

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

*Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali*

*Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità*

*Corso di Dottorato in Scienze Endocrinologiche e Metaboliche*

*XXVIII ciclo*



**IL RECETTORE DELLA DOPAMINA DI TIPO 2  
(DRD2) INIBISCE LA MIGRAZIONE DI  
CELLULE DI ADENOMA IPOFISARIO NON  
SECERNENTE TRAMITE INATTIVAZIONE DI  
COFILINA**

**Tesi di Dottorato di:** Elena Giardino

**Matr. n:** R10083

**Tutor:** Dott. Andrea Lania

*Anno Accademico 2014-2015*

<b>RIASSUNTO.....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>4</b>
1. IPOFISI E ADENOMI IPOFISARI .....	4
1.1 PATOLOGIA IPOFISARIA .....	4
1.2 CLASSIFICAZIONE DEGLI ADENOMI IPOFISARI.....	4
1.3 EZIOPATOGENESI DEGLI ADENOMI IPOFISARI.....	5
1.4 ADENOMI NON SECERNENTI (NFPA) .....	10
1.4.1 EPIDEMIOLOGIA .....	10
1.4.2 CARATTERISTICHE CLINICHE .....	10
1.4.3 DIAGNOSI .....	11
1.4.4 TERAPIA.....	11
2. RECETTORE DELLA DOPAMINA DI TIPO 2 (DRD2).....	12
2.1 STRUTTURA.....	12
2.2 ESPRESSIONE NELL'IPOFISI .....	13
2.3 TRASDUZIONE DEL SEGNALE.....	13
2.4 PROFILO FARMACOLOGICO.....	15
3.MIGRAZIONE E INVASIONE CELLULARE .....	15
3.1 ASPETTI GENERALI .....	15
3.2 COFILINA .....	18
3.3 INVASIVITA' DEGLI NFPA: MECCANISMI MOLECOLARI .....	21
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO.....</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>24</b>
3.1 PAZIENTI .....	24
3.2 COLTURE CELLULARI DI ADENOMA IPOFISARIO.....	24
3.3 COLTURE CELLULARI DI HP75.....	25
3.4 SAGGIO DI MIGRAZIONE TRANSWELL E INVASIONE (BOYDEN CHAMBER) .....	25
3.5 SAGGIO DI WOUND HEALING (SCRATCH ASSAY) .....	26
3.6 ANALISI DI IMMUNOFLUORESCENZA .....	26
3.7 RACCOLTA CELLULE ESTRAZIONE PROTEICA.....	26
3.8 DOSAGGIO DELLE PROTEINE SECONDO METODO BCA.....	27
3.9 ELETTROFORESI MONODIMENSIONALE SU GEL DI POLIACRILAMMIDE .....	27
3.10 CLONAGGIO DEI MUTANTI DI COFILINA.....	29
3.11 TRASFEZIONE DEI COSTRUTTI DI COFILINA IN CELLULE HP75 .....	30
3.12 ANALISI STATISTICA .....	30
<b>4. RISULTATI .....</b>	<b>31</b>
4.1 L'AGONISTA DEL DRD2 RIDUCE LA MIGRAZIONE E L'INVASIONE CELLULARE .....	31
4.2 LOCALIZZAZIONE INTRACELLULARE DI COFILINA .....	34
4.3 L'AGONISTA DEL DRD2 AUMENTA I LIVELLI DI COFILINA FOSFORILATA.....	35
4.4 L'INIBITORE DELLA CHINASI ROCK REVERTE L'ABILITA' DEL BIM53097 DI FOSFORILARE LA COFILINA E DI INIBIRE LA MIGRAZIONE .....	36
4.5 EFFETTI DELL'OVERESPRESSIONE DI COFILINAWT E DEI SUOI MUTANTI SULLA MIGRAZIONE CELLULARE .....	37
4.6 LA FOSFORILAZIONE DI COFILINA E' FORTEMENTE RIDOTTA NEGLI NFPA INVASIVI .....	38
<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>40</b>
<b>6. REFERENZE .....</b>	<b>43</b>

## RIASSUNTO

Gli adenomi ipofisari non funzionanti (NFPA) sono tumori di natura benigna, ma presentano spesso un'invasività locale che riduce fortemente il successo dell'intervento chirurgico. La terapia medica è ad oggi poco utilizzata, sebbene alcune evidenze indichino che gli agonisti del recettore della dopamina di tipo 2 (DRD2) inducano una riduzione delle dimensioni del tumore in alcuni pazienti e siano in grado di inibire la proliferazione e l'apoptosi cellulare in vitro. Scopo di questo studio è stato valutare l'effetto del BIM53097, agonista del DR2D, sulla migrazione e l'invasione cellulare in cellule di NFPA; studiare i meccanismi molecolari che regolano la motilità di queste cellule, concentrandosi sul ruolo della cofilina, una proteina coinvolta nella riorganizzazione del citoscheletro actinico.

I dati ottenuti dimostrano che dopo incubazione con BIM53097 si ha una riduzione significativa della migrazione ( $42\pm 6\%$   $p < 0,05$ ) e dell'invasione ( $32\pm 13\%$   $p < 0.001$ ) in un sottogruppo (75% e 67% rispettivamente) di NFPA. Questi dati sono stati replicati nella linea cellulare umana HP75. Il BIM53097, ad una concentrazione di  $1\mu\text{M}$ , determina un aumento di cofilina fosforilata (forma inattiva) di 4,2 volte in NFPA e 2,3 volte in cellule HP75. Questo effetto viene completamente abolito dall'uso del composto Y-27632, l'inibitore di una delle chinasi coinvolte nel pathway di fosforilazione di cofilina, ROCK (Rho-associated serine/treonine chinasi). In cellule HP75 l'overespressione di cofilina wild-type e cofilina S3A (fosfodeficiente) determina un aumento della migrazione cellulare ( $49\pm 6\%$  e  $57\pm 9\%$ , rispettivamente, di aumento rispetto al plasmide vuoto, GFP,  $p < 0,05$ ). Questo suggerisce un ruolo causale per cofilina nella regolazione della motilità cellulare. Infine, analisi di Western blot hanno mostrato livelli significativamente più elevati di cofilina fosforilata in NFPA non invasivi rispetto a quelli invasivi.

In conclusione, i dati presentati in questo lavoro dimostrano che l'agonista del DRD2 è in grado di inibire la migrazione in cellule di NFPA attraverso un meccanismo molecolare che coinvolge la fosforilazione di cofilina mediata da ROCK. Inoltre, questi dati indicano che lo stato di fosforilazione della cofilina potrebbe essere un marker molecolare associato al comportamento invasivo degli NFPA.

# 1. INTRODUZIONE

## 1. IPOFISI E ADENOMI IPOFISARI

L'ipofisi anteriore o adenoipofisi è costituita da diversi tipi cellulari secernenti derivati da un unico precursore pluripotente. Durante lo sviluppo embrionale, l'azione di specifici fattori trascrizionali, strettamente controllata nel tempo, ne induce il differenziamento (*commitment*) in cinque distinte sottopopolazioni di cellule: corticotrope, somatotrope, lattotrope, gonadotrope e tireotrope, ognuna in grado di sintetizzare e secernere uno specifico ormone (rispettivamente ACTH (Adreno Corticotropic Hormone), GH (Growth Hormone), PRL (Prolattina), FSH (Follicle-Stimulating Hormone) e LH (Luteinizing Hormone), TSH (Thyroid-Stimulating Hormone). L'ipofisi integra stimoli mediati da ormoni ipotalamici, segnali locali, e feedback ormonali periferici per regolare molteplici funzioni dell'organismo come la crescita, la riproduzione sessuale e la lattazione, il metabolismo e la risposta allo stress.

### 1.1 PATOLOGIA IPOFISARIA

La patologia che più comunemente interessa l'ipofisi è l'adenoma ipofisario.

Gli adenomi ipofisari rappresentano circa il 15% dei tumori intracranici (Asa SL, 2008; Kovacs K et al., 1996), sebbene vengano rilevati in circa il 20% delle autopsie effettuate post-mortem sulla popolazione. Essi sono di natura quasi esclusivamente benigna e solo in rarissimi casi tendono a metastatizzare (si parla di carcinomi), tuttavia causano co-morbidità che impattano in maniera più o meno importante sulla qualità e l'aspettativa di vita dei soggetti affetti.

Molto raramente le patologie dell'adenoipofisi sono legate a mutazioni di geni codificanti i fattori trascrizionali (Pax6, Six3, Rpx, Lhx3/4, Pitx1/2, PROP1, Pit-1, SF-1) importanti per il differenziamento precoce dei precursori. In questi casi si determina un'ipoplasia ghiandolare e un quadro di ipopituitarismo caratteristico, a seconda dello/degli step differenziativi che vengono a mancare (Melmed S., 2003).

### 1.2 CLASSIFICAZIONE DEGLI ADENOMI IPOFISARI

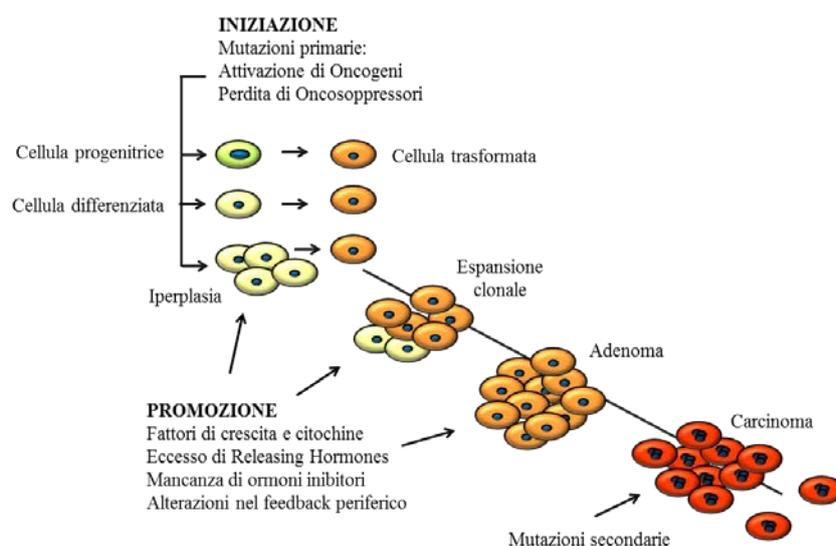
Gli adenomi ipofisari vengono clinicamente classificati in base alle alterazioni della secrezione ormonale, mediante metodiche d'immunoistochimica che rilevano la positività o meno delle tropine ipofisarie. Secondo questa classificazione funzionale gli adenomi possono essere secernenti (ACTH-omi, GH-omi, TSH-omi, PRL-omi), caratterizzati da sindromi da eccesso ormonale, o non secernenti (NFPA), determinando segni e sintomi legati esclusivamente all'espansione della massa tumorale ed alle sue conseguenze sulle strutture adiacenti.

Le casistiche riportano che il 40% degli adenomi è rappresentato da adenomi secernenti prolattina (che comportano galattorrea, amenorrea e infertilità in entrambi i sessi), il 20-25% da adenomi secernenti ormone della crescita (responsabili della malattia acromegalica o del gigantismo se l'esordio è durante la pubertà), l'8-10% da adenomi secernenti ACTH, che denotano la malattia di Cushing e il 25% dagli adenomi non funzionanti (NFPA). Molto più rari sono gli adenomi secernenti TSH e i gonadotropinomi (1-2%), caratterizzati rispettivamente da lieve ipotiroidismo e disfunzione gonadica.

Un'ulteriore classificazione si basa su parametri anatomici e radiografici, che tengono conto delle dimensioni ("microadenomi" se diametro  $\leq 10$  mm, "macroadenomi" se diametro  $> 10$  mm), dell'estensione ("intrasellari" ed "extrasellari" a seconda della posizione occupata rispetto alla sella turcica dell'osso sfenoidale nella quale si trova l'ipofisi), e del grado di infiltrazione di strutture contigue ("invasivi" e "non invasivi").

### 1.3 EZIOPATOGENESI DEGLI ADENOMI IPOFISARI

L'eziopatogenesi di queste neoplasie è stata per anni oggetto di numerosi studi. Inizialmente sono state elaborate due teorie contrapposte: l'ipotesi dei deficit ipofisari "intrinseci" e l'ipotesi dell'alterata secrezione ipotalamica. Successivamente è stato proposto un modello che le contempla entrambe: in accordo con i principi generali della tumorigenesi, molte evidenze ottenute in vivo e in vitro, suggeriscono che accanto ai fattori di iniziazione che determinano mutazioni con potenziale oncogeno all'interno della singola cellula (alterazione intrinseche dell'ipofisi) vi sono fattori che promuovono la progressione tumorale quali alterazioni neurosecretorie ipotalamiche, l'eccesso di fattori di crescita paracrini e citochine, difetti nei meccanismi di feedback periferici e del signaling recettoriale come illustrato in figura 1 (Faglia G & Spada A, 2001).



**Figura1.** La formazione e la crescita di un adenoma ipofisario è il risultato dell'azione combinata di eventi trasformanti (iniziazione) e di eventi che supportano l'espansione clonale (promozione). Mutazioni oncogeniche e/o la perdita di oncosoppressori possono presentarsi sia a livello del progenitore ipofisario che a livello delle cellule ipofisarie differenziate, e possono essere facilitate da un'iperplasia ghiandolare pre-esistente, determinando l'iniziazione verso un fenotipo tumorale. Le mutazioni conferiscono alla cellula un vantaggio replicativo con conseguente espansione clonale, favorita dalla presenza di fattori "di promozione". La presenza di mutazioni secondarie (ad esempio in RAS) possono causare l'insorgenza di rari carcinomi ipofisari.

A supporto della teoria ipofisaria, vi sono convincenti evidenze, dimostrate mediante analisi di inattivazione del cromosoma X e studi di perdita di eterozigotità, (LOH, loss of heterozygosity,) (Herman V et al., 1990), sull'origine monoclonale della maggior parte degli adenomi ipofisari, secernenti e non secernenti. Ciò implica che questi adenomi derivano dall'espansione clonale di una singola cellula in cui eventi mutazionali, quali attivazioni di protooncogeni o perdita di oncosoppressori, hanno determinato un vantaggio di crescita. Pertanto, è stato condotto un accurato screening dei tumori ipofisari, allo scopo di identificare possibili mutazioni geniche in quei protooncogeni e oncosoppressori più comunemente legati allo sviluppo di neoplasie.

