti normali che aumenta nei tessuti tumorali. Infine per il PAI-2 si nota una debole espressione in alcuni campioni di tessuto sano e in alcuni campioni tumorali, ma nel complesso il livello di espressione non risulta significativamente variato.

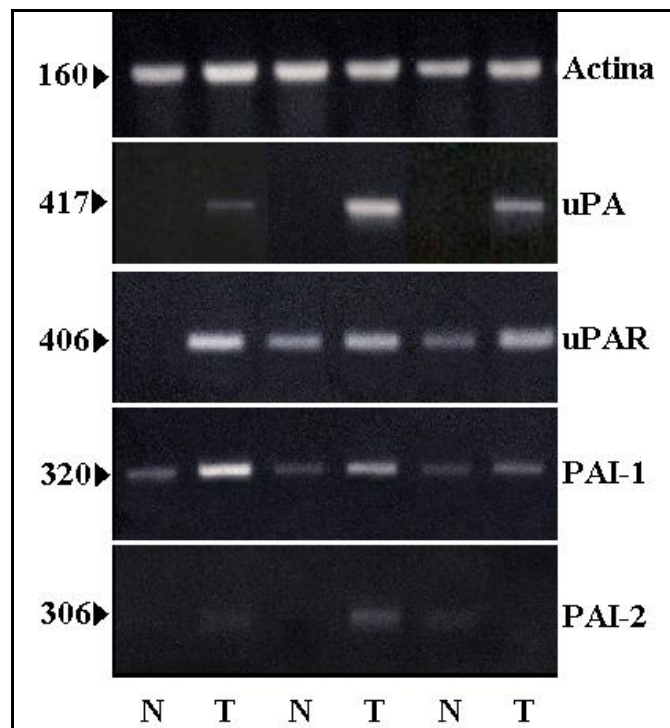


Figura 5: Analisi dell'espressione del PAS mediante RT-PCR semiquantitativa in tre campioni di tessuto tiroideo normale (N) e tre derivanti da carcinoma papillare (T)

Gli esperimenti di real time PCR riportati in *figura 6* hanno mostrato un sostanziale incremento ($p < 0.01$) dell'mRNA di uPA, uPAR e PAI-1 di 4.42 ± 0.95 , 4.36 ± 1.73 e 3.55 ± 0.79 volte rispettivamente nei tessuti tumorali rispetto a quelli normali. Mentre l'mRNA del PAI-2 non è significativamente alterato.

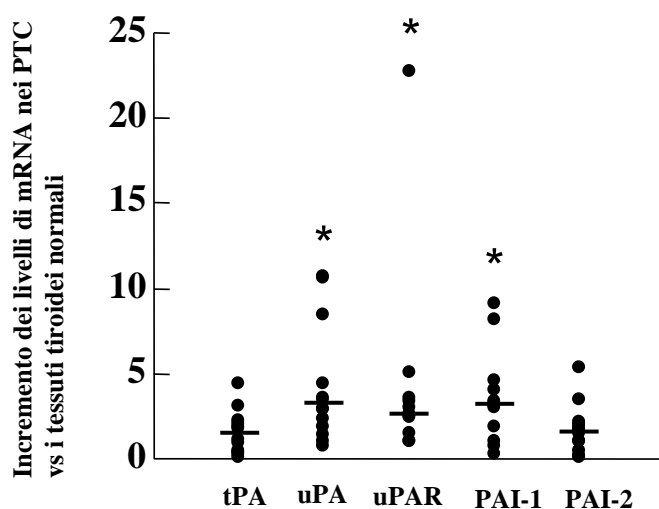


Figura 6: Espressione dei PAs nel tessuto tiroideo normale vs tessuto tiroideo tumorale.

L'incremento dell'espressione dell'uPA e dell'uPAR è stato confermato a livello proteico grazie ad esperimenti di Western Blot eseguiti su 3 campioni di PTC a confronto con tessuti normali prelevati dal parenchima tiroideo sano degli stessi pazienti (*figura 7*).

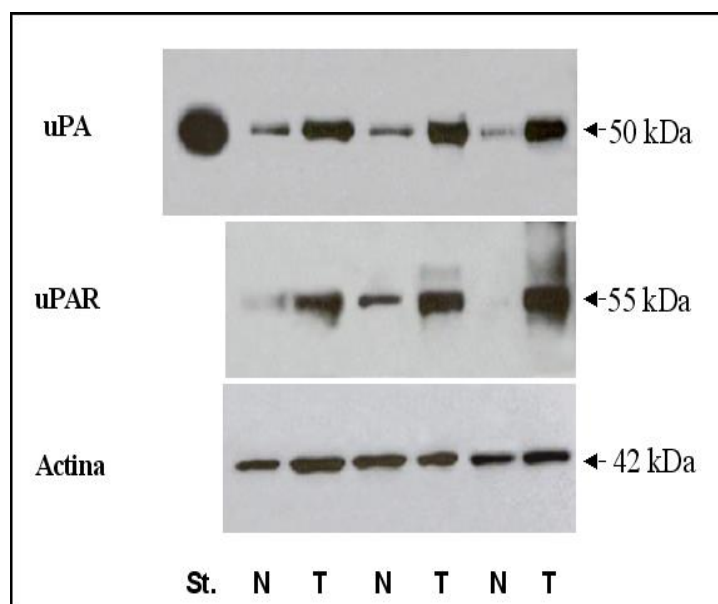


Figura 7: Western blot degli estratti proteici di tre carcinomi papillari (T) in confronto con i tessuti normali (N) prelevati dagli stessi pazienti.

L'analisi densitometrica ha mostrato un incremento significativo dei livelli di uPA e uPAR negli estratti proteici dei campioni tumorali; in particolare, l'incremento medio dell'uPA nei campioni tumorali rispetto ai tessuti normali è di $3,07 \pm 0,73$, mentre l'incremento medio dell'uPAR nei campioni tumorali rispetto ai tessuti normali è di $4,62 \pm 1,5$ (figura 8).

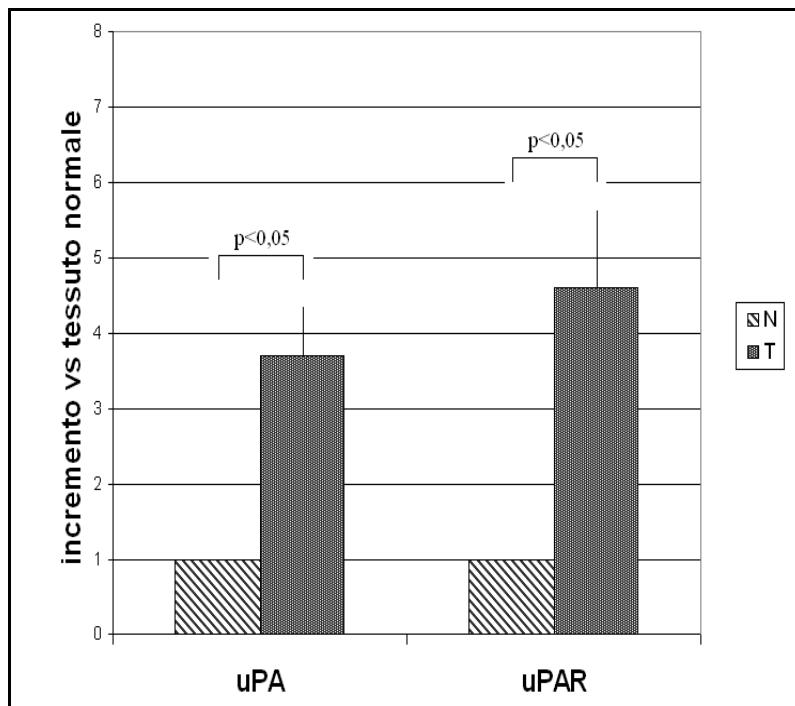


Figura 8: Analisi densitometrica dei livelli di proteina uPA e uPAR relativi ai western blot nei campioni derivanti da PTC

Le variazioni dei livelli di espressione dell' uPA, del tPA, dell'uPAR, del PAI-1 e del PAI-2, sono state confrontate con i parametri clinici disponibili, quali le dimensioni del tumore primario, l'età del paziente e lo stadio tumorale. Come ci mostra la *figura 9* una correlazione statisticamente significativa è emersa ($p < 0,01$) ($r = 0,709$) tra i livelli dell' mRNA di uPA e il diametro del tumore, ovvero all'aumentare delle dimensioni del PTC aumenta anche l'espressione dell'uPA. Al contrario per quanto riguarda l'espressione dell'mRNA dell'uPAR o del PAI-1, non è stata dimostrata nessuna correlazione significativa tra i livelli del gene e le dimensioni dei carcinomi.

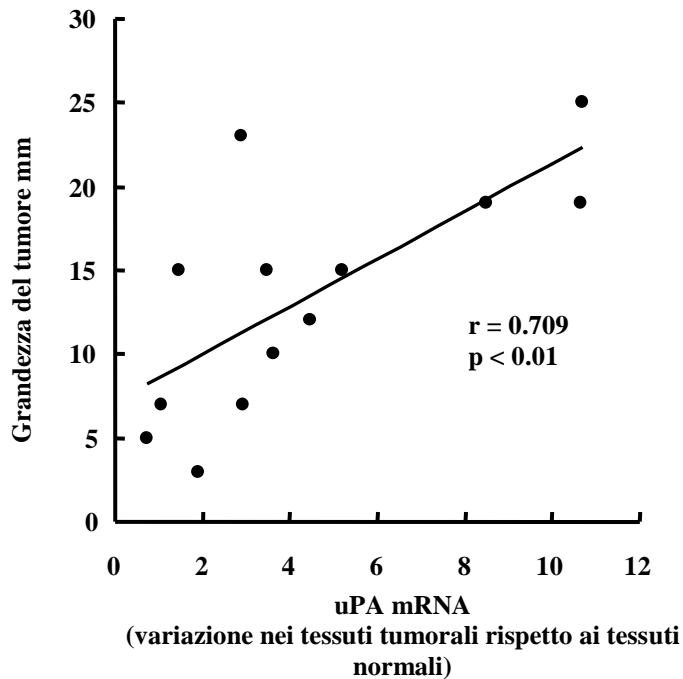


Figura 9: Correlazione tra espressione di UPA mRNA e dimensione del tumore ($p < 0.01$).

Infine analizzando l'aumento dell'espressione dei componenti del PAS nei pazienti colpiti da carcinoma papillare che hanno metastasi linfonodali (N1 $n=4$) e in quelli che ne sono privi (N0 $n=8$), è stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa ($p < 0.05$) tra i livelli di uPA e uPAR e la presenza di linfonodi metastatici (*figura 10*).