Per quanto riguarda la presenza di oncogeni come *c-myc*, *c-fos*, *c-myb*, che sono spesso riscontrati nei tumori umani, i dati ottenuti negli adenomi ipofisari sono generalmente negativi (Woloshak M et al., 1994). L'unica eccezione riguarda l'oncogene RAS, che si è visto essere associato ad un fenotipo particolarmente maligno di tumore PRL-secernente. Mutazioni di RAS sono state identificate nelle metastasi a distanza, ma non nella lesione primaria, nei rari casi di carcinoma ipofisario.

La maggior parte degli adenomi ipofisari ha un'origine sporadica, solo raramente sono ricondotti a mutazioni genetiche (Vandeva S et al, 2010). In questi casi, i geni più frequentemente mutati sono quelli codificanti proteine coinvolte nella trasmissione del segnale intracellulare.

In particolare, sono state identificate mutazioni attivanti (Arg201Cys/His, Gln227Arg/Leu) del gene *GNAS1* (guanine nucleotide-activating  $\alpha$  subunit) codificante la subunità  $\alpha$  della proteina Gs ( $G\alpha$ ) (Spada A et al., 1992). La proteina G stimolatoria è associata a recettori a sette domini transmembrana, necessaria per la trasduzione del segnale ormonale. Nello specifico la sua subunità  $\alpha$  attiva l'enzima adenilato ciclasi con conseguente aumento dei livelli di cAMP. Queste mutazioni cadono in due siti critici per l'attività GTP-asi della  $G\alpha$ , pertanto viene mantenuto attivo il pathway a valle dell'adenilato ciclasi con elevati livelli di cAMP. In alcuni tipi cellulari, quali ad esempio i somatotropi, il cAMP rappresenta un fattore di crescita, dunque la proteina  $G\alpha$  soggetta a mutazioni attivanti può essere considerata un oncogene (in seguito denominato "oncogene gsp") (Landis CA et al., 1989). Inoltre, in queste cellule, il cAMP attiva la protein chinasi A (PKA), che fosforila CREB (cAMP Responsive Element-Binding protein), responsabile della trascrizione

genica di GH e della sua ipersecrezione indipendentemente dalla stimolazione ipotalamica (Bertherat J et al., 1995).

Negli adenomi ipofisari le mutazioni della *gsp* si ritrovano in circa il 30-40% dei tumori GH-secernti e in una percentuale molto più esigua (< 10%) degli adenomi non funzionanti e secernti ACTH (< 5%) (Spiegel AM, 1996; Tordjman K et al., 1993; Williamson EA et al., 1995).

Numerosi studi si sono concentrati sulla via di trasduzione a valle del cAMP, poiché le molecole che la regolano riducendone l'attivazione, possono essere considerate oncosoppressori. Contrariamente a quanto accade con gli oncogeni, in cui una mutazione monoallelica è in grado di determinare un vantaggio di crescita, mutazioni bialleliche sono necessarie per deregolare gli oncosoppressori, con conseguente sviluppo tumorale. Esempio di tale condizione sono le subunità regolatorie R della PKA cAMP-dipendente. Nei mammiferi vi sono due isoforme di PKA ovvero PKA1 e PKA2 con subunità catalitiche comuni ma subunità regolatorie differenti: R1 ed R2. Quattro geni codificano per diverse isoforme regolatorie R1A, R1B, R2A, R2B, che differiscono per la distribuzione tissutale, la localizzazione cellulare e le proprietà biologiche. La presenza di cAMP determina la dissociazione delle subunità regolatorie e l'attivazione di quelle catalitiche in grado di fosforilare e attivare diversi substrati (Skalhegg BS & Tasken K, 2000).

Mutazioni inattivanti il gene che codifica per la subunità regolatoria R1A (*PRKAR1A*) nel cromosoma 17q22-24 sono state identificate come evento eziopatogenetico in due terzi dei soggetti con la Complesso di Carney (CNC), una rara patologia ereditaria a trasmissione autosomica dominante caratterizzata dalla predisposizione a sviluppare tumori endocrini e non, adenomi ipofisari, oltre alla presenza di mixomi cardiaci e lesioni cutanee pigmentate (Boikos SA e Stratakis CA, 2006). La ricerca di mutazioni in questo gene in tumori ipofisari sporadici ha dato esito negativo, mentre è stata recentemente segnalata una ridotta espressione proteica di R1A dovuta all'incremento della degradazione proteosomica. Il conseguente sbilanciamento del rapporto fra R1 e R2 sembra spiegare l'alterata ed elevata sensibilità ai livelli di cAMP e la proliferazione cAMP-dipendente presente in cellule di GH-oma in analogia a quanto accade al fenotipo proliferativo del CNC risultante dalla perdita di funzione della PKA (Lania A et al., 2004).

Negli ultimi anni è stato individuato un gene codificante la proteina che interagisce con il recettore per idrocarburi arilici (AIP) (Vierimaa O et al., 2006). Questo gene risulta mutato nel 30% delle forme familiari di adenomi ipofisari (FIPA), e nello specifico nel 50% delle famiglie con somatotropinomi (Chahal HS et al., 2010). Mutazioni germinali sono molto rare nei casi sporadici dove si riscontrano per lo più nei giovani acromegalici (Barlier A et al, 2007). AIP è una proteina co-chaperon di 330 amminoacidi coinvolta nella maturazione funzionale del recettore AhR, un

recettore nucleare cosiddetto “orfano” in grado di legare la tossina della diossina (Carver LA & Bradfield CA, 1997). In particolare AIP protegge AhR dall’ubiquitinilazione, prolungandone l’emivita, lo ritiene a livello citoplasmatico non permettendogli di agire da fattore trascrizionale.. AIP è in grado di legare la fosfodiesterasi cAMP specifica PDE4A5 inibendone l’attività catalitica, abilità che viene persa dalle forme mutate di AIP riscontrate nei tumori ipofisari (Bolger GB et al., 2003; Trivellin G & Korbonits M, 2011). Inoltre AIP interagisce con un’altra isoforma di PDE (PDE2A) espressa nell’ipofisi umana sulla quale esercita un effetto opposto (de Oliveira SK & Smolenski A, 2009). A causa del ruolo centrale del signaling del cAMP nell’ipofisi, l’interazione di AIP con le PDEs può essere implicata nella tumorigenesi ipofisaria legata ad alterazioni di AIP, ma ad oggi non si conoscono i meccanismi molecolari coinvolti. Recentemente è stato dimostrato nel modello cellulare ipofisario di ratto GH3 che AIP regola il signaling del cAMP e la secrezione di GH indipendentemente dall’interazione con le PDE (Formosa R et al., 2013).

Un altro locus frequentemente soggetto a LOH negli adenomi ipofisari è situato sul cromosoma 13q12-14 (Clayton RN et al., 2000), dove mappa il gene del retinoblastoma (Rb). Rb è un oncosoppressore che codifica per una proteina chiave del ciclo cellulare la cui forma attiva inibisce il passaggio delle fasi G1/S. La sua importanza nella patogenesi dei tumori ipofisari è stata dimostrata chiaramente nei modelli sperimentali animali. Tumori ACTH-secernenti sviluppati in seguito a un’iperplasia dell’ipofisi intermedia sono stati rilevati in topi transgenici non esprimenti il gene del retinoblastoma (Rb) (Jacks T et al., 1992). Nelle neoplasie ipofisarie sono state segnalate sia l’ipermetilazione del promotore dell’oncosoppressore, come causa di ridotta trascrizione e ridotti livelli di mRNA, che l’aumentata instabilità proteica come causa d’incrementata degradazione, con conseguente riduzione dei livelli di proteina (Woloshak M et al., 1994).

Lo stesso fenotipo indotto dall’assenza del gene Rb si osserva nel topo in cui viene abrogata la espressione di p27Kip1, un inibitore della chinasi ciclina-dipendente che determina arresto del ciclo cellulare (Nakayama K et al., 1996). Dagli studi di immunistochemica condotti studi su ampie casistiche di tumori ipofisari, compresi adenomi ACTH-secernenti, carcinomi e loro metastasi, sembra che p27Kip1 sia meno espressa o addirittura assente ma non sono state riscontrate mutazioni in tale gene (Lidhar K et al., 1999).

Ulteriori studi hanno segnalato modificazioni quantitative di proteine coinvolte nella progressione del ciclo cellulare ad azione mitogena, quali le cicline D1, D3 ed E. Nonostante la loro sovra-espressione possa svolgere un ruolo importante nella promozione della replicazione cellulare, restano del tutto ignote le alterazioni molecolari che le determinano nei tumori ipofisari aggressivi (Turner HE et al., 2000).

Oltre a porre l'attenzione sui fenomeni di arresto del ciclo cellulare, sono stati indagati i meccanismi apoptotici. In particolare si sono ricercate, invano, mutazioni a carico del gene per p53. Vi sono tuttavia dati concernenti una relativa sovra-espressione di p53 in adenomi ACTH-secernenti e NFPA che necessitano di ulteriori indagini (Buckley N et al., 1994).

Nelle neoplasie ipofisarie è stato inoltre descritto il Pituitary Tumor Transforming Gene (PTTG1), una sequenza genica estrogeno-inducibile con alto potere trasformante, scoperta per la prima volta in cellule ipofisarie di ratto GH4 (Pei L & Melmed S, 1997). PTTG è un membro della famiglia delle securine coinvolto nei processi di mitosi e della stabilità genomica, la cui aumentata sintesi comporta la presenza di aneuploidie frequentemente osservata in cellule di adenoma ipofisario, e sembra correlare con l'aggressività del fenotipo tumorale. PTTG è in grado infatti di stimolare la produzione di bFGF2 e quindi indurre angiogenesi. La sovra-espressione di fattori di crescita ad azione mitogenica e angiogenica può dunque rappresentare un fattore di promozione della crescita tumorale.

Anche le alterazioni neurosecretorie potrebbero essere alla base della patologia ipofisaria, in quanto determinerebbero un ridotto apporto di fattori ad azione inibitoria (dopamina e somatostatina) o a un eccesso di fattori ad azione stimolatoria quali il GHRH (GH-Releasing Hormone Receptor) e il CRH (ACTH-Releasing Hormone). A favore di questo modello, vi è il riscontro di acromegalia e malattia di Cushing in soggetti con sindromi da produzione ectopica di GHRH e CRH (Asa SL, 1991). Analogamente, il topo transgenico per il GHRH sviluppa in breve tempo iperplasia delle cellule somatotrope e successiva formazione di adenomi ipofisari GH-secernenti (Asa SL et al., 1992). Anche la condizione di ipotiroidismo primario, se non trattata, è associata allo sviluppo di iperplasia ipofisaria e/o alla transizione neoplastica, probabilmente a causa della stimolazione compensatoria mediata dal TRH.

Infine, rientrano nel quadro patogenetico degli adenomi ipofisari, le alterazioni nei meccanismi di feedback ormonale periferico nei confronti delle tropine ipofisarie. Ad esempio, sono state indagate possibili alterazioni nei recettori coinvolti nel feed-back negativo dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide. In alcuni adenomi TSH-secernenti sono state identificate mutazioni nei geni che codificano per le isoforme  $\alpha$  e  $\beta$  del recettore per l'ormone tiroideo, che lo rendono incapace di legare l'ormone e quindi di attivare il feed-back negativo (Ando S et al., 2001).

## 1.4 ADENOMI NON SECERNENTI (NFPA)

Gli adenomi non secernenti o non funzionanti (Non Functionary Pituitary Adenomas o NFPA) sono un gruppo eterogeneo di tumori e rappresentano il più frequente tipo di adenoma ipofisario (circa il 25%) (Katznelson et al, 1993). La definizione è essenzialmente clinica ed indica l'assenza di segni e sintomi secondari ad una iperproduzione ormonale.

Questi tumori non secernono nessun ormone biologicamente attivo, e questo può causare una diagnosi ritardata rispetto agli adenomi funzionanti. I pazienti infatti presentano spesso un macroadenoma (96,5%) (Ferrante et al., 2006) le cui manifestazioni cliniche sono ascrivibili all'effetto massa sulle zone circostanti.

Sebbene mostrino una presentazione clinica simile, gli NFPA sono un gruppo eterogeneo di tumori che comprende vari sottotipi: adenomi null-cell, oncocitomi, adenomi corticotropi, somatotropi e tireotropi silenti e adenomi secernenti gonadotropine (Black PM et al., 1987; Kovacs K et al., 1996; Snyder PJ et al., 1993). Infatti sebbene in precedenza sia stato detto che gli NFPA non secernono ormoni, con l'uso di tecniche più sensibili è stato dimostrato che una buona parte di tumori, che in alcune casistiche può arrivare al 35,4% (Turner HE, 1999) siano in grado di secernere gonadotropine, anche se la loro secrezione rimane inefficiente. Inoltre la presenza degli ormoni luteinizzante (LH) e follicolo stimolante (FSH) è dimostrata anche tramite saggi di immunoistochimica; infatti l'incidenza di queste tropine è di gran lunga maggiore (19-73,3%) rispetto agli altri ormoni dell'ipofisi anteriore (Babu A et al., 2013). Questi dati sono in linea con l'ipotesi di una derivazione gonadotropica per la maggior parte degli NFPA.

### 1.4.1 EPIDEMIOLOGIA

La prevalenza stimata degli NFPA nella popolazione generale in uno studio fatto in Lombardia è 50-60 casi l'anno; mentre l'incidenza è 4-5casi per milione l'anno (Ambrosi B, et al, 1991 ).In uno studio autoptico è stato messo in evidenza come gli NFPA rappresentino il 39% di tutti gli adenomi ipofisari. (Buurman H et al., 2006). L'età di presentazione è tra 50-55 anni con una leggera prevalenza nella popolazione maschile (56,7%) (Greenman Y & Stern N, 2009).

### 1.4.2 CARATTERISTICHE CLINICHE

I sintomi che più spesso rappresentano l'esordio di un NFPA sono cefalea, deficit del campo visivo e ipogonadismo (Ferrante E et al., 2006).

Le cefalee si manifestano per la compressione delle terminazioni dolorifiche, infatti qualsiasi massa nella regione parasellare può provocare cefalea. Inoltre gli adenomi con estensione parasellare possono arrivare a comprimere il parenchima cerebrale adiacente, in particolare i lobi frontali e

temporali. L'interessamento del lobo frontale può determinare modificazioni della personalità, perdita di memoria, abulia; la compressione invece del lobo temporale può essere responsabile di crisi comiziali.