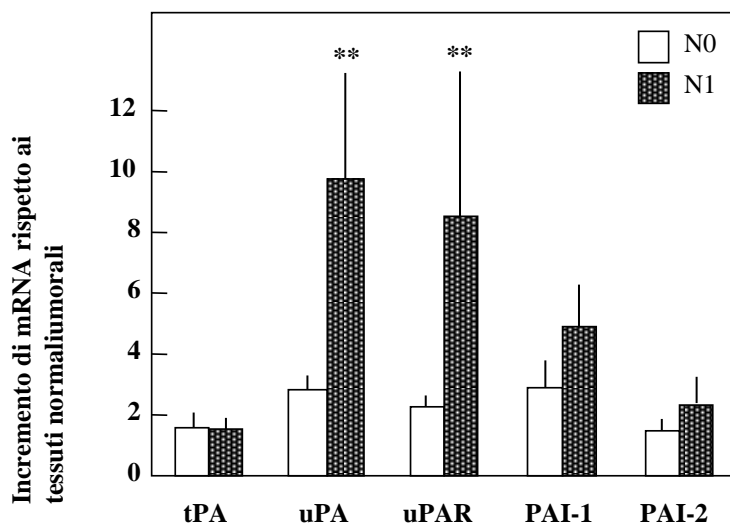


Figura 10: Correlazione tra l'espressione dell'mRNA dei PAS tra i PTC con metastasi linfonodali (N1) vs PTC senza metastasi linfonodali (N0).

Nell'ultima fase dello studio è stata valutata l'espressione dei componenti dell'uPAS e la loro correlazione con i parametri clinici, in 99 pezzi chirurgici di PTC e in tessuti tiroidei normali prelevati dal parenchima tiroideo sano degli stessi pazienti. I risultati mostrano un significativo incremento di mRNAs di uPA, uPAR e PAI-1 rispettivamente, di 9.63 ± 1.29 (mediana 4.46), 4.82 ± 0.45 (mediana 3.47) e 5.64 ± 0.71 (mediana 3.56), volte nei 99 tessuti con PTC rispetto ai tessuti normali corrispondenti. L'mRNAs di uPA, uPAR e PAI-1 aumenta correlandoli significativamente l'uno con ciascun altro, con un coefficiente di correlazione di 0.760 ($P < 0.0001$) per uPA vs uPAR, 0.343 ($P = 0.0005$) per uPA vs PAI-1, e 0.445 ($P < 0.0001$) per uPAR vs PAI-1. Non sono state trovate correlazioni tra l'espressione di uPA, uPAR e PAI-1 ed età del paziente, grandezza del tumore o varianti di PTC (dati non mostrati). I livelli di mRNA di uPA ($P = 0.0035$) e di uPAR ($P = 0.0015$) sono significativamente più alti nei tumori allo stadio pT3 rispetto a quelli allo stadio pT1 (*figura 11 A/D*). Valori significativamente più alti di mRNA di uPA ($P = 0.013$) e di uPAR ($P = 0.049$) sono stati riscontrati nei tumori metastatici (N1) rispetto a quelli non metastatici (N0) (*figura 11 B/E*) e di uPA ($P = 0.0209$) nei pazienti allo stadio III rispetto ai pazienti allo stadio I (*figura 11 C/F*). Riguardo al PAI-1 non sono stati trovati cambiamenti tra i differenti stati pT-N e gli stadii TNM (dati non mostrati). I risultati dimostrano inoltre che livelli più alti di mRNA di uPA e di uPAR sono associati significativamente a più breve intervallo libero da malattia (DFI) (*figura 12 A/B*) e poiché 50 su 76 pazienti si trovava allo stadio I, mediante l'analisi Kaplan-Meier è stata trovata un'associazione statisticamente significativa in questo gruppo tra iperespressione di mRNA di uPA o di uPAR e DFI (*figura 12 D/E*). Inoltre l'iperespressione combinata di mRNA di uPA e di uPAR è associata ad una riduzione del DFI sia in tutti i pazienti sia in quelli solo allo stadio I (*figura 12 C/F*). Non sono state trovate associazioni tra i livelli di mRNA del PAI-1 e DFI (dati non mostrati).

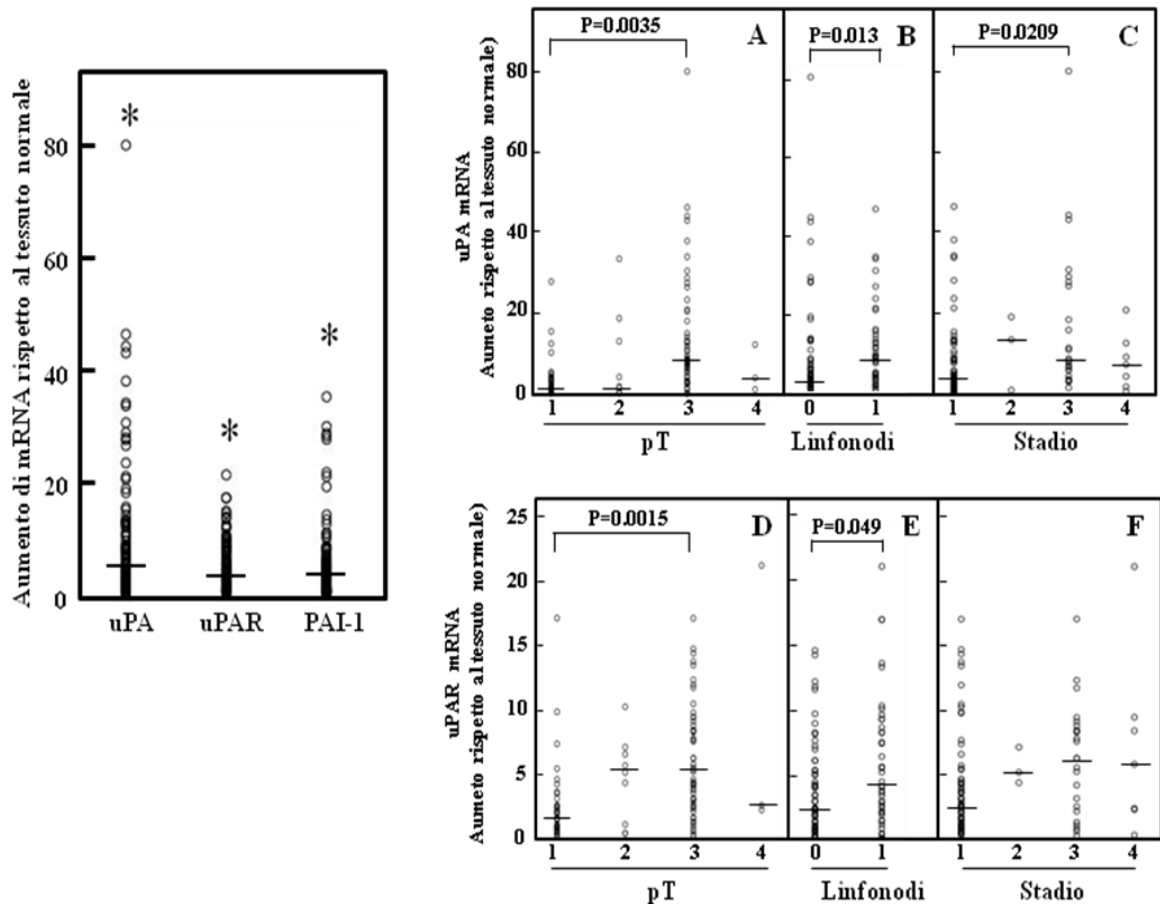


Figura 11: Espressione dell'mRNA di uPA e di uPAR nei differenti pT (A e D) e stato N (B e E) e stadi TNM (C e F) nei tessuti tiroidei sani e con PTC di 99 pazienti tiroidectomizzati.

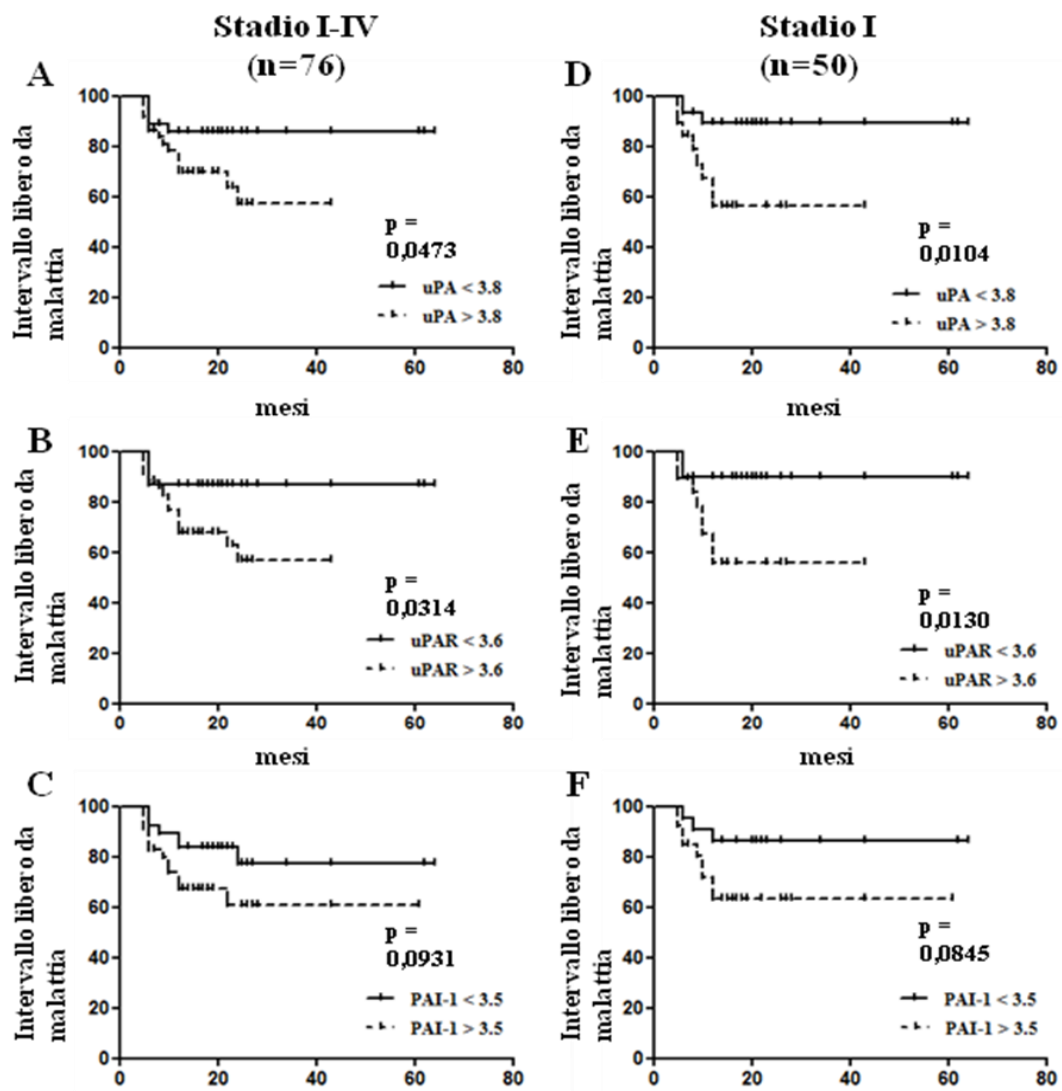


Figura 12: Espressione dei componenti dell'uPA e DFI nei pazienti con PTC.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Negli ultimi anni il sistema di attivazione del plasminogeno (PAS) è stato oggetto di numerose ricerche nell'ambito delle patologie tumorali, ma nonostante il ruolo conosciuto dei componenti dell'uPAS nella progressione tumorale, poche sono le informazioni disponibili sul suo ruolo nella crescita del carcinoma tiroideo e sul suo valore prognostico (97,98,176,181,182). La prima evidenza del coinvolgimento dell'uPA nel meccanismo di invasione dei tumori umani della tiroide è stata proposta da Packman *et al.* (97), che trovò un incremento dell'attività dell'uPA e delle gelatinasi in una linea cellulare di carcinoma follicolare della tiroide derivante da una metastatizzazione del polmone (FTC-238) rispetto alla stessa linea cellulare derivante da metastasi al linfonodo (FTC-133). Successivamente, uno studio di immunistochemica (IHC) ha evidenziato l'espressione dell'uPA, dell'uPAR e di PAI-1 nei maggiori carcinomi della tiroide (98). Tuttavia questi autori non osservarono alcuna correlazione tra le osservazioni con studi di immunistochemica e i parametri clinicopatologici.