I disturbi visivi si manifestano soprattutto come emianopsia bitemporale e sono dovuti alla compressione del chiasma ottico che causa calo del visus e riduzione del campo visivo. I difetti visivi sono presenti in circa il 50% dei pazienti (Greenman Y, Stern N, 2009). L'ipogonadismo è legato all'ipopituitarismo che può essere causato da un'alterazione dell'ipofisi stessa, dovuta sempre a compressione. L'ipopituitarismo oltre all'ipogonadismo può causare altri segni tra cui: ipotiroidismo, ipoadrenalismo che si manifesta con facile stancabilità ed ipotensione ortostatica, calo della libido, infertilità, anomalie della secrezione del GH e della prolattina e raramente diabete insipido. Ci può essere inoltre una compressione della ghiandola ipotalamica con conseguente alterazione di numerose funzioni fisiologiche dell'organismo e di disordini neurologici.

Infine può avvenire una paralisi dei nervi cranici (III, IV, V1, V2, VI) causata da compressione sul seno cavernoso con paralisi, parziale o completa, dei muscoli oculari estrinseci.

Vi è una quota (9%) di tumori che non presenta sintomi e segni specifici e viene infatti scoperta incidentalmente grazie ad esami radiologici (Nomikos P et al. 2004.)

#### 1.4.3 DIAGNOSI

L'assenza di ipersecrezione da parte di un adenoma conferma la diagnosi di NFPA. La risonanza magnetica (RM) va praticata nei pazienti con sospetto NFPA per valutare nel dettaglio le dimensioni del tumore e quali zone circostanti possano essere state interessate dall'espansione tumorale. È noto che una buona parte dei macroadenomi tende ad aumentare di dimensione in un periodo tra i 6-8 anni (Lleva RR & Inzucchi SE, 2011). Solo una piccola parte di microadenomi invece tende a crescere.

#### 1.4.4 TERAPIA

Il trattamento d'elezione per gli NFPA è la neurochirurgia, in particolare l'asportazione per via transfenoidale, la cui mortalità peri-operativa è di circa 0,8% (Losa M et al., 2008). È raccomandata la chirurgia per tutti quei tumori più grandi di 2cm, per una maggiore propensione alla crescita (Greenman Y et al, 2009). Proprio per le loro grandi dimensioni e per la loro capacità di invadere il seno, la terapia chirurgica può essere però inefficace, in quanto risulta difficile la completa asportazione della massa tumorale. I margini tumorali non asportati possono causare una recidiva e l'insorgenza di quest'ultima correla con la giovane età e l'invasione del seno. In questo contesto, l'uso della radioterapia post-operativa è ancora controverso. Non ci sono delle linee guida specifiche

in merito, soprattutto a causa degli effetti collaterali dovuti al suo impiego e all'assenza di studi a lungo termine sulle nuove tecniche radioterapiche.

Il Ki67 è un indice utilizzato in immunistochemica come marker nucleare delle cellule proliferanti, se maggiore del 3%, il tumore può essere considerato aggressivo, anche se ad oggi non è stato ancora dimostrato essere correlato con l'insorgenza di recidive. Inoltre è negativamente correlato con l'età nei pazienti con NFPA (Losa M et al., 2000; Yonezawa K et al., 1997).

Per quanto concerne la terapia medica, l'uso dei dopamino agonisti potrebbe avere un razionale, in quanto è stata dimostrata l'espressione del recettore di tipo 2 della dopamina negli NFPA (Renner U et al, 1998; Bevan JS & Burke CW, 1986; Hedner P & Valdermasson S, 1989; Ferone D et al., 1998). Esperimenti in vitro hanno dimostrato come questi farmaci siano in grado di ridurre la proliferazione cellulare e di indurre apoptosi in culture di NFPA (Colao A et al., 2008; Peverelli et al., 2010;). Inoltre esistono molti dati sull'utilizzo della dopamina in clinica (Andersen M et al., 2001; Greenman Y et al, 2005; Pivonello R et al., 2004; Grossman A et al., 1985; Pullan PT et al., 1985; Klibanski A et al., 1988; Van Tol HHM et al., 1992; Nobles FR et al., 2000; Greenman Y et al., 2005) molti dei quali contrastanti. Ciò che si può evincere è che in circa il 25% dei casi si ha una riduzione della massa (reviewed in Colao A et al., 2008). Quindi nel complesso i dati raccolti non mostrano una inoppugnabile evidenza, anche per la mancanza di uno studio randomizzato placebo-controllo, limitandone di fatto l'utilizzo nella pratica clinica.

## 2. RECETTORE DELLA DOPAMINA DI TIPO 2 (DRD2)

### 2.1 STRUTTURA

I recettori della dopamina sono stati messi in luce come i principali regolatori coinvolti nel controllo negativo della secrezione ormonale degli adenomi ipofisari (Ben-Jonathan N & Hnasko R 2001; Guillemin R, 2005). I recettori dopaminergici (DR) appartengono alla famiglia dei recettori a 7 domini transmembrana, GPCR (G protein coupled receptor) e agiscono principalmente attraverso la modulazione dell'adenilato ciclasi. Ad oggi sono noti 5 differenti DR suddivisi in due sottofamiglie: i recettori simili al D1, D1-like, (DRD1 e DRD5) sono in grado di attivare l'adenilato ciclasi; invece i recettori simili al D2, D2-like, (DRD2;DRD3;DRD4) inibiscono l'adenilato ciclasi legando proteine  $G_i/G_o$  (Missale C et al., 1998). Questi recettori sono codificati da geni diversi localizzati su cromosomi differenti, ma mostrano comunque una notevole omologia. La regione N-terminale ha un numero simile di residui amminoacidici in tutti i tipi recettoriali; quella C-terminale invece è leggermente diversa da recettore a recettore ma in tutti contiene un residuo di cisteina coinvolto nell'ancoraggio della coda citoplasmatica alla membrana cellulare. Tutti i recettori

posseggono due cisteine del terzo loop extracellulare, le quali probabilmente attraverso un ponte disolfuro sono in grado di stabilizzare il recettore. Il terzo loop intracellulare invece è responsabile del legame con le proteine G. Il DRD1 ha un terzo loop intracellulare molto corto, tipico del legame con proteine G stimolatorie; invece il DRD2 ha un terzo loop molto lungo, tipico dei recettori che legano proteine G inibitorie (Pivonello R et al., 2007). I domini transmembrana idrofobici permettono il legame con la dopamina e i suoi agonisti e antagonisti (Missale C et al., 1998). Il recettore D2 ha due varianti generate da uno splicing alternativo, un'isoforma lunga detta D2<sub>L</sub> ed una corta detta D2<sub>S</sub>. Le due isoforme recettoriali differiscono per 29 amminoacidi localizzati nel terzo loop intracellulare (Vallone D et al., 2000). Come detto precedentemente, questo loop è molto importante per il signalling, suggerendo che i due recettori abbiano caratteristiche funzionali diverse e che possano attivare pathways differenti (Senogles SE et al., 2004).

Anche il recettore D3 va incontro a splicing alternativo, con la produzione di una proteina non funzionante (Pivonello R et al., 2007). Il recettore D4 ha delle varianti polimorfiche che consistono nella ripetizione di 48pb 4, 7 o 11 volte.

## 2.2 ESPRESSIONE NELL'IPOFISI

I recettori della dopamina sono espressi in molte aree del sistema nervoso centrale. Sono espressi anche nell'ipofisi, dove mediano gli effetti della dopamina sulla sintesi e sulla secrezione ormonale (Missale C et al., 1998), infatti sono principalmente espressi nel lobo anteriore. Il recettore più espresso è quello di tipo 2 (Missale C et al., 1998), ed è presente principalmente nelle cellule lattotrope (Lamberts SWJ et al., 1990), anche se è stato dimostrato che più del 75% delle cellule presentino il recettore D2 (Pivonello R et al., 2007). Questo suggerisce che sia espresso anche nelle popolazioni cellulari non lattotrope (Renner U et al., 1998) come era già stato dimostrato nel ratto (Cronin MJ et al., 1984; Foord SM et al., 1983; Goldsmith PC et al., 1979). Studi su animali hanno dimostrato che entrambe le isoforme del DRD2 sono espresse, sebbene l'isoforma lunga sia quella predominante (Meador-Woodruff JH et al., 1992). È stata inoltre rilevata la presenza del recettore D4, sebbene il suo ruolo fisiologico non sia ancora del tutto chiarito (Van Tol HHM et al., 1992). È importante notare come l'espressione dei DR, in particolar modo del recettore DRD2, venga mantenuta negli adenomi ipofisari, come nei GH-omi, PRL-omi e NFPA e ACTH-omi (Pivonello R et al., 2004).

## 2.3 TRASDUZIONE DEL SEGNALE

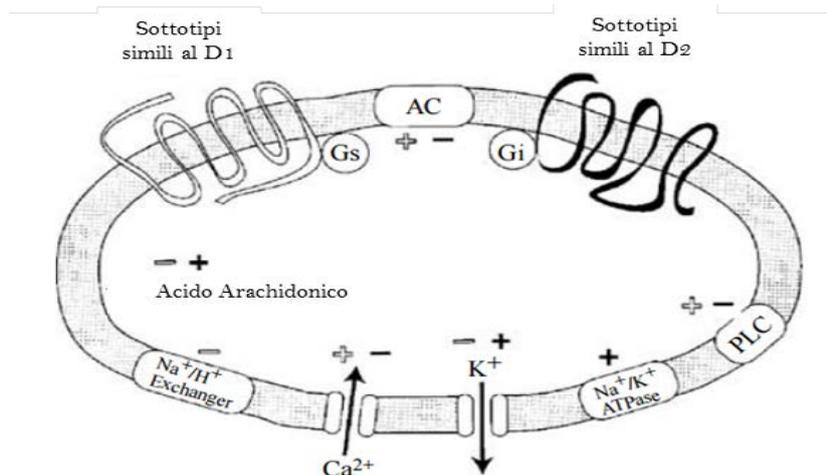
Il principale ruolo del DRD2 è quello di inibire la sintesi e la secrezione ormonale e la proliferazione cellulare (Lamberts SWJ et al., 1995; Peverelli E et al., 2010).

Il DRD2 media questi effetti attraverso vari meccanismi di trasduzione del segnale. Il principale è la modulazione dell'adenilato ciclastasi attraverso l'attivazione di proteine G stimolatorie ( $G_{s\alpha}$ ) (DRD1 e DRD5) o inibitorie  $G_{i\alpha}$  (DRD2, DRD3, DRD4). Le proteine G sono eterotrimeri costituite da tre diverse subunità,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , la cui specificità funzionale dipende dalla subunità  $\alpha$ . Essa contiene i siti di legame ad alta affinità per i nucleotidi guanosinici (GTP e GDP) ed ha attività GTPasica intrinseca. Quando inattiva è legata al GDP ed associata al dimero  $\beta\gamma$ . L'interazione del recettore col suo ligando induce una modificazione conformazionale della subunità  $\alpha$ , che si dissocia dal GDP per legarsi al GTP, liberandosi dal dimero  $\beta\gamma$  ed attivando il sistema di trasduzione del segnale. Molto rapidamente interviene l'attività GTPasica intrinseca per cui il GTP viene idrolizzato a GDP con conseguente spegnimento del sistema di signalling. Questo si traduce con un accumulo o con una riduzione del cAMP (Cyclic AMP) intracellulare (Missale et al., 1998) con conseguente attivazione o inibizione della protein chinasi A (PKA). La PKA attraverso fosforilazioni e defosforilazioni regola le funzioni di svariate proteine e fattori trascrizionale, canali ionici e GPCR (Vallone D et al., 2000).

I DR sono in grado di modulare l'attività della fosfolipasi C, il rilascio dell'acido arachidonico e l'attività dei canali al calcio e dei canali al potassio. Inoltre sembrano essere coinvolti nella regolazione dello scambiatore Na/H e Na-K ATPase (Missale C et al., 1998).

Recentemente è stato osservato che il DRD2s è in grado di attivare la Fosfolipasi D (PLD) attraverso il legame con Rho, proteina della famiglia delle piccole proteine G (Senogles SE et., 2000). La PLD catalizza l'idrolisi della fosfatidilcolina ad acido fosfatidico e colina. L'acido fosfatidico e il suo prodotto defosforilato, il diacilglicerolo, sono coinvolti in molti processi cellulari tra cui metabolismo, crescita cellulare e differenziamento. (Senogles SE, 2003). È stato dimostrato che entrambe le isoforme del recettore D2 siano in grado di inibire la proliferazione e indurre apoptosi attraverso l'attivazione del pathway MAPK (mitogen-activated protein kinase)/ ERK (Extracellular signal-regulated kinase) (Kanasaki H et al., 2000; An JJ et al., 2003). Un riassunto schematico del pathway dei DR è fornito in figura 3 (modificata da Pivonello R et al., 2007).

I DR come quasi tutti i GPCR, vanno incontro a desensitizzazione, fenomeno studiato in particolare nel DRD2. La sua regolazione sembra essere regolata dalle concentrazioni di agonista, antagonista e tipo cellulare. Recenti studi hanno dimostrato che, oltre alla fosforilazione mediata dalle GRK (G-protein-coupled receptor kinases), anche la PKC è in grado di fosforilare il DRD2 e di mediarne l'internalizzazione clatrina dipendente e il riciclo, attraverso la fosforilazione del terzo loop intracellulare (Namkung Y & Sibley DR, 2004). È stato osservato che i recettori della dopamina possono formare sia omodimeri che eterodimeri con caratteristiche funzionali differenti dai singoli recettori (Lee SP et al., 2003).



**Figura2.** Schema dei principali meccanismi di traduzione del segnale associati all'attivazione dei recettori della dopamina. Presa da Pivonello R et al., 2007.

## 2.4 PROFILO FARMACOLOGICO

Tra i farmaci maggiormente utilizzati nella pratica clinica per gli adenomi ipofisari vi sono i dopamino agonisti, che legano i recettori con diversa efficienza. La dopamina è in grado di legare tutti e 5 i recettori, ma mostra una minore affinità per il DRD1 e DRD2. La Bromocriptina, uno dei principali agonisti della dopamina, attiva preferenzialmente i recettori della famiglia D2-like, tuttavia è in grado di legare anche quelli della famiglia D1-like, ma con minor affinità. Al contrario l'antagonista della dopamina, Sulpiride, lega esclusivamente i recettori della famiglia D2-like (DRD2, DRD3, DRD4) (Pivonello R et al., 2007). La Cabergolina, altro dopaminergico ampiamente utilizzato, si lega ad entrambi i tipi di recettori con una maggior affinità per il DRD2 risultando il farmaco più potente nell'attivazione del recettore stesso.