Successivamente un altro studio di immunistochemica ha riportato che alti livelli di espressione dell'uPAR sono associati allo sviluppo del carcinoma papillare della tiroide (PTC), indicando che questa proteina potrebbe essere un possibile fattore prognostico (168). Alcuni Autori hanno valutato i livelli degli attivatori del plasminogeno e di PAI-1 nella frazione citosolica di cellule derivanti da tessuti di tumori della tiroide benigni e maligni tramite il saggio enzimatico ELISA, dimostrando che i campioni presi da pazienti con cancro alla tiroide avevano bassi livelli di tPA e alti livelli di uPA e di PAI-1, mentre i pazienti con tumori benigni mostravano alte concentrazioni di tPA e relativamente basse concentrazioni di uPA e di PAI-1 (168). Un ulteriore studio ha invece valutato la presenza dell'uPAR nella membrana plasmatica di cellule tiroide umane normali e neoplastiche (169).

E' noto che i tireociti normali esprimono sulla superficie cellulare sia la forma integrale di uPAR sia quella mancante del dominio di legame per l'uPA. Nelle diverse linee cellulari tumorali tiroidee, la forma troncata è espressa a livelli elevati nelle cellule derivanti da carcinoma papillifero, a bassissimi livelli in quelle derivate da carcinoma follicolare e non è rilevabile in cellule di carcinoma anaplastico. Poichè il legame dell'uPA all'uPAR

richiede la forma integra del recettore, si può supporre che il taglio dell'uPAR nei tireociti normali rappresenti un meccanismo per limitare il potenziale d'invasione delle cellule, che invece è presente nel carcinoma papillifero, ma che risulta perso parzialmente o completamente nei tumori follicolari più aggressivi e negli anaplastici.

Pertanto il presente studio è stato rivolto alla caratterizzazione dell'espressione dei membri del PAS nel corso della progressione neoplastica, *in vitro*, ovvero in tireociti normali e linee cellulari derivanti da diversi istotipi di tumore tiroideo, e *in vivo*, in tessuti tiroidei normali e in differenti tipi istologici dei tumori tiroidei, incluso l'adenoma follicolare e ad indagare il ruolo prognostico dell'uPAS in un ampio gruppo di pazienti affetti da PTC. I risultati ottenuti mostrano che la trasformazione maligna del tireocita, sia *in vitro* che *in vivo*, si associa ad un'aumentata espressione di uPA, uPAR e PAI-1. Al contrario, l'espressione del PAI-2 e del tPA appare lievemente aumentata o invariata nei tessuti tumorali e in alcuni casi diminuita nelle diverse linee cellulari. Gli esperimenti qui riportati dimostrano l'espressione dell'mRNA dell'uPA e, in minor misura, del tPA nella linea cellulare di tireociti umani normali; tuttavia, non è stata riscontrata attività proteolitica del tPA nel supernatante, mentre quella dell'uPA era chiaramente visibile. L'mRNA del tPA è stato inoltre rilevato nelle linee tumorali, senza apprezzabili variazioni rispetto ai tireociti normali, mentre l'attività enzimatica era ugualmente assente in tutti i supernatanti, o quantomeno inferiore alla soglia di sensibilità del metodo zimografico. A differenza del tPA, gli zimogrammi ottenuti hanno mostrato una maggiore attività uPasica in tutte le linee di carcinoma esaminate e in minor misura nella linea cellulare di adenoma follicolare (HTU42). In linea con i risultati ottenuti *in vitro*, anche nei PTC analizzati l'uPA risulta significativamente aumentato, mentre i livelli di tPA appaiono invariati o, in alcuni campioni, lievemente aumentati rispetto ai tessuti tiroidei normali. Tale dato suggerisce che *in vivo* il tPA, a differenza dell'uPA, non assume un ruolo cruciale nella trasformazione cancerosa dei tireociti e che gli incrementi della secrezione enzimatica dell'uPA osservati nelle linee cellulari maligne rispetto ai tireociti normali o benigni siano dovuti, perlomeno in parte, all'intervento di meccanismi di attivazione genica.

I risultati ottenuti in questo lavoro hanno mostrato un aumento dell'espressione dell'mRNA dell'uPAR in tutte le linee cellulari cancerose, ma non nelle cellule derivanti da adenoma, rispetto ai tireociti normali. Come l'uPA, anche l'uPAR risulta iperespresso a livello sia trascrizionale che traduzionale in tutti i campioni di carcinoma papillare, in

particolare in quelli con metastasi linfonodali. Ciò avvalorava un precedente studio di immunohistochimica in cui è stato suggerito che l'analisi dell'espressione dell'uPAR potrebbe essere utile per la diagnosi differenziale tra adenoma follicolare e carcinoma, e che l'uPAR può assumere un valore prognostico per il PTC (168). A tal proposito è interessante rilevare che il livello di espressione dell'uPAR-mRNA è più alto nel PTC metastatico rispetto a quello non metastatico. Pertanto l'uPAR, inizialmente ritenuto un semplice attivatore dell'uPA, è oggi considerato un importante trasduttore di segnali intracellulari in grado di generare una serie di risposte cellulari, comprendenti la mobilità, il differenziamento e la proliferazione (170,171). Inoltre, la iperespressione del sistema uPA/uPAR può svolgere un ruolo chiave nell'attivazione di fattori di crescita latenti in grado di stimolare la proliferazione del tireocita, come ad esempio la proteolisi dell'HGF (hepatocyte growth factor), che determina la sua dimerizzazione e il legame con il recettore ad alta affinità Met (172).

Per quanto riguarda la presenza *in vivo* dei due inibitori del PAS, i dati indicano che l'mRNA del PAI-1 e la sua proteina sono significativamente aumentati nei PTC metastatici e non metastatici, e che non c'è una significativa correlazione tra l'incremento dell'mRNA di PAI-1 e la grandezza del tumore, mentre i livelli di PAI-2 nei tumori sono simili a quelli dei tessuti tiroidei normali. Difatti, l'mRNA del PAI-2 appare invariato nelle 8305C e FTC-133, ridotto nelle B-CPAP e assente nelle CAL-62.

Nel complesso, tutte queste osservazioni indicano che la trasformazione maligna del tireocita si associa ad un incremento di espressione dell'mRNA e delle proteine di uPA, uPAR e PAI-1 e che l'iperespressione di uPA e di uPAR è maggiore nelle forme di PTC con metastasi linfonodali rispetto a quelle non metastatiche. Il ruolo dei due PAIs nella progressione tumorale rimane ancora controverso. Il PAI-1 è considerato l'inibitore primario di uPA, e la sua interazione con il complesso uPA/uPAR ne causa una rapida internalizzazione. Un incremento dell'espressione di PAIs nei tessuti tumorali dovrebbe quindi correlare con una minore probabilità di metastatizzazione e una prognosi favorevole. Al contrario alti livelli di PAI-1 sono associati a patologie più aggressive e a prognosi peggiore in diversi tipi di neoplasie (173,174,175).

Una possibile spiegazione di queste incongruenze potrebbe derivare dalla capacità dei PAIs di svolgere una serie di azioni biologiche indipendentemente dalla loro attività inibitoria sui PAs, tra cui effetti di neoangiogenesi, modulazione dell'adesività cellulare, migrazione

e inibizione dell'apoptosi (174).

La rilevanza dell'azione del PAS nella progressione dei tumori della tiroide deve essere valutata anche alla luce del fatto che la plasmina è in grado di attivare proteoliticamente diversi membri della famiglia delle metalloproteinasi di matrice (MMPs)(176,21). Questi ultimi costituiscono una classe di enzimi proteolitici che degradano diverse componenti della matrice extracellulare (ECM) e delle membrane basali (BM) e rivestono un ruolo importante in tutte le fasi della progressione cancerosa, quali l'espansione *in loco* della massa tumorale, la neoangiogenesi, la diffusione metastatica. Nei tumori della tiroide è stato documentato un aumento sia del numero delle diverse MMPs espresse sia dei livelli di espressione dei singoli enzimi, come anche dei loro inibitori tissutali specifici (TIMPs) (177). Pertanto, si può ipotizzare che gli effetti degli attivatori del plasminogeno e delle MMPs siano correlati secondo un feedback positivo di attivazione, che determinerebbe un sostanziale incremento della degradazione delle ECM e BM a vantaggio del tumore. Inoltre, è interessante menzionare un precedente lavoro in cui è stato dimostrato che la capacità di degradazione della ECM da parte della linea FTC-133 risulta fortemente ridotta in seguito all'inibizione sia dell'uPA che delle MMPs (178). In questo contesto, l'iperespressione dei TIMPs e del PAI-1 osservata nei tumori della tiroide potrebbe dipendere essenzialmente dalla necessità di limitare un'eccessiva degradazione della ECM e la conseguente perdita di supporto strutturale per la migrazione delle cellule tumorali e la formazione di nuovi vasi sanguigni. Quindi, nel complesso, questo profilo suggerisce che le cellule tumorali tiroidee, grazie alla simultanea produzione di diversi tipi di enzimi litici multifunzionali e dei relativi inibitori, possano compiere una degradazione controllata delle barriere tissutali pienamente funzionale alla progressione neoplastica.