## 3.MIGRAZIONE E INVASIONE CELLULARE

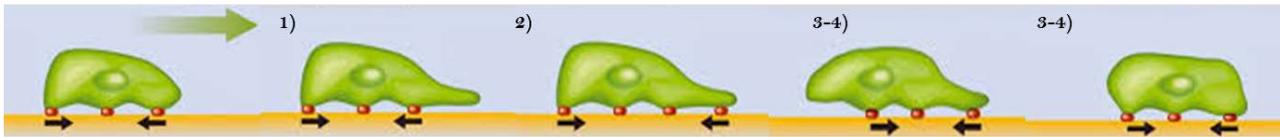
### 3.1 ASPETTI GENERALI

La migrazione cellulare è un evento essenziale per molti processi fisiologici, come la morfogenesi embrionale, l'immuno sorveglianza, la riparazione e la rigenerazione tissutale (Yamaguchi H et al., 2006). La migrazione cellulare risulta cruciale anche in contesti patologici, è infatti utilizzata dalle cellule tumorali al fine di invadere i tessuti circostanti.

L'invasione è una crescita che risulta in una infiltrazione, incorporazione o distruzione dei tessuti adiacenti. L'invasività è spesso, ma non sempre, sinonimo di malignità.

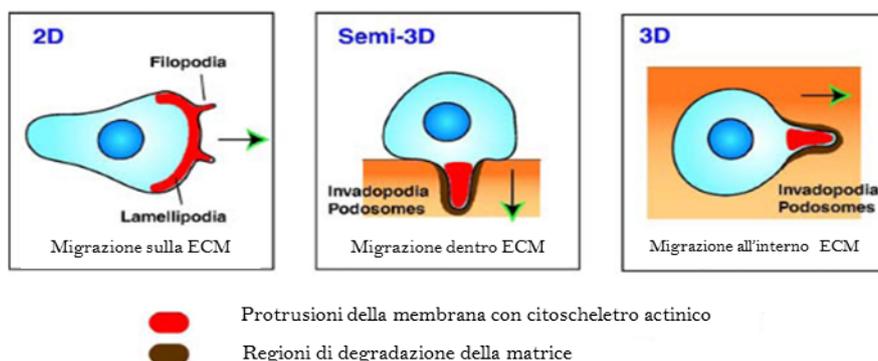
L'invasione richiede diversi step tra cui adesione cellulare, proteolisi dei componenti della matrice extracellulare (ECM) e migrazione. Per muoversi all'interno dei tessuti le cellule tumorali utilizzano gli stessi meccanismi di migrazione delle cellule normali durante i processi fisiologici.

Per migrare la cellula deve modificare la sua forma per interagire con le strutture dei tessuti circostanti.



**Figura3:** Migrazione cellulare: 1) protrusione al leading edge: la cellula si polarizza e si allunga; 2) interazione con la matrice extracellulare; 3-4) il leading edge o tutto il corpo cellulare si contrae, in modo tale da generare una forza di trazione in grado di spostare tutta la cellula.

La polarizzazione (una chiara distinzione tra il fronte della cellula e la parte posteriore) avviene grazie al rimodellamento del citoscheletro, si ha un cambiamento nella distribuzione dei filamenti di F-actina, che si distribuiscono sul fronte migratorio della cellula, denominato leading edge. Questa ridistribuzione comporta una polimerizzazione locale di nuovi filamenti, attraverso un aumento di nuovi siti di polimerizzazione, e un aumento di monomeri di G-actina. Questo è permesso dal coinvolgimento di un complesso macchinario costituito da proteine adattatrici e fattori che depolimerizzano l'actina (ADF)/cofilina. Questi ultimi, tagliando l'actina, permettono di creare le free barbed ends, dalle quali inizierà l'accrescimento dei nuovi filamenti al leading edge, che spingeranno in avanti la membrana plasmatica. Inoltre grazie alla loro attività depolimerizzante, generano monomeri di G-actina, indispensabili per la formazione dei filamenti stessi (Yamaguchi H et al, 2006). La formazione di nuovi siti di nucleazione dell'actina e la crescita di nuovi filamenti, con una precisa inclinazione di  $70^\circ$  sui filamenti già esistenti, è permessa dal complesso Arp2/3. Inoltre l'entrata in gioco di altre proteine adattatrici, tra le più note WASP (Wiscott-Aldrich syndrome protein) e WAVE, consentono la formazione di un network actinico che garantisce la formazione di protrusioni della membrana cellulare (Rohatgi R et al, 1999). Queste strutture hanno caratteristiche morfologiche, strutturali e funzionali diverse e si possono dividere in filopodi, lamellipodi e invadopodi (Fig. 5, modificata da Yamaguchi H et al., 2006).

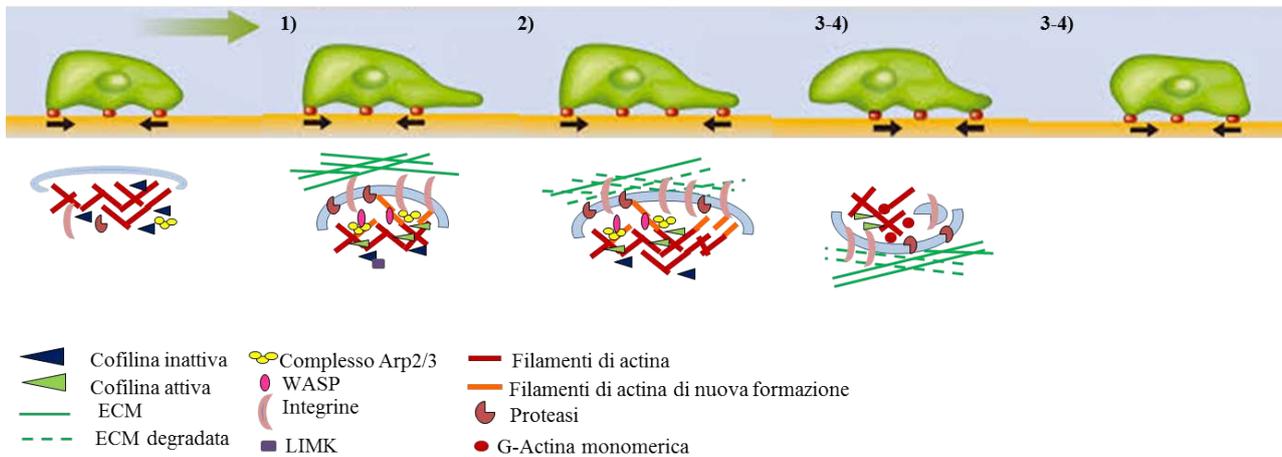


**Figura 5.** Differenti protrusioni cellulari. Le cellule che migrano in un substrato 2D, formano delle protrusioni al leading edge chiamate lamellipodi e filopodi. Le cellule che entrano e migrano in ECM (3D), come le cellule tumorali, necessitano di protrusioni che invadano il fronte, come invadopodi e posodomi in grado di distruggere le proteine dell'ECM (immagine presa da Yamaguchi H & Condeelis J, 2006).

Successivamente si ha la formazione delle adesioni focali grazie a proteine quali le integrine, che permettono alla cellula di interagire con la matrice extracellulare (Zamir E & Geiger B, 2001). La formazione delle adesioni focali è direttamente o indirettamente coordinata da diversi pathway come PI3K (fosfatidil-inositolo 3chinasi), protein chinasi C (PKC), cdc42 e RHO GTPase (Hynes RO, 2002; Schwartz M A & Shattil S J, 2000; Degani S et al, 2002; DeMali KA et al., 2002). L'entrata in gioco delle integrine e di altri recettori di adesione porta al reclutamento di proteasi di superficie o solubili (come le metallo proteasi, MMP), in grado di degradare componenti della ECM (Friedl P & Wolf K, 2003). È stato osservato che questo tipo di enzimi sono spesso up-regolati nei tumori (Sameni M, et al., 2001; Rosenthal EL et al, 1999; Koblinski JE et al, 2000; Hofmann UB et al, 2000), in quanto una maggior attività degradativa favorisce una maggiore invasione e infiltrazione nei tessuti sottostanti. Infine la cellula avanza grazie alla miosina II, che legando l'actina genera una contrazione (actomiosinica) (Cramer LP, 1999; Katoh K et al., 2001). La miosina II è fosforilata e attivata dalla chinasi delle catene leggere  $Ca^{++}$ -Calmodulina dipendente (MLCK) (Campbell KP, Stull JT, 2003), viene invece defosforilata e quindi inattivata, dalla fosfatasi delle catene leggere (MLCptase). Anche Rho è in grado di regolare la contrazione actomiosinica grazie al suo effettore ROCK (Fukata Y et al, 2001). È stato dimostrato che MLCK regola la miosina nel network corticale actinico situato nel foglietto interno della membrana plasmatica, ROCK invece la regola nella parte più interna della cellula (Totsukawa G et al, 1999; Campbell KP, Stull JT, 2003; Somlyo AV et al, 2003) suggerendo che la cellula sia in grado di regolare in modo diverso la contrazione al leading edge e quella all'interno della cellula. La contrazione genera una forza in grado di far staccare la parte posteriore della cellula, mentre il leading edge rimane ancora ancorato all'ECM e questo distacco avviene attraverso diversi meccanismi. In primo luogo si ha il rimodellamento del citoscheletro, nella parte posteriore della cellula, e il disassemblamento delle adesioni focali grazie a proteasi che tagliano i componenti delle adesioni stesse. Inseguito le integrine si staccano dai loro substrati e vengono internalizzate in vescicole endocitotiche per un possibile recycling al leading edge. Tutto questo partecipa al lento spostamento del corpo cellulare (Regen CM & Horwitz AF, 1992; Smilenov LB et al, 1999) come mostrato in figura 4 e 6.

Il macchinario migratorio delle cellule normali è mantenuto in quelli tumorali e svariati fattori ambientali possono stimolare il movimento, come ad esempio uno squilibrio nei segnali permette

loro di migrare incessantemente, favorendone quindi l'invasione e l'espansione oltre i confini tissutali, generando metastasi.



**Figura6.** Modello schematico di lamellipodio e/o invadopodio. La cellula inizia a polarizzarsi, andando a tagliare l'actina per creare free barbed ends dalle quali saranno assemblati i nuovi filamenti di actina. ARP2/3 e WAVE, WASP collaborano per formare nuovi filamenti di actina e iniziare la formazione del lamellipodio (1). Nella fase di adesione le integrine, insieme alle proteasi, sono in grado di degradare la matrice extracellulare (2). Infine la parte posteriore del corpo cellulare si stacca, grazie alla contrazione generata dalla miosina, favorita da un nuovo taglio selettivo dell'actina; le integrine vengono internalizzate e la cellula è in grado di spostarsi.

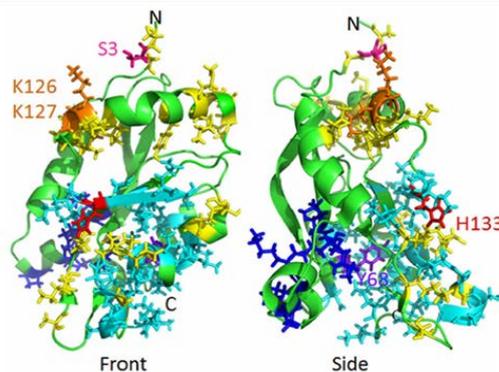
### 3.2 COFILINA

Come è stato detto in precedenza il citoscheletro actinico svolge un ruolo cruciale nella migrazione cellulare, quindi è molto importante comprendere i meccanismi alla base del suo rimodellamento. Tra le proteine chiave che regolano la dinamica e la riorganizzazione dell'actina c'è la cofilina. La cofilina appartiene alla famiglia ADF/cofilin delle actin binding protein. Queste proteine sono espresse in tutti gli eucarioti e ne esistono tre forme nei mammiferi: ADF (o destrina) e cofilina1, espresse in modo ubiquitario e la cofilina2, espressa nelle cellule muscolari. La proteina più studiata e importante è la cofilina1 in quanto è ubiquitaria ed il suo knockout è letale durante lo sviluppo embrionale dei topi (Gurniak CB et al., 2005). Una delle funzioni principali della cofilina1, che viene normalmente denominata solo cofilina, è l'assemblamento e/o disassemblamento dell'actina. La cofilina lega infatti sia l'actina, monomerica globulare, sia i filamenti di actina. Preferenzialmente lega i filamenti "vecchi" di actina, determinandone il taglio e la depolimerizzazione. Questo ovviamente aumenta la concentrazione di G-actina monomerica, favorendo la polimerizzazione di nuovi filamenti, quindi, la cofilina è in grado di aumentare il rate di turn-over dei filamenti di actina nelle cellule (Hotulainen P et al., 2005; Kiuchi T et al., 2011). Questo fenomeno sembra dipendere dalle concentrazioni di cofilina rispetto a quelle dell'actina. Infatti studi in vitro hanno dimostrato che se il rapporto actina/cofilina è basso, si avranno molti filamenti tagliati; se il rapporto è alto la cofilina taglia in modo rapido l'actina e la stabilizza in una

forma a doppia elica. Se il rapporto è eccessivamente alto, la cofilina è in grado di generare nuovi siti di nucleazione sull'actina (Andrianantoandro E & Pollard TD, 2006). La presenza di molte altre actin binding proteins possono smorzare o annullare questo comportamento.

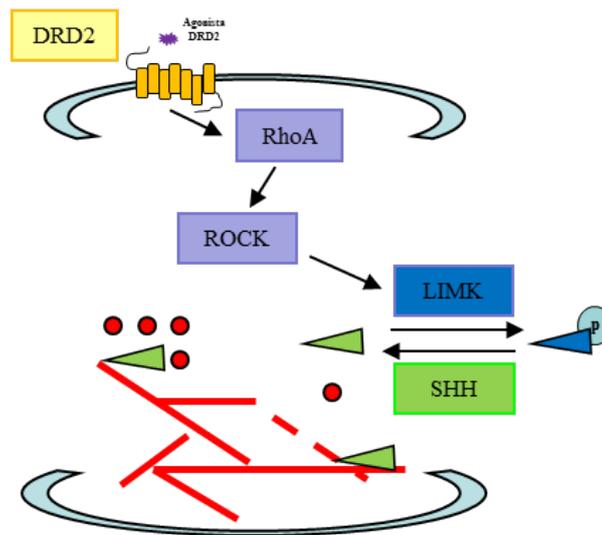
La cofilina ha due rilevanti funzioni biologiche che non coinvolgono il rimodellamento actinico. La prima è quella di traslocare l'actina nel nucleo. È noto infatti che l'actina abbia un ruolo nel rimodellamento della cromatina (Pederson T, 2008; Zheng B et al., 2009), ma essendo priva di sequenza target nucleare deve esservi trasportata. La seconda è quella di traslocare nei mitocondri dopo induzione dell'apoptosi. Infatti la presenza della cofilina nei mitocondri sembra essenziale per la permeabilità della membrana mitocondriale con conseguente rilascio del citocromo c. L'actina non partecipa all'induzione dell'apoptosi da parte della cofilina, ma mutazioni nell'actin binding domain della cofilina sono in grado di abolire questa sua capacità (Chua BT et al, 2003). La cofilina può essere considerata un mediatore dello stress ossidativo, infatti è stato dimostrato che in vitro è in grado di dimerizzare con il glutatatione ossidato. Quando ossidata la cofilina non è più in grado di legare o depolimerizzare l'actina, quindi si ha un aumento di F-actina (Pfannstiel J et al, 2001).