Il nostro studio in accordo con gli altri presenti in letteratura (182) ha evidenziato che l'espressione dei geni dell'uPA, uPAR e PAI 1 è significativamente più alta nei tessuti con carcinoma rispetto ai tessuti normali e che nel loro incremento si correlano tra loro significativamente suggerendo un comune meccanismo molecolare che iper-regola la loro espressione. Inoltre i risultati evidenziano come gli aumentati livelli di mRNA dell'uPA sono associati a stadi avanzati di TNM e che gli aumentati livelli sia di uPA che di uPAR sono associati ad avanzato pT e N stato e più breve DFI. Tuttavia questa associazione è statisticamente più significativa nei pazienti allo stadio I. Questi dati possono essere utili per una più accurata prognosi, per prendere decisioni terapeutiche più appropriate e per

sviluppare programmi di prevenzione personalizzati soprattutto nei pazienti con PTC allo stadio I considerati a basso rischio di recidive (183,184,185,186,187,188). Inoltre può essere utile considerare come i campioni di cDNA possano essere utilizzati allo stesso tempo per analizzare l'espressione dei componenti dell'uPAS e indagare la presenza di mutazioni V600E BRAF considerate un possibile marker molecolare prognostico nei PTC (185,186,189,190). Quindi l'analisi dell'espressione di entrambi può portare ad una maggiore accuratezza nella prognosi dei pazienti con PTC.

In conclusione, è possibile un loro uso come markers molecolari in clinica, anche in pazienti allo stadio I del TMN.

BIBLIOGRAFIA

1. Castellino, F.J.; Ploplis, V.A. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb. Haemost.* 2005; 93, 647-654.
2. Meroni, G.; Buraggi, G.; Mantovani, R.; Taramelli, R. Motifs Resembling Hepatocyte Nuclear Factor 1 and Activator Protein 3 Mediate the Tissue Specificity of the Human Plasminogen Gene. *Eur. J. Biochem.* 1996; 236, 373-382.
3. Jenkins, G.R.; Seiffert, D.; Parmer, R.J.; Miles, L.A. Regulation of Plasminogen Gene Expression by Interleukin-6. *Blood* 1997; 89, 2394-2403.
4. Bannach, F.G.; Gutierrez-Fernandez, A.; Parmer, R.J.; Miles, L.A. Interleukin-6-induced Plasminogen Gene Expression in Murine Hepatocytes is Mediated by Transcription Factor CCAAT/Enhancer Binding Protein beta (C/EBPbeta). *J. Thromb. Haemost.* 2004; 2, 2205-2212.
5. Gutiérrez-Fernández, A.; Parmer, R.J.; Miles, L.A. Plasminogen Gene Expression is Regulated by Nerve Growth Factor. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5, 1715-1725.
6. Pirie-Shepherd, S.R. Role of Carbohydrate on Angiostatin in the Treatment of Cancer. *J. Lab. Clin. Med.* 1999; 134, 553-560.
7. Miles, L.A.; Dahlberg, C.M.; Plescia, J.; Felez, J.; Kato, K.; Plow, E.F. Role of Cell-surface Lysines in Plasminogen Binding to Cells: Identification of α -enolase as a Candidate Plasminogen Receptor. *Biochemistry* 1991; 30, 1682-1691.
8. Andreasen, P.A.; Kjølner, L.; Christensen, L.; Duffy, M.J. The Urokinase-type Plasminogen Activator System in Cancer Metastasis: A Review. *Int. J. Cancer* 1997; 72, 1-22.
9. Schmitt, M.; Goretzki, L.; Jänicke, F.; Calvete, J.; Eulitz, M.; Kobayashi, H.; Chucholowski, N.; Graeff, H. Biological and Clinical Relevance of the Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) in Breast Cancer. *Biomed. Biochim. Acta* 1991;

50, 731-741.

10. Blasi, F.; Carmeliet, P. uPAR: a Versatile Signalling Orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002; 3, 932-943.
11. Plesner, T.; Behrendt, N.; Ploug, M. Structure, Function and Expression on Blood and Bone Marrow Cells of the Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor, uPAR. *Stem Cells* 1997; 15, 398-408.
12. Hiendlmeyer, E.; Regus, S.; Wassermann, S.; Hlubek, F.; Haynl, A.; Dimmler, A.; Koch, C.; Knoll, C.; Van Beest, M.; Reuning, U.; Brabletz, T.; Kirchner, T.; Jung, A. Beta-catenin Up-regulates the Expression of the Urokinase Plasminogen Activator in Human Colorectal Tumors. *Cancer Res.* 2004; 64, 1209-1214.
13. Wang, W.; Abbruzzese, J.L.; Evans, D.B.; Chiao, P.J. Overexpression of Urokinase-type Plasminogen Activator in Pancreatic Adenocarcinoma is Regulated by Constitutively Activated Rel A. *Oncogene* 1999; 18, 4554-4563.
14. Yoo, C.B.; Jones, P.A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006; 5, 37-50.
15. Pulukuri, S.M.; Gorantla, B.; Rao, J.S. Inhibition of Histone Deacetylase Activity Promotes Invasion of Human Cancer Cells Through the Activation of Urokinase Plasminogen Activator (uPA). *Biol. Chem.* 2007; 282, 35594-35603.
16. Warejcka, D.J.; Twining, S.S. Specific Conformational Changes of Plasminogen Induced by Chloride Ions, 6-Aminohexanoic Acid and Benzamidine, but not the Overall Openness of Plasminogen Regulate, Production of Biologically Active Angiostatins. *Biochem. J.* 2005; 392, 703-712.
17. Cao, R.; Wu, H.L.; Veitonmaki, N.; Linden, P.; Farnebo, J.; Shi, G-Y. Suppression of Angiogenesis and Tumor Growth by the Inhibitor K1-5 Generated by Plasmin Mediated Proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96, 5728-5733.

18. Sigalotti, L.; Fratta, E.; Coral, S.; Cortini, E.; Covre, A.; Nicolay, H.J.; Anzalone, L.; Pezzani, L.; Di Giacomo, A.M.; Fonsatti, E.; Colizzi, F.; Altomonte, M.; Calabrò, L.; Maio, M. Epigenetic Drugs as Pleiotropic Agents in Cancer Treatment: Biomolecular Aspects and Clinical Applications. *J. Cell Phys.* 2007; 212, 330-344.
19. Nanbu, R.; Menoud, P-A.; Nagamine, Y. Multiple Instability-regulating Sites in the 3' Untranslated Region of the Urokinase-type Plasminogen Activator mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 1994; 14: 4920-4928.
20. Pluskota, E.; Soloviev, D.A.; Bdeir, K.; Cines, D.B.; Plow, E.F. Integrin $\alpha_M\beta_2$ Orchestrates and Accelerates Plasminogen Activation and Fibrinolysis by Neutrophils. *J. Biol. Chem.* 2004; 279, 18063-18072.
21. Pakneshan, P.; Szyf, M.; Rabbani, S.A. Hypomethylation of Urokinase (uPA) Promoter in Breast and Prostate Cancer: Prognostic and Therapeutic Implications. *Curr. Cancer Drug Targets* 2005; 5, 471-488.
22. Duffy, M.J. The Urokinase Plasminogen Activator System: Role in Malignancy. *Curr. Pharm. Design* 2004; 10, 39-49.
23. Choong, P.F.; Nadesapillai, A.P.. Urokinase Plasminogen Activator System: A Multifunctional Role in Tumor Progression and Metastasis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2003; 415S, S46-S58.
24. Pepper, M.S. Role of Matrix Metalloproteinases and Plasminogen Activator-Plasmin System in Angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21, 1104-1117.
25. Lijnen, H.R. Pleiotropic Functions of the Plasminogen Activator Inhibitor-1. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3, 35-45.
26. Sidenius, N.; Blasi, F. The Urokinase Plasminogen Activator System in Cancer: Recent Advances and Implication for Prognosis and Therapy. *Cancer Metast. Rev.*

2003; 22, 205-222.

27. Danø, K.; Behrendt, N.; Høyer-Hansen, G.; Johnsen, M.; Lund, L.R.; Ploug, M.; Rømer, J. Plasminogen Activation and Cancer. *Thromb. Haemost.* 2005; 93, 676-681.
28. Stephens, R.W.; Pöllänen, J.; Tapiovaara, H.; Leung, K.C.; Sim, P.S.; Salonen, E.M.; Rønne, E.; Behrendt, N.; Danø, K.; Vaheri, A. Activation of Pro-urokinase and Plasminogen on Human Sarcoma Cells: a Proteolytic System with Surface-bound reactants. *J. Cell Biol.* 1989; 108, 1987-1995.
29. Kumar, S.; Baglioni, C. Protection from Tumor Necrosis Factor-mediated Cytolysis by Overexpression of Plasminogen Activator Inhibitor Type-2. *J. Biol. Chem.* 1991; 266, 20960-20964.
30. Estricher, A.; Mühlhauser, J.; Carpentier, J.L.; Orci, L.; Vassalli, J.D. The Receptor for Urokinase Type Plasminogen Activator Polarizes the Expression of the Protease to the Leading Edge of Migrating monocytes and Promotes Degradation of Enzyme Inhibitor Complexes. *J. Cell Biol.* 1990; 111, 783-792.
31. Ossowski, L.; Aguirre-Ghiso, J.A. Urokinase Receptor and Integrin Partnership: Coordination of Signaling for Cell Adhesion, Migration and Growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000; 12, 613-620.
32. Aguirre-Ghiso, J.A.; Kovalski, K.; Ossowski, L. Tumor Dormancy Induced by Downregulation of Urokinase Receptor in Human Carcinoma Involves Integrin and MAPK signaling. *J. Cell Biol.* 1999; 147, 89-104.
33. Rodenburg, K.W.; Kjoller, L.; Petersen, H.H.; Andreasen, P.A. Binding of Urokinase-type Plasminogen Activator-Plasminogen Activator Inhibitor-1 Complex to the Endocytosis Receptors Alpha2-macroglobulin Receptor/Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein and Very-low-density Lipoprotein Receptor Involves Basic Residues in the Inhibitor. *Biochem. J.* 1998; 329, 55-63.
34. Stefansson, S.; Muhammad, S.; Cheng, X.F.; Battey, F.D.; Strickland, D.K.;

- Lawrence, D.A. Plasminogen activator inhibitor-1 contains a cryptic high affinity binding site for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 1998; 273, 6358-6366.
35. Croucher, D.R.; Saunders D.N.; Stillfried G.E.; Ranson M. A Structural Basis for Differential Cell Signalling by PAI-1 and PAI-2 in Breast Cancer Cells. *Biochem. J.* 2007; 408, 203-210.
36. Béné, M.C.; Castoldi, G.; Knapp, W.; Rigolin, G.M.; Escribano, L.; Lemez, P.; Ludwig, W.-D.; Matutes, E.; Orfao, A.; Lanza, F.; van't Veer, M. CD87 (Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor), Function and Pathology in Hematological Disorders: a Review. *Leukemia* 2004; 18, 394-400.
37. Simon, D.I.; Wei, Y.; Zhang, L.; Rao, N.K.; Xu, H.; Chen, Z.; Liu, Q.; Rosenberg, S.; Chapman, H.A. Identification of a Urokinase Receptor-integrin Interaction Site. Promiscuous Regulator of Integrin Function. *J. Biol. Chem.* 2000; 275, 10228-10234.
38. Stefansson, S.; Lawrence, D.A. The Serpin PAI-1 Inhibits Cell Migration by Blocking Integrin Alpha V Beta 3 Binding to Vitronectin. *Nature* 1996; 383, 441-443.
39. Kjølner, L.; Kanse, S.M.; Kirkegaard, T.; Rodenburg, K.W.; Rønne, E.; Goodman, S.L.; Preissner, K.T.; Ossowski, L.; Andreasen, P.A. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Repress Integrin- and Vitronectin-mediated Cell Migration Independently of its Function as an Inhibitor of Plasminogen Activation. *Exp. Cell Res.* 1997; 232, 420-429.
40. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100, 57-70.
41. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Angiogenesis in Cancer and Other Diseases. *Nature* 2000; 407, 249-257.
42. Goldman, E. The Growth of Malignant Disease in Man and the Lower Animals with Special Reference to the Vascular System. *Lancet* 1997; 2, 1236-1240.

43. Folkman, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N. Engl. J. Med.* 1971; 285, 1182-1186.
44. Binder, B.R.; Mihaly, J.; Prager, G.W. uPAR–uPA–PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. *Thromb. Haemost.* 2007; 97, 336-342.
45. Stefansson, S.; Petitclerc, E.; Wong, M.K.K.; McMahon, G.A.; Brooks, P.C.; Lawrence, D.A. Inhibition of Angiogenesis in vivo by Plasminogen Activator Inhibitor-1. *J. Biol. Chem.* 2001; 276, 8135-8141.
46. McMahon, G.A.; Petitclerc, E.; Stefansson, S.; Smith, E.; Wong, M.K.K. Plasminogen Activator Inhibitor Regulates Tumor Growth and Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 2001; 276, 33964-33968.
47. Stefansson, S.; McMahon, G.A.; Petitclerc, E.; Lawrence, D.A. Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Tumor Growth, Angiogenesis and Vascular Remodeling. *Curr. Pharm. Des.* 2003; 9, 1545-1564.
48. Cornelius, L.A.; Nehring, L.C.; Harding, E.; Bolanowski, M.; Welgus, H.C.; Kobayashi, D.K.; Pierce, R.A.; Shapiro, S.D. Matrix Metalloproteinases Generates Angiostatin: Effects on Neovascularization. *J. Immunol.* 1998; 161, 6845-6852.
49. Chen, Y.-H.; Wu, H.-L.; Li, C.; Huang, Y.-H.; Chiang, C.-W.; Wu, M.-P.; Wu, L.-W. Anti-angiogenesis Mediated by Angiostatin KI-3, KI-4 and KI-4.5: Involvement of p53, FasL, AKT and mRNA Deregulation. *Thromb. Haemost.* 2006; 95, 668-677.
50. Tabruyn, S.P.; Griffioen, A.W. Molecular Pathways of Angiogenesis Inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2007; 355, 1-5.
51. Rigolin, G.M.; Tieghi, A.; Ciccone, M.; Bragotti, L.Z.; Cavazzini, F.; Della Porta, M.; Castagnari, B.; Carroccia, R.; Guerra, G.; Cuneo, A.; Castoldi, G. Soluble Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor (suPAR) as an Independent Factor Predicting Worse Prognosis and Extra-bone Marrow

Involvement in Multiple Myeloma Patients. *Br. J. Haematol.* 2003; 120, 953-959.

52. Shariat, S.F.; Roehrborn, C.G.; McConnell, J.D.; Park, S.; Alam, N.; Wheeler, T.M.; Slawin, K.M. Association of the Circulating Levels of the Urokinase System of Plasminogen Activation with the Presence of Prostate Cancer and Invasion, Progression, and Metastasis. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25, 349-355.
53. Czekay, R.P.; Loskutoff, D.J. Unexpected Role of Plasminogen Activator Inhibitor 1 in Cell Adhesion and Detachment. *Exp. Biol. Med.* 2004; 229, 1090-1096.
54. Osmak, M.; Babić, D.; Abramić, M.; Milicić, D.; Vrhovec, I.; Skrk, J. Plasminogen Activator Inhibitor Type 2: Potential Prognostic Factor for Endometrial Carcinomas. *Neoplasma.* 2001; 48, 462-467.
55. Guo, Y.; Pakneshan, P.; Gladu, J.; Slack, A.; Szyf, M.; Rabbani, S.A. Regulation of DNA Methylation in Human Breast Cancer. Effect on the Urokinase-type Plasminogen Activator gene production and tumor invasion. *J. Biol. Chem.* 2002; 277, 41571-41579.
56. Memarzadeh, S.; Kozak, K.R.; Chang, L.; Natarajan, S.; Shintaku, P.; Reddy, S.T.; Farias-Eisner, R. Urokinase Plasminogen Activator Receptor: Prognostic Biomarker for Endometrial Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99, 10647-10652.
57. Steiner, E.; Pollow, K.; Hasenclever, D.; Schormann, W.; Hermes, M.; Schmidt, M.; Puhl, A.; Brulport, M.; Bauer, A.; Petry, I.B.; Koelbl, H.; Hengstler, J.G. Role of Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) for Prognosis in Endometrial Cancer. *Gynecol. Oncol.* 2008; 108, 569-576.
58. Smith, R.; Xue, A.; Gill, A.; Scarlett, C.; Saxby, A.; Clarkson, A.; Hugh, T. High Expression of Plasminogen Activator Inhibitor-2 (PAI-2) is a Predictor of Improved Survival in Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. *World J. Surg.*

2007; 31, 493-502.

59. Nordengren, J.; Fredstorp, Lidebring, M.; Bendahl, P.O.; Br nner, N.; Fern , M.; H gberg, T.; Stephens, R.W.; Will n, R.; Cassl n, B. High Tumor Tissue Concentration of Plasminogen Activator Inhibitor 2 (PAI-2) is an Independent Marker for Shorter Progression-free Survival in Patients with Early Stage Endometrial Cancer. *Int. J. Cancer*. 2002; 97, 379-385.
60. Gleeson, N.C.; Gonsalves, R.; Bonnar, J. Plasminogen Activator Inhibitors in Endometrial Adenocarcinoma. *Cancer* 1993; 72, 1670-1672.
61. Kobayashi, H.; Fujishiro, S.; Terao, T. Impact of Urokinase-Type Plasminogen Activator and its Inhibitor Type 1 on Prognosis in Cervical Cancer of the Uterus. *Cancer Res*. 1994; 54, 6539-6548.
62. Daneri-Navarro, A.; Macias-Lopez, G.; Ocegueda-Villanueva, A.; Del Toro-Arreola, S.; Bravo-Cuellar, A.; Perez-Montfort, R.; Orbach-Arbouys, S. Urokinase-type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitors (PAI-1 and PAI-2) in Extracts of Invasive Cervical Carcinoma and Precursor Lesions. *Eur. J. Cancer* 1998; 34, 566-569.
63. Swiercz, R.; Wolfe, J.D.; Zaher, A.; Jankun, J. Expression of the Plasminogen Activation System in Kidney Cancer Correlates with its Aggressive Phenotype. *Clin. Cancer Res*. 1998; 4, 869-877.
64. Johannsen, M.; Lein, M.; Loening, S.A.; Schnorr, D.; Jung, K.; Staack, A. Differential Gene Expression of Urokinase-type Plasminogen Activator and its Receptor in Human Renal Cell Carcinoma. *Oncol. Rep*. 2005; 14, 777-782.
65. Ohba, K.; Miyata, Y.; Kanda, S.; Koga, S.; Hayashi, T.; Kanetake, H. Expression of Urokinase-type Plasminogen Activator, Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor and Plasminogen Activator Inhibitors in Patients with Renal Cell Carcinoma: Correlation with Tumor Associated Macrophage and Prognosis. *J. Urol*. 2005; 174, 461-465.

66. Hasui, Y.; Suzumiya, J.; Marutsuka, K.; Hashida, S.; Ishikawa, E.. Comparative Study of Plasminogen Activator in Cancers and Normal Mucosae of Human Urinary Bladder. *Cancer Res.* 1989; *49*, 1067-1070.
67. Champelovier, P.; Boucard, N.; Levacher, C.; Simon, A.; Seigneurin, D.; Praloran, V. Plasminogen- and Colony-stimulating Factor-1-associated Markers in Bladder Carcinoma: Diagnostic Value of Urokinase Plasminogen Activator Receptor and Plasminogen Activator Inhibitor Type-2 Using Immunocytochemical Analysis. *Urol. Res.* 2002; *30*, 301-309.
68. El-Kott, A.F.; Khalil, A.M.; El-Kenawy, A-M. Immunohistochemical Expression of uPA and its Receptor uPAR and their Prognostic Significant in Urinary Bladder Carcinoma. *Int. Urol. Nephrol.* 2004; *36*, 417-423.
69. Gontero, P.; Banisadr, S.; Frea, B.; Brausi, M. Metastasis Marker in Bladder Cancer: A review of the Literature and Clinical Consideration. *Eur. Urol.* 2004; *46*, 296-311.
70. Shariat, S.F.; Monoski, M.A.; Andrews, B.; Wheeler, T.M.; Lerner, S.P.; Slavin, K.M. Association of Plasma Urokinase-type Plasminogen Activator and its Receptor with Clinical Outcome in Patients Undergoing Radical Cystectomy for Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Urology* 2003; *61*, 1053-1058.
71. Van Veldhuizen, P.J.; Sadasivan, R.; Cherian, R.; Wyatt, A. Urokinase-type Plasminogen Activator Expression in Human Prostate Carcinomas. *Am. J. Med. Sci.* 1996; *312*, 8-11.
72. Gavrilov, D.; Kenzior, O.; Evans, M.; Calaluce, R.; Folk, W.R. Expression of Urokinase Plasminogen Activator and Receptor in Conjunction with the Ets Family and AP-1 Complex Transcription Factors in High Grade Prostate Cancer. *Eur. J. Cancer* 2001; *37*, 1033-1040.
73. McCabe, N.P.; Angwafo, F.F. 3rd; Zaher, A.; Selman, S.H.; Kouinche, A.; Jankun, J. Expression of Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor May