L'attività della cofilina è regolata da differenti meccanismi. È inibita dalla fosforilazione su una serina in posizione 3 (Ser3), all'N-terminale (Agnew BJ et al., 1995); dal fosfatidil-inositolo 4-5 bisfosfato e dall'aumento del PH intracellulare, è stato infatti dimostrato che la cofilina sia in grado di percepire le variazioni di PH e questo grazie allo stesso residuo, H133, a cui si lega il fosfatidil-inositolo 4-5 bisfosfato (Frantz C et al., 2008) come illustrato in figura 7.



**Figura7.** Struttura cristallizzata della cofilina umana. Immagine presa da Bernstein B & Bamberg J, 2010.

La cofilina viene fosforilata sul residuo Ser3 ad opera di almeno due diverse chinasi, le LIM-chinasi, famiglia costituita da LIMK1 e LIMK2, attivate da due pathway leggermente diversi; la prima è target delle RHO GTPase attraverso il suo effettore PAK1, la seconda attraverso ROCK (Bernard O, 2006). La seconda chinasi è quella testicolare, TESK, ed entrambe inattivano la cofilina fosforilando la serina in posizione 3 (Yang N et al., 1998; Arber S et al., 1998; Toshima J et al, 2001). Esistono specifiche fosfatasi che defosforilano la cofilina come le Slingshot (SSH) e la cronofina (CIN).



**Figura8.** Schema esemplificativo del pathway di attivazione della cofilina.

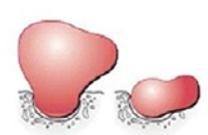
Come tutte le chinasi le LIM sono finemente regolate, vengono attivate mediante fosforilazione nel loro dominio chinamico, su un residuo amminoacidico conservato, la treonina, Thr-508 per LIMK1 e Thr-505 per LIMK2. La fosforilazione può avvenire ad opera di tre chinasi, ROCK (Maekawa M et al., 1999; Sumi T et al., 2001), PAK 1/2/4 (p21-activated protein kinase) (Edwards DC et al., 1999) e MRCK $\alpha$  (myotic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase $\alpha$ ) (Sumi T et., 2001). A loro volta queste proteine sono attivate dalla famiglia delle Rho small GTPase, in particolare RhoA attiva ROCK, Rac attiva PAK1/2 e Cdc42 attiva PAK1/2/4 (Takemura M et al. 2009). Sono invece inibite mediante legame con Par-3 (polarity protein), LATS-1 (tumor suppressor) e la beta arrestina (Ding Y et al., 2008).

Le SSH sono una famiglia di fosfatasi composte da SSH1, SSH2 e SSH3 e da loro varie isoforme originate da vari splicing alternativi. Tutte e tre defosforilano e quindi attivano la cofilina, ma la loro attività e distribuzione subcellulare differisce leggermente (Niwa R et al., 2002; Otha Y et al., 2003). È stato dimostrato che LIMK1 è richiesta per la migrazione cellulare, in particolar modo per la formazione dei lamellipodi; questo può sembrare contraddittorio, in quanto LIMK1 inibisce l'attività di cofilina, ma essendo il rimodellamento actinico un processo estremamente dinamico, probabilmente LIMK1 è necessaria per stabilizzare i filamenti di F-actina e proteggerli dalla degradazione operata dalla cofilina. È stato osservato che SSH1 è necessaria per direzionare correttamente la migrazione cellulare, facendo crescere i lamellipodi in un'unica direzione (Eisler T et al., 2009). È interessante sottolineare che il pathway RhoA/ROCK/LIMK può essere regolato dal DRD2, come dimostrato in neuroni striatali (Deyts et al., 2009) suggerendo che il DRD2 possa essere in grado di modulare i livelli di cofilina fosforilata.

La deregolazione di cofilina e del suo pathway è stata associata con un'aumentata capacità metastatica (Wang W et al., 2006); inoltre è stato ipotizzato un suo coinvolgimento nell'infezione del virus dell'HIV-1e nei tumori ad esso associati (Stolp B et al., 2009; Yoder A et al., 2008) e nella Sindrome di Carney, il più comune tumore cardiaco, dove si ha un'iperfosforilazione della cofilina (Nadella KS et al., 2009).

### 3.3 INVASIVITA' DEGLI NFPA: MECCANISMI MOLECOLARI

La natura invasiva dei tumori ipofisari è stata ampiamente descritta da Jefferson nel 1940, che nel suo trattato scrisse che ogni ampliamento dell'ipofisi risultava in uno sconfinamento nei tessuti circostanti, causando una compressione sulle zone limitrofe. L'ampliamento può andare in tutte le direzioni, verso il basso nel seno sfenoidale, verso l'esterno o l'interno nel seno cavernoso, verso l'alto nella camera cranica e quindi con un'ulteriore proliferazione arrivare sino davanti al chiasma nella fossa anteriore, dietro nel terzo ventricolo, all'ipotalamo, o sotto lateralmente, nella fossa centrale. L'invasione, e in particolar modo l'invasione del seno, è associata ad un outcome chirurgico più sfavorevole, infatti la completa rimozione della massa risulta più complessa. Ovviamente i tumori più grandi ed invasivi sono associati ad un maggior grado di persistenza/ricorrenza, che varia da casistica a casistica, passando dal 19% dei casi (Losa M et al., 2008) fino al 49% (Dekkers OM. et al, 2008; Roelfsema F et al, 2012). Questo range così ampio è sicuramente dovuto anche alla capacità del chirurgo nell'asportare in modo totale la massa. È stato infatti osservato che il rate di ricrescita tumorale quando l'asportazione della massa è completa è solo del 7%, comparato al 40% di pazienti nei quali erano rimasti dei residui; il rate è leggermente più elevato in presenza di un residuo extrasellare rispetto ad uno intrasellare (Reddy R et al, 2011). Infatti anche secondo la classificazione di Hardy i tumori extrasellari sono i più invasivi.

Classificazione Radiologica Sella Turcica	Estensione Extrasellare				
	Soprasellare			Parasellare	
Grado 0 (normale)	A	B	C	D	E
Grado I					
Grado II					
Grado III	Simmetrica			Asimmetrica	
Grado IV	Simmetrica			Asimmetrica	

**Figura3.** Classificazione di Hardy. Tumori di grado I e II rimangono all'interno della sella; quelli di grado III e IV sono invasivi. Classificazione Extrasellare: A, B e C crescono direttamente sopra la sella. D ha una crescita asimmetrica ed E ha una crescita laterale verso il seno cavernoso. (Adattata da Onoz M et al, 2014, già riadattata da Hardy J & Sekman M, 1970)

L'incidenza dell'invasività degli NFPA varia tra 40% (Schitauer BW, 1986) e addirittura circa il 60% (Vargas G et al, 2015) in modo casistica dipendente. È stato osservato che ben l'85% dei casi mostrino segni di invasione microscopica della dura madre, con una chiara relazione tra l'invasione della dura madre e le dimensioni del tumore (Selman WR et al, 1986).

Altri autori però suggeriscono che l'infiltrazione della dura madre non è significativamente associata con la ricorrenza dopo chirurgia transfenoidale (Meij BP et al., 2002).

Esistono svariati criteri per determinare l'invasività di un tumore come il grado di cellule atipiche, l'attività proliferativa, valutata attraverso markers come Ki67 o molecole del ciclo cellulare quali p27 e galectina-3; l'espressione genica di p53 o le metallo proteasi della matrice (MMP) (Mohammed AA et al., 2015; Monsalves E et al., 2014; Righi A et al., 2013). La classificazione WHO (World Health Organization) dei tumori endocrini indica che sono indice di un comportamento aggressivo l'invasione delle strutture circostanti, un elevato indice mitotico (Ki67 maggiore di tre) e un overespressione di p53 (Roncaroli F & Scheithauer BW, 2007). Sebbene in altri studi sia stato osservato che solo il 15% degli adenomi invasivi e lo 0% di quelli non invasivi overesprima p53 (Gejman R et al., 2008; Zada G et al., 2011).

In letteratura sono presenti pochi lavori in cui sono stati indagati i meccanismi molecolari alla base dell'invasione. Yoshida et al. hanno indagato la relazione tra la vascolarizzazione tissutale e l'invasione, dimostrando che in condizioni di ipossia (ossigeno 1%) c'è un aumentata capacità invasiva delle cellule HP75 in vitro. In un altro lavoro è stato osservato un aumento dei livelli di espressione e dell'attività della metallo proteasi 9 negli NFPA invasivi e nelle cellule HP75; questa overespressione sembra essere mediata dall'attivazione della PKC (proteina chinasi C). Inibendo l'attività della PKC è stata osservata infatti una riduzione nella migrazione di cellule HP75 nei saggi in vitro (Hussaini IM et al., 2007).

## 2. SCOPO DELLO STUDIO

Gli adenomi ipofisari non funzionanti sono tendenzialmente dei tumori benigni, ma a causa delle loro grosse dimensioni e del loro alto grado di invasività hanno un outcome peggiore e vanno incontro a frequenti recidive. Nonostante recenti studi abbiano indagato possibili fattori coinvolti nell'invasività degli NFPA, ad oggi i meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno sono in gran parte sconosciuti.

Sebbene la terapia farmacologica degli NFPA sia ancora materia di dibattito, l'utilizzo degli agonisti della dopamina sembra essere in grado di ridurre le dimensioni del tumore in una percentuale di pazienti con NFPA. È possibile quindi ipotizzare un ruolo del DRD2 nella regolazione della motilità di cellule di NFPA, ruolo suggerito anche da un recente studio, dove è stato dimostrato che il DRD2 inibisce la migrazione di cellule mesenchimali. Inoltre il DRD2 sembra essere in grado di regolare l'attività di una proteina chiave per il rimodellamento del citoscheletro alla base della migrazione cellulare, la cofilina.

Scopo dello studio è stato quello di indagare l'azione dei dopamino agonisti, in particolar modo dell'agonista selettivo del DRD2, BIM53097, sull'inibizione della migrazione cellulare in cellule di NFPA e nel modello cellulare HP75. La migrazione è stata valutata mediante saggi di Boyden chamber o Scratch assay in presenza o assenza di stimolo. Sono stati inoltre eseguiti saggi di invasione cellulare utilizzando membrane porose delle camere di Boyden ricoperte di collagene.

Inoltre è stato valutato se l'agonista del DRD2 fosse in grado di modulare i livelli di cofilina fosforilata e come questa proteina fosse coinvolta nei processi migratori delle cellule ipofisarie. Dopo aver osservato un aumento dei livelli di fosforilazione in seguito a stimolazione con BIM53097 è stato valutato se questo effetto fosse mediato dall'attivazione, da parte del DRD2, del pathway RHO/ROCK/LIMK tramite l'uso di inibitori specifici di ROCK. Per dimostrare un ruolo causale della cofilina nella migrazione di cellule di NFPA, sono stati utilizzati mutanti fosfomimetici e fosfodeficienti della proteina (S3D e S3A) valutando gli effetti della loro overespressione sulla migrazione in cellule HP75. Infine analisi di Western blot hanno mostrato maggiori livelli di cofilina fosforilata in NFPA non invasivi suggerendo che lo stato di fosforilazione della cofilina possa essere un marker del comportamento invasivo di questi tumori.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 PAZIENTI

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico Locale e ogni paziente ha fornito il proprio consenso informato. Lo studio è stato eseguito su campioni di NFPA rimossi da 28 pazienti mediante chirurgia transfenoidale (Tabella 1). La diagnosi di NFPA si è basata sulla presenza di lesioni sellari in assenza di ipersecrezione ormonale e confermata da analisi di immunistochemica. La risonanza magnetica (MRI) ha mostrato macroadenomi (diametro > 10mm) in tutti i pazienti, con estensione sovrasellare in 13 pazienti e invasione del seno cavernoso in 8 casi. In accordo con l'indice Ki67, 5 casi sono stati classificati come adenomi atipici con indice Ki67 maggiore o uguale a tre (Tabella1).

#	Genere (M/F)	Età alla diagnosi (Anni)	Invasione seno cavernoso	Estensione sovrasellare	Erosione del pavimento sellare	Diametro (mm)	Ki67 (%)
1	F	49	+	+	+	22X22	2
2	M	69	+	+	+	30X36	4-5
3	M	67	+	+	+	25X25	<1
4	F	62	+	+	+	32X25	<1
5	M	63	-	+	+	16X20	<1
6	F	58	-	-	+	18X11	<1
7	M	70	-	+	+	21X15	<1
8	F	30	-	-	-	11X11	6
9	M	72	+	+	+	32X27	2
10	M	78	+	+	+	28X26	<1
11	M	57	+	+	+	29X27	3
12	F	74	+	+	+	40X20	3
13	M	54	-	+	+	28X40	<1
14	M	30	-	+	+	26X16	<1
15	F	64	-	+	-	12X13	3
16	M	39	-	-	-	13X13	1

**Tabella1.** Caratteristiche cliniche, radiopatologiche e anatomopatologiche degli NFPA utilizzati per testare l'espressione di p-cofilina e cofilina in Western blot.

#### 3.2 COLTURE CELLULARI DI ADENOMA IPOFISARIO

I campioni di NFPA sono stati sottoposti a due digestioni consecutive: una meccanica ed una enzimatica. Inizialmente i tessuti sono stati sminuzzati con una lama da bisturi, cercando di allontanare il più possibile il contenuto di sangue, quindi sottoposti a una dissociazione enzimatica con collagenasi (2mg/ml; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) in DMEM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) per 2 ore in incubatore a 37°C. Per recuperare solo la componente cellulare digerita sono stati utilizzati filtri con pori da 100µm di diametro. Le cellule sono state piastrate e mantenute in coltura

con terreno completo costituito da DMEM, 10% FBS (fetal bovine serum), glutammina 2mM e 100 U/ml di penicillina e 100mg/ml di streptomina (Gibco, Invitrogen, Life Technologies Inc., Carlsband, CA).