- be Related to Outcome in Prostate Cancer Patients. *Oncol. Rep.* 2000; 7, 879-882.
74. Miyake, H.; Hara, I.; Yamanaka, K.; Arakawa, S.; Kamidono, S.; Elevation of Urokinase-type Plasminogen Activator and its Receptor Densities as New Predictor of Disease Progression and Prognosis in Men with Prostate Cancer. *Int. J. Oncol.* 1999; 14, 535-541.
75. Parolini, S.; Flagiello, D.; Cinquetti, A.; Gozzi, R.; Cristini, S.; Cappiello, J.; Nicolai, P.; Rusnati, M.; Presta, M.; Tosatti, M.M. Up-Regulation of Urokinase-Type Plasminogen Activator in Squamous Cell Carcinoma of Human Larynx. *Br. J. Cancer.* 1996; 74, 1168-1174.
76. Nozaki, S.; Endo, Y.; Kawashiri, S.; Nakagawa, K.; Yamamoto, E.; Yonemura, Y.; Sasaki, T. Immunohistochemical Localization of a Urokinase-type Plasminogen Activator System in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity: Association with Mode of Invasion and Lymph node Metastasis. *Oral Oncol.* 1998; 34, 58-62.
77. Strojjan, P.; Budihna, M.; Smid, L.; Vrhovec, I.; Skrk, J. Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) in Tissue and Serum of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients. *Eur. J. Cancer.* 1998; 34, 1193-1197.
78. Tang, W.H.; Friess, H.; Kekis, P.B.; Martignoni, M.E.; Fukuda, A.; Roggo, A.; Zimmerman, A.; Büchler, M.W. Serine Proteinase Activation in Esophageal Cancer. *Anticancer Res.* 2001; 21, 2249-2258.
79. Shiomi, H.; Eguchi, Y.; Tani, T.; Kodama, M.; Hattori, T. Cellular Distribution and Clinical Value of Urokinase-type Plasminogen Activator, its Receptor, and Plasminogen Activator Inhibitor-2 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Am. J. Pathol.* 2000; 156, 567-575.
80. Torzewski, M.; Sarbia, M.; Verreet, P.; Dutkowski, P.; Heep, H.; Willers, R.; Gabbert, H.E. Prognostic Significance of Urokinase-type Plasminogen Activator Expression in Squamous Cell Carcinomas of the Esophagus. *Clin. Cancer Res.*

1997; 3, 2263-2268.

81. Sakakibara, T.; Hibi, K.; Kodera, Y.; Ito, K.; Akiyama, S.; Nakao, A. Plasminogen Activator Inhibitor-1 as a Potential Marker for the Malignancy of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10, 1375-1378.
82. Kaneko, T.; Konno, H.; Baba, M.; Tanaka, T.; Nakamura, S. Urokinase-type Plasminogen Activator Expression Correlates with Tumor Angiogenesis and Poor Outcome in Gastric Cancer. *Cancer Sci.* 2003; 94, 43-49.
83. Heiss, M.M.; Simon, E.H.; Beyer, B.C.; Gruetzner, K.U.; Tarabichi, A.; Babic, R.; Schildberg, F.W.; Allgayer, H. Minimal Residual Disease in Gastric Cancer: Evidence of an Independent Prognostic Relevance of Urokinase Receptor Expression by Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20, 2005-2016.
84. Kim, M.H.; Yoo, H.S.; Kim, M.Y.; Jang, H.J.; Baek, M.K.; Kim, H.R.; Kim, K.K.; Shin, B.A.; Ahn, B.W.; Jung, Y.D. Helicobacter pylori Stimulates Urokinase Plasminogen Activator Receptor Expression and Cell Invasiveness Through Reactive Oxygen Species and NF-kappaB Signaling in Human Gastric Carcinoma Cells. *Int. J. Mol. Med.* 2007; 19, 689-697.
85. Berger, D.H. Plasmin/plasminogen System in Colorectal Cancer. *World J. Surg.* 2002; 26, 767-771.
86. Stephens, R.W.; Nielsen, H.J.; Christensen, I.J.; Thorlacius-Ussing, O.; Sørensen, S.; Danø, K.; Brüner, N. Plasma Urokinase Receptor Levels in Patients with Colorectal Cancer: Relationship to Prognosis. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999; 91, 869-874.
87. Sakakibara, T.; Hibi, K.; Koike, M.; Fujiwara, M.; Kodera, Y.; Ito, K.; Nakao, A. Plasminogen Activator Inhibitor-1 as a Potential Marker for the Malignancy of Colorectal Cancer. *Br. J. Cancer* 2005; 93, 799-803.
88. Zheng, Q.; Tang, Z.Y.; Xue, Q.; Shi, D.R.; Song, H.Y.; Tang, H.B. Invasion

and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma in Relation to Urokinase-type Plasminogen Activator, its Receptor and Inhibitor. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2000; 126, 641-646.

89. Zhou, Q.; Liang, L.J.; Peng, B.G.; Zhen, Y.Y. Expression and Clinical Significance of Coagulate and Fibrinolysis Factors in Tissue and Plasma from Hepatocellular Carcinoma Patients. *Ai Zheng* 2006; 25, 1433-1438.
90. De Petro, G.; Taviani, D.; Copeta, A.; Portolani, N.; Giulini, S.M.; Barlati, S. Expression of Urokinase-type Plasminogen Activator (u-PA), u-PA Receptor, and Tissue-type PA Messenger RNAs in Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* 1998; 58, 2234-2239.
91. Itoh, T.; Hayashi, Y.; Kanamaru, T.; Morita, Y.; Suzuki, S.; Wang, W.; Zhou, L.; Rui, J.A.; Yamamoto, M.; Kuroda, Y.; Itoh, H. Clinical Significance of Urokinase-type Plasminogen Activator Activity in Hepatocellular Carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000; 15, 422-430.
92. Tonini, G.; Pantano, F.; Vincenzi, B.; Gabbriellini, A.; Coppola, R.; Santini, D. Molecular Prognostic Factors in Patients with Pancreatic Cancer. *Expert. Opin. Ther. Targets* 2007; 11, 1553-1569.
93. Cantero, D.; Friess, H.; Deflorin, J.; Zimmermann, A.; Bründler, M.A.; Riesle, E.; Korc, M.; Büchler, M.W. Enhanced Expression of Urokinase Plasminogen Activator and its Receptor in Pancreatic Carcinoma. *Br. J. Cancer.* 1997; 75, 388-395.
94. Shin, S.J.; Kim, K.O.; Kim, M.K.; Lee, K.H.; Hyun, M.S.; Kim, K.J.; Choi, J.H.; Song, H.S. Expression of E-cadherin and uPA and their Association with the Prognosis of Pancreatic Cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2005; 35, 342-348.
95. Sawai, H.; Okada, Y.; Funahashi, H.; Matsuo, Y.; Takahashi, H.; Takeyama, H.; Manabe, T. Interleukin-1alpha Enhances the Aggressive Behaviour of Pancreatic Cancer Cells by Regulating the $\alpha 6 \beta 1$ -Integrin and Urokinase Plasminogen

- Activator Receptor Expression. *BMC Cell Biol.* 2006; 7, 8.
96. Sherman, S.I. Thyroid Carcinoma. *Lancet* 2003; 361, 501-511.
97. Packman, K.S.; Demeure, M.J.; Doffek, K.M.; Wilson, S.D. Increased Plasminogen Activator and Type IV Collagenase Activity in Invasive Follicular Thyroid Carcinoma Cells. *Surgery* 1995; 118, 1011-1016.
98. Ito, Y. ; Takeda, T. ; Kobayashi, T. ; Wakasugi, E.; Tamaki, Y.; Umeshita, K.; Monden, T.; Shimano, T.; Monden, M. Plasminogen Activation System in Active Even in Thyroid Tumors; an Immunohistochemical Study. *Anticancer Res.* 1996; 16, 81-89.
- 99.
100. Kushlinskiĭ, N.E.; Gershteĭn, E.S.; Kazantseva, I.A.; Kharitidi, T.Iu., Liakina, L.T.; Kazakov, S.P.; Bagatyrev, O.P.; Kalinin, A.P. Plasminogen Activators of Urokinase and Tissue Types and their Inhibitor (PAI-1) in Cytosol Fraction in Thyroid Diseases. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* 2001; 5, 32-34.
101. Horvatić Herceg, G.; Herceg, D.; Kralik, M.; Bence-Zigman, Z.; Tomić-Brzac, H.; Kulić, A. Urokinase-type Plasminogen Activator and its Inhibitor in Thyroid Neoplasms: a Cytosol Study. *Wien. Klin. Wochenschr.* 2006; 118, 601-609.
102. Rao, J.S. Molecular Mechanisms of Glioma Invasiveness: the Role of Proteases. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; 3, 489-501.
103. Caccamo, D.V.; Keohane, M.E.; McKeever, P.E. Plasminogen Activators and Inhibitors in Gliomas: an Immunohistochemical Study. *Mod. Pathol.* 1994; 7, 99-104.
104. Yamamoto, M.; Sawaya, R.; Mohanam, S.; Bindal, A.K.; Bruner, J.M.; Oka,

- K.; Rao, V.H.; Tomonaga, M.; Nicolson, G.L.; Rao, J.S. Expression and Localization of Urokinase-type Plasminogen Activator in Human Astrocytomas in vivo. *Cancer Res.* 1994; *54*, 3656-3661.
105. Mohanam, S.; Go, Y.; Sawaya, R.; Venkaiah, B.; Mohan, P.M.; Kouraklis, G.P.; Gokaslan, Z.L.; Lagos, G.K.; Rao, J.S. Elevated Levels of Urokinase-type Plasminogen Activator and its Receptor During Tumor Growth in vivo. *Int. J. Oncol.* 1999; *14*, 169-17.
106. Bindal, A.K.; Hammoud, M.; Shi, W.M.; Wu, S.Z.; Sawaya, R.; Rao, J.S. Prognostic Significance of Proteolytic Enzymes in Human Brain Tumors. *J. Neurooncol.* 1994; *22*, 101-110.
107. Werle, B.; Kotzsch, M.; Lah, T.T.; Kos, J.; Gabrijelcic-Geiger, D.; Spiess, E.; Schirren, J.; Ebert, W.; Fiehn, W.; Luther, T.; Magdolen, V.; Schmitt, M.; Harbeck, N. Cathepsin B, Plasminogen Activator-Inhibitor (PAI-1) and Plasminogen Activator-Receptor (uPAR) are Prognostic Factors for Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res.* 2004; *24*, 4147-4161.
108. Almasi, C.E.; Høyer-Hansen, G.; Christensen, I.J.; Danø, K.; Pappot, H. Prognostic Impact of Liberated Domain I of the Urokinase Plasminogen Activator Receptor in Squamous Cell Lung Cancer Tissue. *Lung Cancer.* 2005; *48*, 349-355.
109. D'Amico, T.A.; Brooks, K.R.; Joshi, M.B.; Conlon, D.; Herndon, J. 2nd.; Petersen, R.P.; Harpole, D.H.Jr. Serum Protein Expression Predicts Recurrence in Patients with Early-Stage Lung Cancer after Resection. *Ann. Thorac. Surg.* 2006; *81*, 1982-1987; discussion 1987.
110. McWilliam, N.; Robbie, L.; Booth, N.; Bennett, B. Plasminogen Activator in Acute Myeloid Leukaemic Marrows: u-PA in Contrast to t-PA in Normal Marrow. *Br. J. Haematol.* 1998; *101*, 626-631.