### 3.3 COLTURE CELLULARI DI HP75

La linea cellulare utilizzata, HP75, è costituita da cellule umane adenoipofisarie tumorali non secernenti che crescono in adesione. E' stata mantenuta in un medium di coltura composto da DMEM supplementato con 15% HS (Horse serum) (Gibco, Life Technologies Inc., Carlsband, CA), 2.5%, FBS, glutammina 2 mM e 100 U/ml di penicillina e 100mg/ml di streptomina, a 37°C, in un'atmosfera umida al 5% di CO<sub>2</sub>. Ogni quattro giorni vengono staccate usando una soluzione di tripsina 0,05% e acido etilendiamminicotetracetico (EDTA) 0,02% in PBS (Euroclone) e subito risospese in terreno completo contenente FBS che ha la funzione di inattivare la tripsina. Sono poi piastrate a seconda dei protocolli di esperimento.

### 3.4 SAGGIO DI MIGRAZIONE TRANSWELL E INVASIONE (BOYDEN CHAMBER)

Le cellule sono state seminate ad una concentrazione di 300,000 cellule di NFPA per inserto e 50,000 cellule HP75, in terreno starvato, privo di siero, in presenza o assenza di concentrazioni crescenti di analogo della dopamina, BIM53097, nella parte superiore della camera di Boyden (Merck Millipore, Darmstad, Germany). Gli inserti presentano una membrana porosa in policarbonio (diametro dei pori 8µm) che permette il passaggio delle cellule nella parte sottostante, dove è presente un terreno arricchito con siero, che forma un gradiente chemiotattico verso il quale le cellule migreranno. Per eliminare le cellule migrate in modo casuale, per ogni esperimento è stato allestito un controllo negativo, in cui il terreno starvato viene messo sia nella parte alta che in quella bassa della camera, ed è stato sottratto a ciascuno degli altri valori. Dopo 6h di incubazione a 37°C, le cellule di NFPA che crescono in sospensione, vengono centrifugate e risospese in 120µl di Calceina AM (Genecopoeia, Rockville, MD) diluita in PBS (Phosphate Buffer Saline, Euroclone) e incubate a 37°C per 30 minuti. La fluorescenza emessa dalla Calceina è stata letta mediante un lettore di piastre ad un'eccitazione di 485nm ed un'emissione di 535nm. Gli esperimenti sulle cellule HP75 sono stati fatti dopo 18h di incubazione a 37°C. Le cellule non migrate nella parte alta della membrana porosa della camera di Boyden vengono eliminate meccanicamente con un cotton fioc; le cellule migrate invece rimangono attaccate nella parte inferiore della membrana e marcate con un colorante, Crystal Violet, per 10minuti. Successivamente gli inserti vengono lavati con abbondante acqua distillata e le cellule presenti estratte con 10% di acido acetico. L'estratto viene misurato mediante un lettore di piastre ad una lunghezza d'onda di 560nm.

Per studiare l'invasione cellulare, la membrana porosa della camera di Boyden è stata ricoperta con 0.25mg/ml di collagene di tipo IV (Sigma, Aldrich, St. Louis, MO). Le cellule sia di NFPA, che HP75 per passare nella parte sottostante della camera devono degradare il collagene. Le cellule migrate attraverso la membrana collagenata vengono poi quantificate come descritto sopra.

### 3.5 SAGGIO DI WOUND HEALING (SCRATCH ASSAY)

Le cellule HP75 sono state seminate ad una densità di 50000 cellule per pozzetto in una multi-well da 24 pozzetti. Con una punta sterile è stata fatta una croce (scratch) sul monolayer di cellule (Gebäck T et al., 2009), dopo alcuni lavaggi con PBS, le cellule sono incubate in terreno completo con o senza BIM53097 a diverse concentrazioni. Questo esperimento è stato eseguito pretrattando le cellule per 30 minuti con 2.5µM di dyhydrochloride ROCK inibitore e poi stimulate con BIM53097. Le immagini delle croci di ogni pozzetto vengono riprese a tempo zero, immediatamente dopo lo scratch, e dopo 18 di incubazione. Tutte le immagini sono state riprese con un obiettivo 5X (A-plan objective 5×/0.12, Zeiss Axiovert 200M microscope, Zeiss AxioCam MRm camera, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) e analizzate mediante un software in grado di analizzare l'area libera di ogni immagine (T Scratch software, Gebäck T et al., 2009).

### 3.6 ANALISI DI IMMUNOFLUORESCENZA

Cellule HP75 sono state seminate su vetrino ad una concentrazione di 50000 cellule/vetrino e poi fissate in paraformaldeide al 4% per 15 minuti. Il protocollo di immunofluorescenza prevede 1h di blocking a temperatura ambiente con 1X PBS, 5%FBS e 0.3% di triton X-100, incubazione con anticorpo primario diretto contro la forma fosforilata della cofilina (Ser3) o contro la cofilina (Cell Signalling, Danvers, MA, 1:100 or 1:200, rispettivamente, diluiti in 1X PBS, 0.5% BSA e 0.3% di triton X-100) a 4°C overnight, 2h di anticorpo secondario, AlexaFluor488 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Infine le cellule sono state marcate con un anticorpo diretto contro la falloidina per marcare l'actina, AlexaFluor555 (Invitrogen, Carlsbad, CA) per 15 minuti a temperatura ambiente. I vetrini sono stati montati utilizzando ProLong® Diamond antifade mountant with DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA) prima dell'analisi in fluorescenza. La microscopia confocale è stata condotta su un microscopio confocale laser scanning Fluo View FV1000; Olympus. I risultati illustrati sono immagini rappresentative di almeno 3 singoli esperimenti.

### 3.7 RACCOLTA CELLULE ESTRAZIONE PROTEICA

Le cellule vengono inizialmente piastrate (400,000 per pozzetto) in multiwell da 6 pozzetti. Dopo averle sottoposte a stimolo con BIM53097 per 10 minuti, o pretrattate con 2.5µM dyhydrochloride

ROCK inibitore, sono raccolte per estrarne le proteine: le multiwell vengono messe in ghiaccio e le cellule staccate con uno scraper. Successivamente vengono lisate e risospese in Cell Lysis Buffer (Euroclone) contenente inibitori delle proteasi e mantenute in ghiaccio per 10 minuti, quindi centrifugate a 13000rpm per 10 minuti a 4 °C. Il surnatante contenente le proteine da analizzare viene dosato mediante metodo BCA per l'analisi SDS-PAGE gel elettroforesi.

### 3.8 DOSAGGIO DELLE PROTEINE SECONDO METODO BCA

Il metodo BCA permette di calcolare la quantità proteica totale dei campioni da una curva di riferimento costruita con concentrazioni note di una proteina standard, nel caso BSA (Bovine Serum Albumin, Pierce). Questo metodo sfrutta la riduzione di  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  mediata dalle proteine in un ambiente alcalino e la capacità dell'acido bicinconico (BCA) di chelare gli ioni  $\text{Cu}^{1+}$  in maniera altamente sensibile e selettiva. In particolare due molecole di BCA chelano un catione  $\text{Cu}^{1+}$ . Il prodotto della reazione colorimetrica dipende dalla struttura macromolecolare delle proteine, dal numero di legami e dalla presenza di cisteina, triptofano e tirosina, ed esibisce una forte assorbanza a 562nm proporzionale alla quantità di proteine presenti nel campione. Costruendo una retta di calibrazione, dove l'asse delle ascisse è rappresentato dalla concentrazione dello standard noto, e l'asse delle ordinate è l'assorbanza letta allo spettrofotometro, è possibile derivare la concentrazione del campione in base alla sua lettura a 562nm. La curva standard è stata costruita su 9 punti in un intervallo che va da 0 a 2000  $\mu\text{g/ml}$  di BSA.

### 3.9 ELETTROFORESI MONODIMENSIONALE SU GEL DI POLIACRILAMMIDE

La separazione delle proteine è stata eseguita mediante SDS-PAGE (Sodium Dodecil Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis). I sistemi per la separazione elettroforetica sono costituiti da un gel di impaccamento ("stacking" gel) e da un gel di separazione ("resolving" gel), preparati utilizzando una percentuale di poliacrilammide opportuna per separare le proteine da analizzare. I campioni prima di essere caricati su gel vengono risospesi in una soluzione contenente  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillata, Blue loading buffer e di-tio treitololo (DTT) per ridurre i ponti disolfuro delle proteine facilitandone la successiva linearizzazione, quindi scaldati 5 minuti a 99 °C. I campioni contenenti 30 o 60 $\mu\text{g}$  di proteine, vengono albergati nei pozzetti dello "stacking" gel. In un pozzetto viene caricato il marker costituito da una miscela di proteine a peso molecolare noto (BioRad). Durante la corsa il gel è immerso in un tampone che permette il flusso continuo delle cariche elettriche; il voltaggio applicato è di 130 mV. Nel tampone è presente SDS che si associa alle proteine ricoprendole di cariche negative, in questo modo le proteine migrano attraverso la maglie del gel verso l'anodo positivo in forma linearizzata, in base al loro peso e non alla loro conformazione.

Per la preparazione dei gel sono state utilizzate le seguenti soluzioni:

“STACKING GEL” Bis-Acrlammide 3,75%, Upper Buffer, H<sub>2</sub>O bidistillata, TEMED, APS.

“RESOLVING GEL”: Bis-Acrlammide 6/12%, Lower Buffer, H<sub>2</sub>O bidistillata, TEMED, APS.

#### WESTERN BLOTTING (TRASFERIMENTO):

Le proteine separate durante la corsa elettroforetica vengono trasferite su membrana di nitrocellulosa (BioRad). Viene montato il sandwich nell'apposito apparato nel seguente ordine: supporto, spugnetta, carta assorbente 3M, gel, nitrocellulosa, carta assorbente, spugnetta. Il trasferimento avviene nel tampone di trasferimento a 100 mV per 90 minuti, al termine del quale la membrana viene colorata con Ponceau S, un colorante reversibile delle proteine, per verificare l'avvenuto trasferimento e successivamente decolorata con abbondante tampone TTBS.

“TAMPONE DI TRASFERIMENTO”: H<sub>2</sub>O bidistillata, Tris Glicina, metanolo.

“TTBS”: TBS 1X, Tween20 0,01%, H<sub>2</sub>O bidistillata

#### IMMUNOBLOTTING

La membrana viene sottoposta ad immunomarcatura con anticorpi specifici. I siti aspecifici di legame vengono prima bloccati con un'incubazione con TTBS contenente 5% latte per 1 ora a temperatura ambiente su bascula. Dopo alcuni lavaggi con TTBS 0,1% Tween 20, la membrana è incubata con l'anticorpo primario o/n a 4°C sempre in agitazione. L'anticorpo viene diluito in TTBS contenente 5% latte o BSA. Gli anticorpi utilizzati sono:

Anti-fosfo Cofilina (Rabbit, Cell Signalling)	1:1000
Anti-Cofilina (Rabbit, Cell Signaling, Euroclone)	1:1000
Anti-DRD2 (Rabbit, Santa Cruz Biotechnology)	1:200
Anti-GAPDH (Mouse, Ambion)	1:4000

Seguono ulteriori lavaggi per allontanare l'anticorpo primario non legatosi alle proteine di interesse. Si procede all'incubazione con l'anticorpo secondario per 1ora a temperatura ambiente in agitazione.

Gli anticorpi secondari utilizzati sono:

Anti-Rabbit IgG Perossidasi (Euroclone)	1:2000
Anti-Mouse IgG Perossidasi (Euroclone)	1:2000

Terminata l'incubazione con l' anticorpo secondario si procede al saggio di chemiluminescenza che viene effettuato aggiungendo alla membrana una soluzione contenente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e luminolo LiteAblot PLUS (Kit Euroclone). La perossidasi legata all'anticorpo secondario reagisce con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e luminolo e si registra l'emissione di luce con lo strumento ChemiDoc-It (UVP, Upland, CA).

#### ANALISI QUANTITATIVA DI “WESTERN BLOT”

Per la quantificazione è stato utilizzato il programma ImageJ. Per ogni banda del gel viene calcolata la media dell'intensità e sottratto il valore di background, ottenendo un valore che correla con la

quantità di proteina presente nel campione analizzato. Il valore di ciascuna banda viene normalizzato sui valori di proteine di riferimento di cui si presuppone un'espressione omogenea, come ad esempio il GAPDH.

### 3.10 CLONAGGIO DEI MUTANTI DI COFILINA

Per generare i vettori di espressione codificanti la cofilina wild type o mutate, il cDNA della cofilina umana wild-type è stato subclonato all'interno del sito di clonaggio, tra gli enzimi di restrizione Sac1/Kpn1, nel plasmide pGFP-N3. La cofilina è stata amplificata grazie ai seguenti primers:

- FW 5'-ATAATGAGCTCGCCACCATGGCCTCCGGTGTGGC-3'

- RW 5'-TCGATGGTACCTTACAAAGGCTTGCCCTCCAGGGA-3'

I primers Forward contengono il sito di restrizione per Sac1, i primers Reverse contengono il sito di restrizione per Kpn1. Tutti i primers antisense utilizzati sono stati disegnati in modo da essere in frame con la proteina di fusione GFP, espressa dal plasmide da noi utilizzato. Abbiamo allestito le reazioni di PCR con Taq Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA). Il prodotto di PCR così ottenuto è stato purificato da gel mediante il kit Gel extraction kit (Qiagen) e digerito con gli enzimi di restrizione Sac1 e Kpn1 (New England Biolabs, Beverly, MA). Il prodotto di PCR è stato inserito, mediante reazione di ligazione, nel vettore di espressione pGFP-N3, digerito con gli stessi enzimi sfruttando le estremità coesive complementari. Il prodotto di ligazione è stato usato per trasformare cellule competenti di E.coli DH5 $\alpha$  (Invitrogen, Carlsbad, CA): 50  $\mu$ l di batteri sono stati incubati con 5  $\mu$ l di ligazione per 30 minuti in ghiaccio, al termine dei quali è seguito uno shock termico a 42°C per 45 secondi per permettere l'ingresso del materiale genico. I batteri sono stati riposizionati in ghiaccio per 2 minuti per far richiudere i pori nella parete cellulare creatisi durante lo shock termico. I batteri sono stati successivamente posti a 37°C per un'ora in 900  $\mu$ l di (SOC) per permettere l'espressione della resistenza all'antibiotico Kanamicina (Sigma-Aldrich), e quindi piastrati su piastre di agar completo contenente Kanamicina 50  $\mu$ g/ml. Le piastre sono state poste a 37°C o/n per fare crescere le colonie. Il plasmide amplificato è stato estratto dalle colonie con un kit commerciale (Qiagen) su scala mini o maxi prep e ne è stata quantificata la resa e la purezza con nanodrop. I due costrutti mutanti, cofilina S3A e cofilina S3D, sono stati ottenuti mediante reazione di mutagenesi effettuata sul plasmide della cofilina wt. Le mutazioni puntiformi sono state introdotte mediante l'uso di primers mutati in uno dei tre nucleotidi codificanti la serina in posizione 3; la serina è stata sostituita con una Alanina (S3A) o con un Acido aspartico (S3D).

- 5' ATAATGAGCTCGCCACCATGGCCGCCGGTGTGGC-3'

- 5' ATAATGAGCTCGCCACCATGGCCGACGGTGTGGCTG-3'

Le sequenze di tutti i costrutti sono state verificate tramite sequenziamento diretto.

### 3.11 TRASFEZIONE DEI COSTRUTTI DI COFILINA IN CELLULE HP75

Le trasfezioni transienti dei vettori di cofilina in cellule HP75 sono state eseguite utilizzando come agente di trasfezione Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) costituito di polimeri solubili in grado di complessare il DNA e di veicolarlo efficacemente all'interno della cellula mediante endocitosi. In breve, il giorno prima della trasfezione, le cellule sono seminate in piastre da 6, 24 pozzetti in modo da raggiungere una confluenza del 70-80% il giorno della trasfezione. Nel caso di trasfezioni per esperimenti di microscopia a fluorescenza, le cellule sono state seminate su vetrini coprioggetto. Il protocollo prevede di miscelare il plasmide con un reagente specifico (Reagent 3000) per facilitare l'entrata del DNA e successivamente unire il DNA alle lipofectamine. Incubare per 5 minuti ed aggiungere il composto alle cellule. Per ogni esperimento è stato allestito un controllo negativo costituito dal plasmide pGFP-N3 vuoto. Dopo 48h di trasfezione le cellule sono state utilizzate per diversi esperimenti. Per l'immunofluorescenza le cellule sono state fissate in paraformaldeide per 15 minuti e poi marcate con AlexaFluor555 (Invitrogen, Carlsbad, CA) per 15 minuti a temperatura ambiente. Per i saggi di wound healing, come descritto precedentemente, le cellule sono state seminate in una muti-well da 6 pozzetti (200,000/pozzetto), trasfettate e dopo 24h trasferite in una multi-well da 24 ad una concentrazione di 50000 cellule/pozzetto. Il giorno dopo si ha la concentrazione ottimale di cellule per eseguire lo scatch. L'efficienza di trasfezione, in ciascun esperimento, è stata valutata mediante microscopio a fluorescenza grazie alla presenza della proteina GFP fusa all'N-Terminale degli inserti. Solo gli esperimenti con il 60% di cellule trasfettate sono stati analizzati.

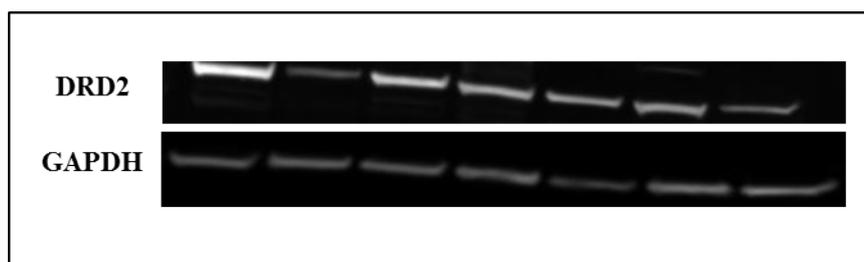
### 3.12 ANALISI STATISTICA

Tutti i risultati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard (DS). L'analisi statistica è stata effettuata con test parametrici (test t di Student). Per l'analisi della densiometria fosfo-cofilina/cofilina, i dati sono stati analizzati mediante il test non parametrico, Mann-Whitney U. sono stati considerati statisticamente significativi solo i valori di "p" inferiori a 0.05. I dati sono stati analizzati mediante GraphPad Prism 5.0.

## 4. RISULTATI

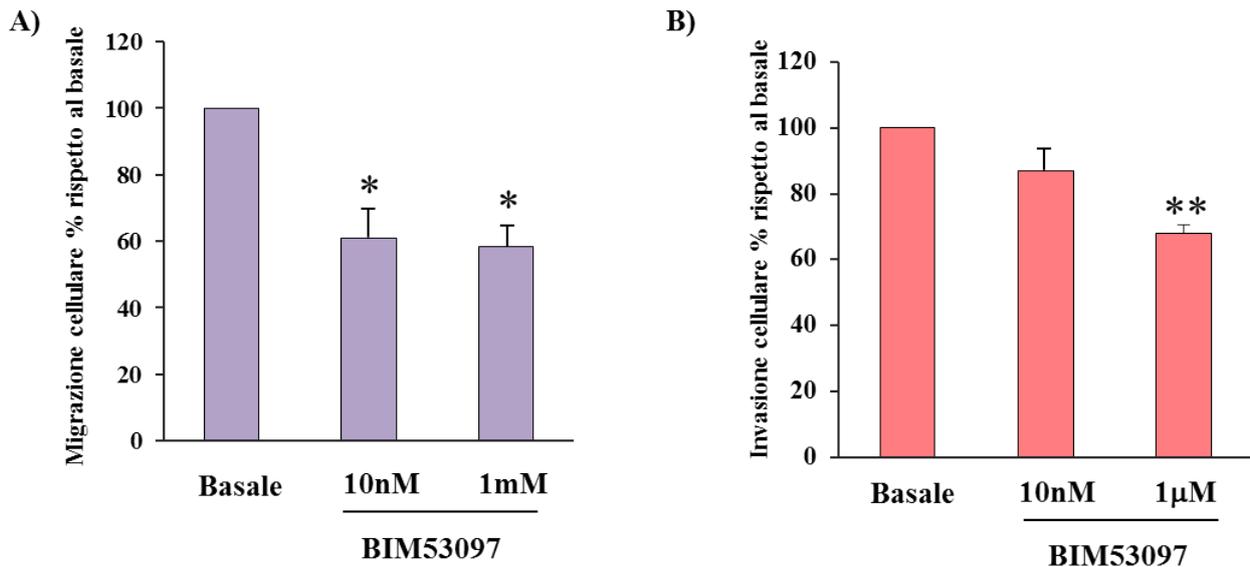
### 4.1 L'AGONISTA DEL DRD2 RIDUCE LA MIGRAZIONE E L'INVASIONE CELLULARE

In primo luogo è stato valutato l'effetto dell'agonista specifico del DRD2, BIM53097, sulla migrazione e invasione cellulare in culture primarie di NFPA. I tumori utilizzati sono stati analizzati per l'espressione del recettore di tipo 2 e analisi di Western blot mostrano come il recettore sia espresso in tutti i campioni (Fig1).



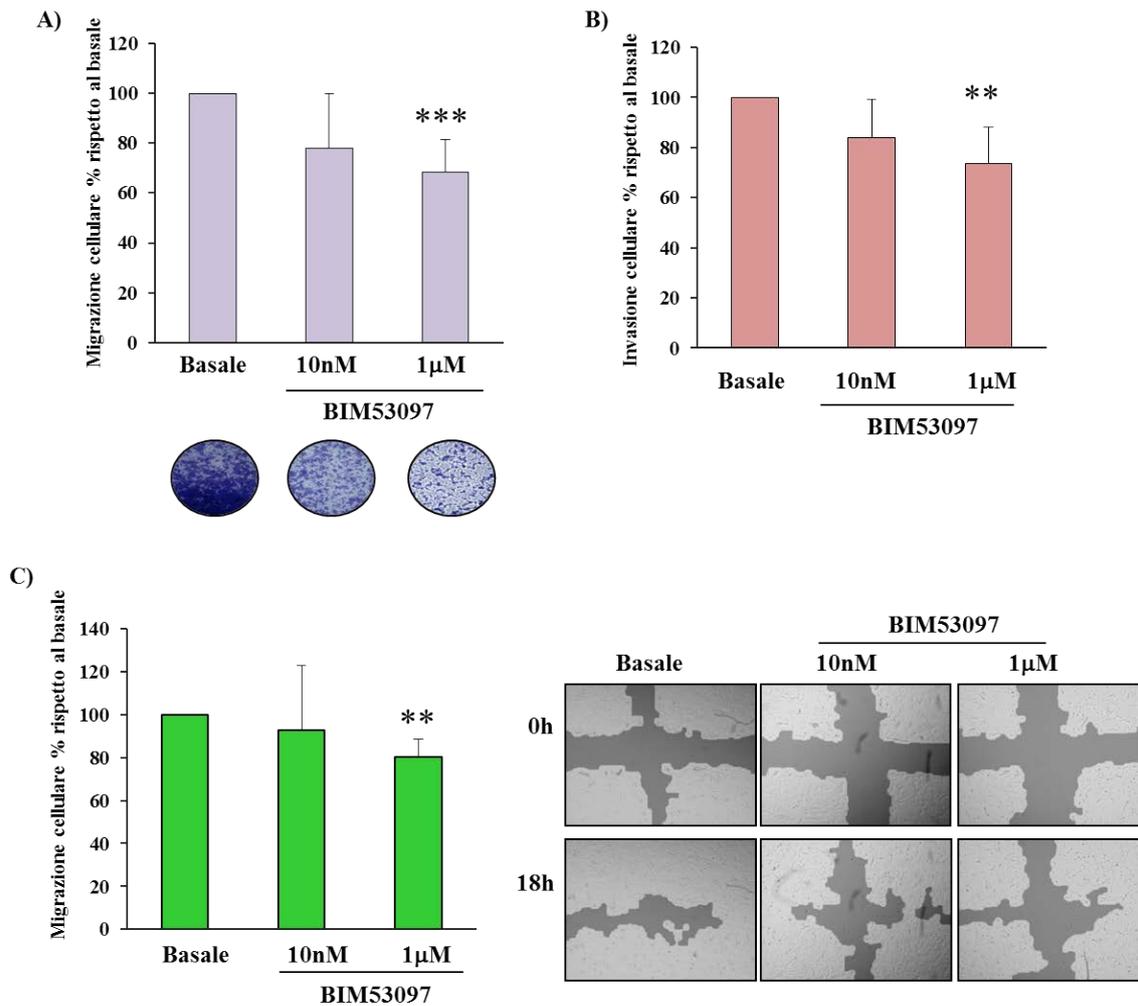
**Figura1.** Immagine rappresentativa dell'espressione del recettore D2 in alcuni tessuti di NFPA utilizzati nel lavoro. L'immunoblot è stato per il DRD2 e la proteina housekeeping GAPDH.

Dal momento che queste cellule crescono in sospensione, è stato utilizzato un saggio transwell (camera di Boyden), nel quale le cellule vengono seminate nella parte alta di un inserto, contenete una membrana porosa, in terreno privo di siero. Nella parte sottostante è presente un terreno contenente siero che dovrebbe indurre le cellule a migrare per chemiotassi. Le cellule sono incubate in presenza o assenza di stimolo. Dopo 6h di incubazione con BIM53097, ad una concentrazione di  $1\mu\text{M}$ , la migrazione cellulare era significativamente ridotta ( $42\pm 6\%$  di inibizione,  $p < 0.05$ ) in un sottogruppo di NFPA (Figura 2A). Per eseguire saggi di invasione cellulare, la membrana dell'inserto della camera di Boyden è stata ricoperta con il collagene di tipo IV, il maggior costituente della matrice extracellulare. Il saggio si svolge in modo identico a quello della migrazione e anche in questo caso, il BIM53097  $1\mu\text{M}$  è stato in grado di ridurre in modo statisticamente significativo l'invasione attraverso il collagene di tipo IV ( $32\pm 2\%$ ,  $p < 0.1$ ) (Fig2B).



**Figura2.** L'agonista del DRD2 riduce la migrazione e l'invasione cellulare in colture primarie di NFPA. A) saggio di migrazione transwell. Le cellule sono incubate nella parte alta di un inserto (camera di Boyden), contenente una membrana porosa, in terreno privo siero con o senza agonista del DRD2. Le cellule migrano nella parte inferiore per chemotassi verso un terreno arricchito con siero. Le cellule sono centrifugate e marcate con calceina AM per 30 minuti. La fluorescenza è stata misurata mediante un lettore di piastra. Ad ogni valore è stato sottratto il controllo negativo in cui è stato posto terreno starvato sia nella parte alta, che in quella bassa della camera .B) Saggio di invasione. La membrana degli inserti viene ricoperta con 300µl di collagene di tipo IV (0.25mg/ml) e l'esperimento prosegue come detto sopra. I dati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti eseguiti su tre diversi campioni di NFPA, includendo solo gli NFPA che hanno risposto all'agonista. Ogni esperimento è stato fatto in triplicato.  
 \*=  $p < 0.05$  rispetto al basale; \*\*=  $p < 0.01$  rispetto al basale.

Per quanto riguarda la linea cellulare HP75, che esprime in modo endogeno il DRD2, sono stati riconfermati gli stessi dato ottenuti sulle colture primarie. Mediante saggio di migrazione transwell è stato osservato che l'agonista del DRD2 è in grado di ridurre la migrazione cellulare del  $32 \pm 13\%$  ( $p < 0.001$ ) dopo 18 di incubazione ad una concentrazione di  $1 \mu\text{M}$  (Figura 3A). Nel saggio di invasione, allestito come detto precedentemente, si ha un'inibizione del  $27 \pm 15\%$  ( $p < 0.01$ ) dopo 18h di incubazione con BIM53097  $1 \mu\text{M}$  (Figura 3B). Dato che le HP75 crescono in adesione, è stato possibile disegnare anche un saggio di wound healing (Figura 3C), in grado di misurare la migrazione cellulare in assenza di uno stimolo chemiotattico. È stata osservata, anche con questo saggio, una riduzione del  $20 \pm 8\%$  ( $p < 0.01$ ) dopo 18h di stimolo ad una concentrazione di  $1 \mu\text{M}$ .