111. Lanza, F.; Castoldi, G.L.; Castagnari, B.; Todd, R.F. 3rd.; Moretti, S.; Spisani, S.; Latorraca, A.; Focarile, E.; Roberti, M.G.; Traniello, S. Expression and Functional Role of Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor in Normal and Acute Leukaemic Cells. *Br. J. Haematol.* 1998; *103*, 110-123.
112. Graf, M.; Reif, S.; Hecht, K.; Pelka-Fleischer, R.; Pfister, K.; Schmetzer, H. High Expression of Urokinase Plasminogen Activator Receptor (UPA-R) in Acute Myeloid Leukemia (AML) is Associated with Worse Prognosis. *Am. J. Hematol.* 2005; *79*, 26-35.
113. Aref, S.; El-Sherbiny, M.; Mabed, M.; Menessy, A.; El-Refaei, M. Urokinase Plasminogen Activator Receptor and Soluble Matrix Metalloproteinase-9 in Acute Myeloid Leukemia Patients: a Possible Relation to Disease Invasion. *Hematology* 2003; *8*, 385-391.
114. Kushlinskii, N.E.; Yusifov, A.I.; Gershtein, E.S.; Solov'ev, Y.N.; Trapeznikov, N.N. Plasminogen Activators and their Inhibitors in Bone Tumors and Tumor-like Damages. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2001; *132*, 780-782.
115. Häckel, C.G.; Krueger, S.; Grote, H.J.; Oshiro, Y.; Hodges, S.; Johnston, D.A.; Johnson, M.E.; Roessner, A.; Ayala, A.G.; Czerniak, B. Overexpression of Cathepsin B and Urokinase Plasminogen Activator is Associated with Increased Risk of Recurrence and Metastasis in Patients with Chondrosarcoma. *Cancer* 2000; *89*, 995-1003.
116. Van Muijen, G.N.; Danen, E.H.; de Vries, T.J.; Quax, P.H.; Verheijen, J.H.; Ruiter, D.J. Properties of Metastasizing and Nonmetastasizing Human Melanoma Cells. *Recent Results Cancer Res.* 1995; *139*, 105-122.
117. Stahl, A.; Mueller, B.M. Melanoma Cell Migration on Vitronectin: Regulation by Components of the Plasminogen Activation System. *Int. J. Cancer* 1997; *71*, 116-122.

118. Ossowski, L.; Reich, E. Antibodies to Plasminogen Activator Inhibits Human Tumor Metastasis. *Cell* 1983; *91*, 869-874.
119. Dondi, D.; Festuccia, C.; Piccolella, M.; Bologna, M.; Motta, M. GnRH agonists and antagonists decrease the metastatic progression of human prostate cancer cell lines by inhibiting the plasminogen activator system. *Oncol Rep.* 2006; *15*, 393-400.
120. Sawai, H.; Liu, J.; Reber, H.A.; Hines, O.J.; Eibl, G. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma decreases pancreatic cancer cell invasion through modulation of the plasminogen activator system. *Mol. Cancer Res.* 2006; *4*, 159-67.
121. Han, B.; Nakamura, M.; Zhou, G.; Ishii, A.; Nakamura, A.; Bai, Y.; Mori, I.; Kakudo, K. Calcitonin Inhibits Invasion of Breast Cancer Cells: Involvement of Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) and uPA Receptor. *Int. J. Oncol.* 2006; *28*, 807-8914.
122. Shiratsuchi, T.; Ishibashi, H.; Shirasuna, K. Inhibition of Epidermal Growth Factor-induced Invasion by Dexamethasone and AP-1 Decoy in Human Squamous Cell Carcinoma cell lines. *J. Cell Physiol.* 2002; *193*, 340-348.
123. Thomas, S.; Muralidharan, A.; Shah, G.V. Knock-down of Calcitonin Receptor Expression Induces Apoptosis and Growth Arrest of Prostate Cancer Cells. *Int. J. Oncol.* 2007; *31*, 1425-1437.
124. Jonat, C.; Rahmsdorf, H.J.; Park, K.K.; Cato, A.C.; Gebel, S.; Ponta, H.; Herrlich, P. Antitumor Promotion and Anti Inflammation: Down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) Activity by Glucocorticoid Hormone. *Cell* 1990; *62*, 1189–1204.
125. Ray, A.; Prefontaine, K.E. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kB and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; *91*, 752–756.

126. Nalbandian, A.; Djakiew, D. The p75(NTR) Metastasis Suppressor Inhibits Urokinase Plasminogen Activator, Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9 in PC-3 Prostate Cancer Cells. *Clin. Exp. Metastasis* 2006; 23, 107-116.
127. Lee, K.H.; Choi, E.Y.; Hyun, M.S.; Jang, B.I.; Kim, T.N.; Lee, H.J.; Eun, J.Y.; Kim, H.G.; Yoon, S.S.; Lee, D.S.; Kim, J.H.; Kim, J.R. Role of the Hepatocyte Growth Factor/c-Met signaling in Regulating Urokinase Plasminogen Activator on Invasiveness in Human Hepatocellular Carcinoma: a Potential Therapeutic Target. *Clin. Exp. Metastasis* 2007; 25, 89-96.
128. Webb, C.P.; Hose, C.D.; Koochekpour, S.; Jeffers, M.; Oskarsson, M.; Sausville, E.; Monks, A.; Vande Woude, G.F. The Geldanamycins are Potent Inhibitors of the Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor-Met-Urokinase Plasminogen Activator-Plasmin Proteolytic Network. *Cancer Res.* 2000; 60, 342-9.
129. Stern, D. F. Tyrosine Kinase Signalling in Breast Cancer: ErbB Family Receptor Tyrosine Kinases. *Breast Cancer Res.* 2002; 2, 176-183.
130. Henic, E.; Sixt, M.; Hansson, S.; Høyer-Hansen, G.; Casslén, B. EGF-stimulated Migration in Ovarian Cancer Cells is Associated with Decreased Internalization, Increased Surface Expression, and Increased Shedding of the Urokinase Plasminogen Activator Receptor. *Gynecol. Oncol.* 2006; 101, 28-39.
131. Sliva, D. Signaling Pathways Responsible for Cancer Cell Invasion as Target for Cancer Therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* 2004; 4, 327-336.
132. Mani, S.; Rudin, C. M.; Kunkel, K.; Holmlund, J. T.; Geary, R. S.; Kindler, H. L.; Dorr, F. A.; Ratain, M. Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of Protein Kinase C-alpha Antisense Oligonucleotide ISIS 3521 Administered in

Combination with 5-fluorouracil and Leucovorin in Patients with Advanced Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2002, 8, 1042-1048.

133. Cripps, M.C.; Figueredo, A.T.; Oza, A.M.; Taylor, M.J.; Fields, A.L.; Holmlund, J.T.; McIntosh, L.W.; Geary, R.S.; Eisenhauer, E.A. Phase II Randomized Study of ISIS 3521 and ISIS 5132 in Patients with Locally Advanced or Metastatic Colorectal Cancer: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8, 2188-21.
134. Domin, J.; Waterfield, M.D. Using Structure to Define the Function of Phosphoinositide 3-Kinase Family Members. *FEBS Lett.* 1997; 410, 91-95.
135. Semba, S.; Itoh, N.; Ito, M.; Harada, M.; Yamakawa, M. The *in Vitro* and *in Vivo* Effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone (LY294002), a Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3'-kinase, in Human Colon Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8, 1957-1963.
136. Chun, K.S.; Surh, Y.J. Signal Transduction Pathways Regulating Cyclooxygenase-2 Expression: Potential Molecular Targets for Chemoprevention. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68, 1089-1100.
137. Castonguay, A.; Rioux, N. Inhibition of Lung Tumourigenesis by Sulindac: Comparison of two Experimental Protocols. *Carcinogenesis* 1997; 18, 491-496.
138. Simeone, A.M.; Nieves-Alicea, R.; McMurtry, V.C.; Colella, S.; Krahe, R.; Tari, A.M. Cyclooxygenase-2 Uses the Protein Kinase C/interleukin-8/urokinase-type Plasminogen Activator Pathway to Increase the Invasiveness of Breast Cancer Cells. *Int. J. Oncol.* 2007; 30, 785-792.
139. Slivova, V.; Zaloga, G.; DeMichele, S.J.; Mukerji, P.; Huang, Y.S.; Siddiqui, R.; Harvey, K.; Valachovicova, T.; Sliva, D. Green tea polyphenols modulate secretion of urokinase plasminogen activator (uPA) and inhibit invasive behavior of breast cancer cells. *Nutr. Cancer* 2005; 52, 66-73.

140. Karin, M. The Beginning of the End: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB Activation. *J. Biol. Chem.* 1999; 274, 27339-27342.
141. Adams, J. Development of the Proteasome Inhibitor PS-341. *Oncologist* 2002; 7, 9-16.
142. Cho-Chung, Y.S.; Nesterova, M.; Becker, K.G.; Srivastava, R.; Park, Y.G.; Lee, Y.N.; Cho, Y.S.; Kim, M.K. Neary C, Cheadle C. Dissecting the Circuitry of Protein Kinase A and cAMP Signaling in Cancer Genesis: Antisense, Microarray, Gene Overexpression, and Transcription Factor Decoy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002; 968, 22-36.
143. Ray, A.; Norden, B. Peptide Nucleic Acid (PNA): its Medical and Biotechnical Applications and Promise for the Future. *FASEB J.* 2000; 14, 1041-1060.
144. Szyf, M.; Pakneshan, P.; Rabbani, S.A. DNA Demethylation and Cancer: Therapeutic Implication. *Cancer Lett.* 2004; 211, 133-143.
145. Goffin, J.; Eisenhauer, E. DNA Methyltransferase Inhibitors-State of the Art. *Ann. Oncol.* 2002; 13, 1699-1716.
146. Bhattacharya, S.K.; Ramchandani, S.; Cervoni, N.; Szyf, M. A Mammalian Protein with Specific Demethylase Activity for mCpG DNA. *Nature* 1999; 397, 579-583.
147. Castanotto, D.; Tommasi, S.; Li, M.; Li, H.; Yanow, S.; Pfeifer, G.P.; Rossi, J.J. Short Hairpin RNA-Directed Cytosine (CpG) Methylation of the RASSF1A Gene Promoter in HeLa Cells. *Mol. Ther.* 2005; 12, 179-183.

148. Towle, M.J.; Lee, A.; Maduakor, E.C.; Schwartz, C.E.; Bridges, A.J.; Littlefield, B.A. Inhibition of Urokinase by 4-substituted Benzo[*b*]thiophene-2-carboxamidines: an Important New Class of Selective Synthetic Urokinase Inhibitor. *Cancer Res.* 1993; *53*, 2553-2559.
149. Alonso, D.F.; Farías, E.F.; Ladeda, V.; Davel, L.; Puricelli, L.; Bal de Kier Joffé, E. Effects of Synthetic Urokinase Inhibitors on Local Invasion and Metastasis in a Murine Mammary Tumor Model. *Breast Cancer Res. Treat.* 1996; *40*, 209-223.
150. Spencer, J.R.; McGee, D.; Allen, D.; Katz, B.A.; Luong, C.; Sendzik, M.; Squires, N.; Mackman, R.L. 4-Aminoarylguanidine and 4-aminobenzamidine Derivatives as Potent and Selective Urokinase-type Plasminogen Activator Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002; *12*, 2023-2026.
151. Wang, C.I.; Yang, Q.; Craik, C.S. Isolation of a High Affinity Inhibitor of Urokinase-type Plasminogen Activator by Phage Display of Ecotin. *J. Biol. Chem.* 1995; *270*, 12250-12256.
152. Joossens, J.; Van der Veken, P.; Lambeir, A.M.; Augustyns, K.; Haemers, A. Development of Irreversible Diphenyl Phosphonate Inhibitors for Urokinase Plasminogen Activator. *J. Med. Chem.* 2004; *47*, 2411-2413.
153. Salier, J.P. Inter-alpha-trypsin Inhibitor: Emergence of a Family Within the Kunitz-type Protease Inhibitor Superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 1990; *15*, 435-439.
154. Kobayashi, H.; Gotoh, J.; Kanayama, N.; Hirashima, Y.; Terao, T.; Sugino, D. Inhibition of Tumor Cell Invasion through Matrigel by a Peptide Derived from the Domain II Region in Urinary Trypsin Inhibition. *Cancer Res.* 1995; *55*, 1847-1852.

155. Kobayashi, H.; Suzuki, M.; Kanayama, N.; Nishida, T.; Takigawa, M.; Terao, T. Suppression of Urokinase Receptor Expression by Bikunin is Associated with Inhibition of Upstream Targets of Extracellular Signal-regulated Kinase-dependent Cascade. *Eur. J. Biochem.* 2002; 269, 3945-3957.
156. Devy, L.; Rabbani, S.A.; Stochl, M.; Ruskowski, M.; Mackie, I.; Naa, L.; Toews, M.; van Gool, R.; Chen, J.; Ley, A.; Ladner, R.C.; Dransfield, D.T.; Henderikx, P. PEGylated DX-1000: Pharmacokinetics and Antineoplastic Activity of a Specific Plasmin Inhibitor. *Neoplasia* 2007; 9, 927-937.
157. Brooks, T.D.; Slomp, J.; Quax, P.H.; De Bart, A.C.; Spencer, M.T.; Verheijen, J.H.; Charlton, P.A. Antibodies to PAI-1 Alter the Invasive and Migratory Properties of Human Tumour Cells in Vitro. *Clin. Exp. Metastasis* 2000; 18, 445-453.
158. Leik, C.E.; Su, E.J.; Nambi, P.; Crandall, D.L.; Lawrence, D.A. Effect of Pharmacologic Plasminogen Activator Inhibitor-1 Inhibition on Cell Motility and Tumor Angiogenesis. *J. Thromb. Haemost.* 2006; 4, 2710-2715.
159. Mutoh, M.; Niho, N.; Komiya, M.; Takahashi, M.; Ohtsubo, R.; Nakatogawa, K.; Ueda, K.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K. Plasminogen Activator Inhibitor-1 (Pai-1) Blockers Suppress Intestinal Polyp Formation in Min Mice. *Carcinogenesis*. 2008; 29, 824-829.
160. Bauer, T.W.; Liu, W.; Fan, F.; Camp, E.R.; Yang, A.; Somcio, R.J.; Bucana, C.D.; Callahan, J.; Parry, G.C.; Evans, D.B.; Boyd, D.D.; Mazar, A.P.; Ellis, L.M. Targeting of Urokinase Plasminogen Activator Receptor in Human Pancreatic Carcinoma Cells Inhibits c-Met- and Insulin-like Growth Factor-I Receptor-mediated Migration and Invasion and Orthotopic Tumor Growth in Mice. *Cancer Res.* 2005; 65, 7775-7781.

161. Cohen, R.L.; Xi, X.P.; Crowley, C.W.; Lucas, B.K.; Levinson, A.D.; Shuman, M.A. Effects of Urokinase Receptor Occupancy on Plasmin Generation and Proteolysis of Basement Membrane by Human Tumor Cells. *Blood*. 1991; 78, 479-487.
162. Crowley, C.W.; Cohen, R.L.; Lucas, B.K.; Liu, G.; Shuman, M.A.; Levinson, A.D. Prevention of Metastasis by Inhibition of the Urokinase Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1993; 90, 5021-5025.
163. Li, H.; Griscelli, F.; Lindenmeyer, F.; Opolon, P.; Sun, L.Q.; Connault, E.; Soria, J.; Soria, C.; Perricaudet, M.; Yeh, P.; Lu, H. Systemic Delivery of Antiangiogenic Adenovirus AdmATF Induces Liver Resistance to Metastasis and Prolongs Survival of Mice. *Hum. Gene Ther.* 1999; 10, 3045-3053.
164. Krol, J.; Kopitz, C.; Kirschenhofer, A.; Schmitt, M.; Magdolen, U.; Krüger, A.; Magdolen, V. Inhibition of Intraperitoneal Tumor Growth of Human Ovarian Cancer Cells by Bi- and Trifunctional Inhibitors of Tumor-associated Proteolytic Systems. *Biol. Chem.* 2003; 384, 1097-1102.
165. Krüger, A.; Soeltl, R.; Lutz, V.; Wilhelm, O.G.; Magdolen, V.; Rojo, E.E.; Hantzopoulos, P.A.; Graeff, H.; Gänsbacher, B.; Schmitt, M. Reduction of Breast Carcinoma Tumor Growth and Lung Colonization by Overexpression of the Soluble Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor (CD87). *Cancer Gene Ther.* 2000; 7, 292-299.
166. Guo, Y.; Higazi, A.A.; Arakelian, A.; Sachais, B.S.; Cines, D.; Goldfarb, R.H.; Jones, T.R.; Kwaan, H.; Mazar, A.P.; Rabbani, S.A. A Peptide Derived from the Nonreceptor Binding Region of Urokinase Plasminogen Activator (uPA) Inhibits Tumor Progression and Angiogenesis and Induces Tumor Cell Death in Vivo. *FASEB J.* 2000; 14, 1400-1410.
167. La Rocca, R.V.; Stein, C.A.; Myers, C.E. Suramin: Prototype of a New Generation of Antitumor Compounds. *Cancer Cells*. 1990; 2, 106-115.

168. Kim SJ, Shiba E, Taguchi T, et al. uPA receptor expression in benign and malignant thyroid tumors. *Anticancer Res* 2002, 22, 387-393.
169. Ragno P, Montuori N, Salzano S, Rossi G. Urokinase-type plasminogen-activator and normal thyroid cell adhesion to the extracellular matrix. *Biochimie* 1999, 81, 355-358.
170. Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3, 932-943.
171. De Bock CE, Wang Y. Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression in cancer. *Med Res Rev* 2004, 24, 13-19.
172. Zanetti A, Stoppacciaro A, Marzullo A, et al. Expression of Met protein and urokinase-type plasminogen activator receptor (uPA-R) in papillary carcinoma of the thyroid. *J Pathol* 1998, 186, 287-291.
173. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997, 72, 1-2.
174. Duffy MJ. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des* 2004, 10, 39-49.
175. Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, et al. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost* 1997, 78, 285-296.
176. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000, 10, 415-433.

177. Baldini E, Toller M, Graziano FM, et al. Expression of matrix metalloproteinases and their specific inhibitors (TIMPs) in normal and different human thyroid tumor cell lines. *Thyroid* 2004, 14, 881-888.
178. Smith JW, Van Der Pluijm G, Romijn HA, Lowik CW, Morreau H, Goslings BM. Degradation of extracellular matrix by metastatic follicular thyroid carcinoma cell lines: role of the plasmin activation system. *Thyroid* 1999, 9, 913-919.
179. Hedinger C, Williams ED, Sobin LH. The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. *Cancer* 1989, 63:908-911.
180. Plaffl MW, Vandesompele J, Kubista M. Data analysis software (2009) in real-time PCR: current technology and applications. Logan J, Edwards K, Saunders N, eds. London: Applied and Functional Genomics, Health Protection Agency, Caister Academic Press.
181. Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento M. The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2009, 9: 32-71.
182. Buergy D, Weber T, Maurer GD, Mudduluru G, Medved F, Leupol JH, Brauckhoff M, Post S, Dralle H, Allgayer H. Urokinase receptor, MMP-1 and MMP-9 are marker to differentiate prognosis, adenoma and carcinoma in thyroid malignancies. *Int J Cancer* 2009, 125: 894-901.
183. Gospodarowicz MK, Henson DE, Hutter RVP, O'Sullivan B, Sobin LH, Wittekind Ch 2001 Prognostic factors in cancer. 2nd ed. International Union Against Cancer. New York: Wiley-Liss
184. Eustatia-Rutten CF, Corssmit EP, Biermasz NR, Pereira AM, Romijn JA, Smit JW. Survival and death causes in differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006,91:313.

185. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007, 28:742–762.
186. Shibru D, Chung KW, Kebebew E. Recent developments in the clinical application of thyroid cancer biomarkers. *Curr Opin Oncol* 2008, 20:13–18.
187. Nowicki TS, Kummer NT, Jacob C, Suslina N, Schaefer S, Schantz S, Shin E, Moscatello AL, Tiwari RK, Geliebter J. Inhibition of uPAR and uPA reduces invasion in papillary thyroid carcinoma cells. *Laryngoscope*. 2010 Jul;120(7):1383-90.
188. Nowicki TS, Moscatello AL, Shin E, Schantz S, Tiwari RK, Geliebter J. The urokinase plasminogen activator system in metastatic papillary carcinoma: a potential therapeutic target. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Oct;96(10):3062-4.
189. Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento E, Di Matteo FM, Catania A, Ulisse S. The urokinase plasminogen activating system in thyroid cancer: clinical implications. *G Chir*. 2012 Oct;33(10):305-10
190. Horvatic Herceg G, Herceg D, Kralik M, Kulic A, Bence-Zigman Z, Tomic-Brzac H, Bracic I, Kusacic-Kuna S, Prgomet D. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor type -1 as prognostic factors in differentiated thyroid carcinoma patients. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013 Oct;149(4):533-40

Un ringraziamento particolare al mio tutor, il Prof. Massimino D'Armiento per la costanza e pazienza con cui ha seguito il mio progetto di dottorato e per il sostegno scientifico ed umano mostratomi in questi anni.