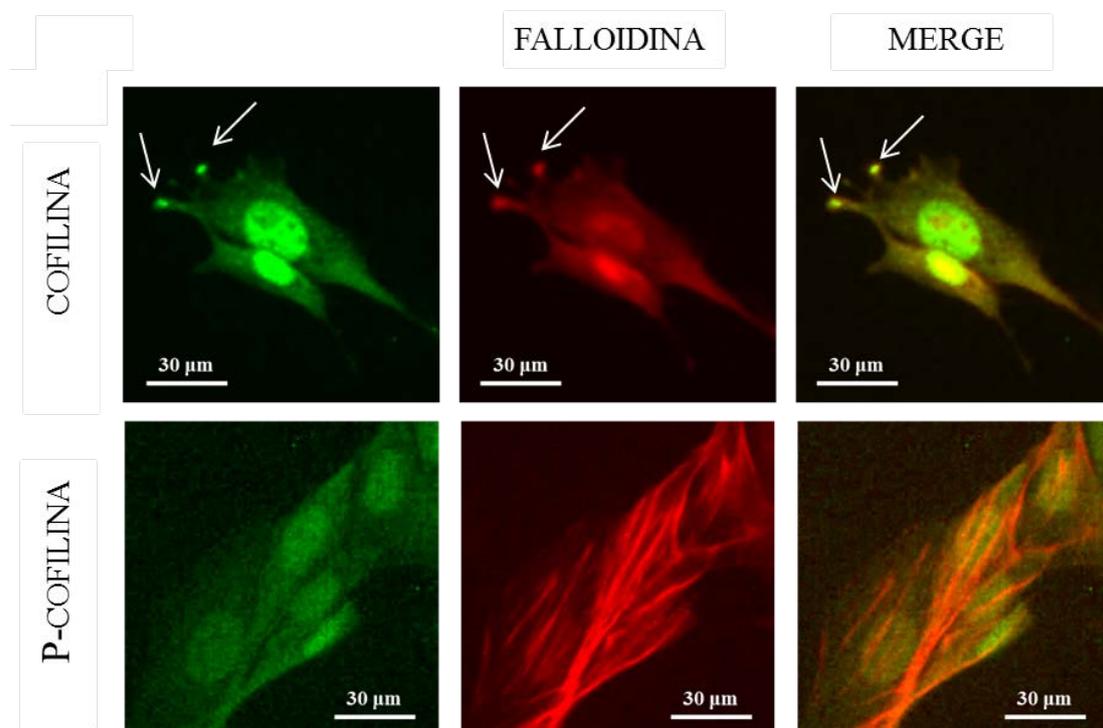
**Figura3:** L'agonista del DRD2 riduce la migrazione e l'invasione cellulare in cellule HP75. A) saggio di migrazione transwell. Le cellule sono incubate nella parte alta di un inserto (camera di Boyden), contenente una membrana porosa, in terreno privo di siero con o senza agonista del DRD2. Le cellule migrano nella parte inferiore per chemotassi verso un terreno arricchito con siero. Le cellule sono marcate con Crystal Violet, poi lisate e la reazione colorimetrica viene misurata mediante un lettore di piastre. Ad ogni valore è stato sottratto il controllo negativo in cui è stato posto terreno starvato sia nella parte alta, che in quella bassa della camera .B) Saggio di invasione. La membrana degli inserti viene ricoperta con 300μl di collagene di tipo IV (0.25mg/ml) e l'esperimento prosegue come detto sopra. I dati rappresentano la media ± la deviazione standard, di 5 esperimenti indipendenti. Ogni esperimento è stato fatto in triplicato. Sono mostrate immagini rappresentative della membrana marcata degli inserti.\*= p<0.05 rispetto al basale: \*\*= p<0.01 rispetto al basale. \*\*\*=p<0.001 rispetto al basale. C) Saggio di Wound healing. Le immagini sono prese a tempo zero, 0h, immediatamente dopo aver fatto la croce e dopo 18h in assenza o presenza di agonista in terreno completo. Le immagini sono analizzate mediante T-Scratch, un software in grado di calcolare la percentuale di riduzione di area libera tra il t0 e t18. La media ±la deviazione standard deriva da 5 indipendenti esperimenti, \*\*=p<0.01 rispetto al basale. Gli esperimenti sono stati fatti in quadruplicato. Sono presenti immagini rappresentative analizzate tramite il software.

Dal momento che è stato dimostrato che l'agonista del DRD2 eserciti un effetto citotossico e antiproliferativo sulle cellule di NFPA a 24h e 96h rispettivamente (Peverelli E et al., 2009) è stato testato se l'effetto anti migratorio osservato, fosse dovuto davvero un'inibizione della motilità cellulare o fosse dovuto agli altri effetti dell'agonista. Sono stati allestiti saggi di apoptosi e

proliferazione cellulare e non è stato trovato nessun effetto citostatico o citotossico statisticamente significativo, né in cellule di NFPA, né in HP75 dopo 6h e 18h rispettivamente.

#### 4.2 LOCALIZZAZIONE INTRACELLULARE DI COFILINA

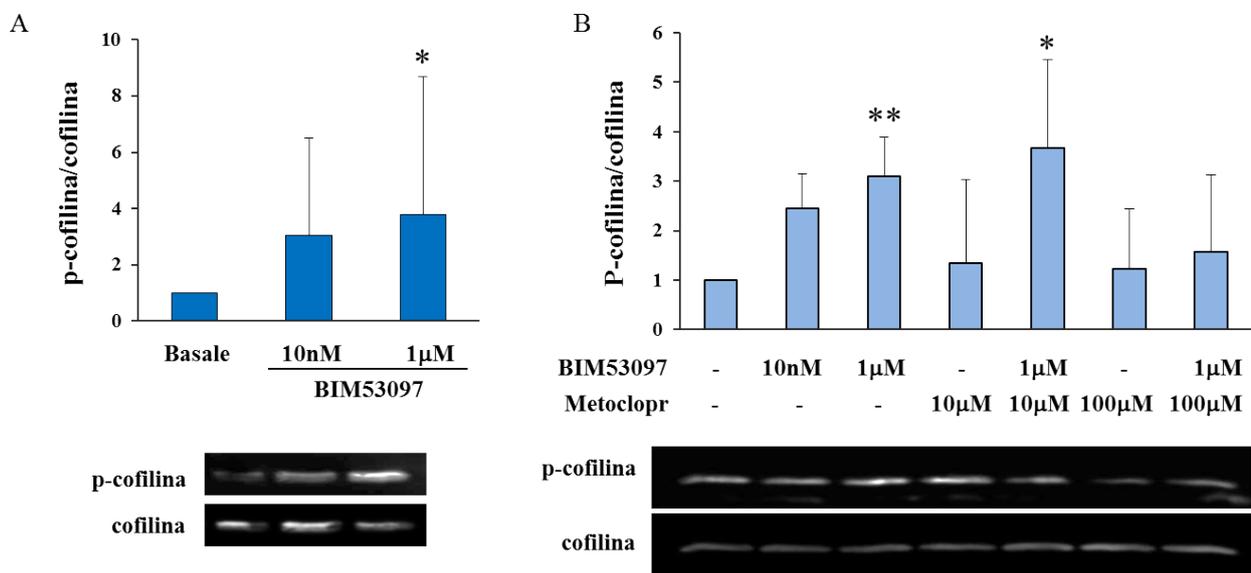
Per investigare i meccanismi molecolari attraverso i quali il DRD2 inibisce la migrazione e l'invasione cellulare, è stato studiato il coinvolgimento del pathway di cofilina. In primo luogo è stata analizzata l'espressione e la localizzazione della cofilina e della sua forma fosforilata sulla serina 3 (p-cofilina). Attraverso analisi di immunofluorescenza, in cellule HP75, è stato osservato che la cofilina, detectata con un anticorpo in grado di riconoscere sia la forma non fosforilata che quella fosforilata, ha una localizzazione sia nucleare che citoplasmatica. Inoltre presenta degli accumuli in corrispondenza delle protrusioni della membrana plasmatica (lamellipodi), con una parziale co-localizzazione con l'actina, come mostrato grazie allo staining per la falloidina, confermando il ruolo della cofilina nel rimodellamento del citoscheletro actinico durante i processi migratori (Figura 4). La p-cofilina, detectata con un anticorpo specifico per la forma fosforilata, ha una distribuzione del tutto identica alla cofilina, tranne per gli accumuli in prossimità della membrana, in quanto la p-cofilina rappresenta la forma inattiva della proteina (Figura 4).



**Figura4.** Analisi di immunofluorescenza di cellule HP75 marcate per cofilina(fluorescenza verde) p-cofilina (fluorescenza verde) e falloidina (fluorescenza rossa). Le frecce indicano le protrusioni della membrana plasmatica in cui c'è un accumulo di actina, mostrato dalla falloidina (rosso). Le due proteine in parte colocalizzano come si evince dal merge. La p-cofilina non è arricchita in membrana ma presenta una distribuzione prettamente citoplasmatica e nucleare.

### 4.3 L'AGONISTA DEL DRD2 AUMENTA I LIVELLI DI COFILINA FOSFORILATA

Per comprendere se nel nostro modello cellulare l'agonista del recettore D2 fosse in grado di modulare i livelli di p-cofilina, cellule HP75 e di NFPA sono state stimulate con BIM53097 per 10 minuti per osservare la fosforilazione nella serina 3. Analisi di Western blot mostrano come la stimolazione con agonista del DRD2 induca un aumento di p-cofilina rispetto alla cofilina totale sia in cellule di NFPA, con un aumento di 4.2 volte ad una concentrazione di 1 $\mu$ M ( $p < 0.01$ ), sia in cellule HP75, 2.5 volte rispetto al basale ( $p < 0.01$ ) (Figura 5 A e B). Inoltre è stato osservato che l'utilizzo dell'antagonista del DRD2, metoclopramide, è in grado di abolire l'effetto sulla fosforilazione della cofilina, confermando la specificità dell'effetto del BIM53097 sulle cellule in esame (Figura 5B).



**Figura 5.** L'agonista del DRD2 aumenta la fosforilazione di cofilina in cellule di NFPA (A) e HP75 (B). le cellule sono incubate per 10 minuti con crescenti concentrazioni di BIM53097 e metoclopramide (antagonista del DRD2) dove indicato. Il grafico mostra la quantificazione della p-cofilina normalizzata sulla cofilina totale e rispetto ad una condizione non stimolata. La media  $\pm$  la deviazione standard deriva da 4 esperimenti indipendenti da 4 differenti campioni di NFPA e 5 esperimenti per le HP75. \*\*= $p < 0.01$ . L'immagine rappresenta un immunoblot rappresentativo marcato per p-cofilina e cofilina totale.

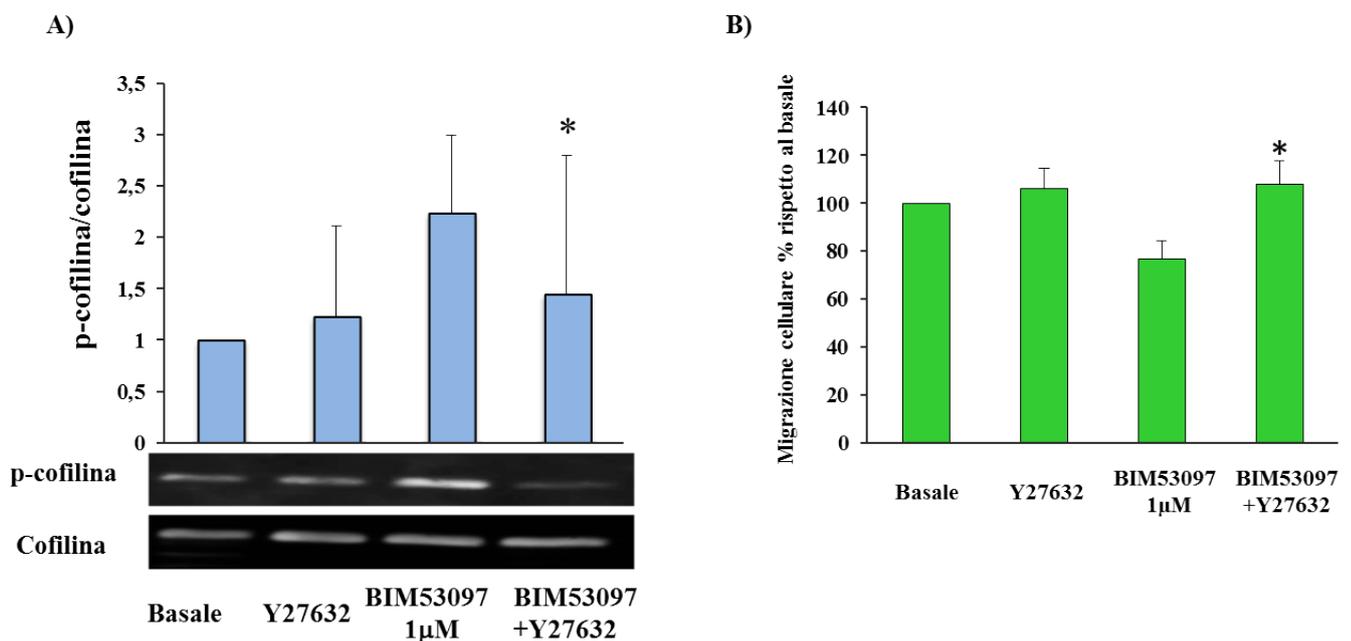
È interessante notare che la capacità del BIM53097 di indurre la fosforilazione della cofilina negli NFPA è strettamente correlata con la sua abilità di inibire la migrazione cellulare. Infatti nel piccolo gruppo di NFPA in cui l'agonista del DRD2 non è stato in grado di ridurre la migrazione cellulare, non ha neppure aumentato i livelli di p-cofilina.

#### 4.4 L'INIBITORE DELLA CHINASI ROCK REVERTE L'ABILITA' DEL BIM53097 DI FOSFORILARE LA COFILINA E DI INIBIRE LA MIGRAZIONE

Per investigare il coinvolgimento del pathway di Rho/ROCK/LIMK nella fosforilazione di cofilina indotta dall'attivazione del DRD2, è stato utilizzato un inibitore selettivo di ROCK, Y27632 (Ishizaki T et al., 2000). In cellule HP75 l'utilizzo di Y27632 ad una concentrazione di 2.5  $\mu$ M è in grado di abolire la fosforilazione della cofilina da parte del DRD2 (Figura 6). Incubando l'inibitore da solo non si ha nessun cambiamento rispetto alla condizione non trattata suggerendo che il pathway Rho/ROCK abbia un'attivazione costitutiva molto bassa in cellule HP75.

Dati preliminari confermerebbero che l'inibitore di ROCK sia in grado di inibire l'effetto indotto dall'agonista del DRD2 anche in cellule di NFPA.

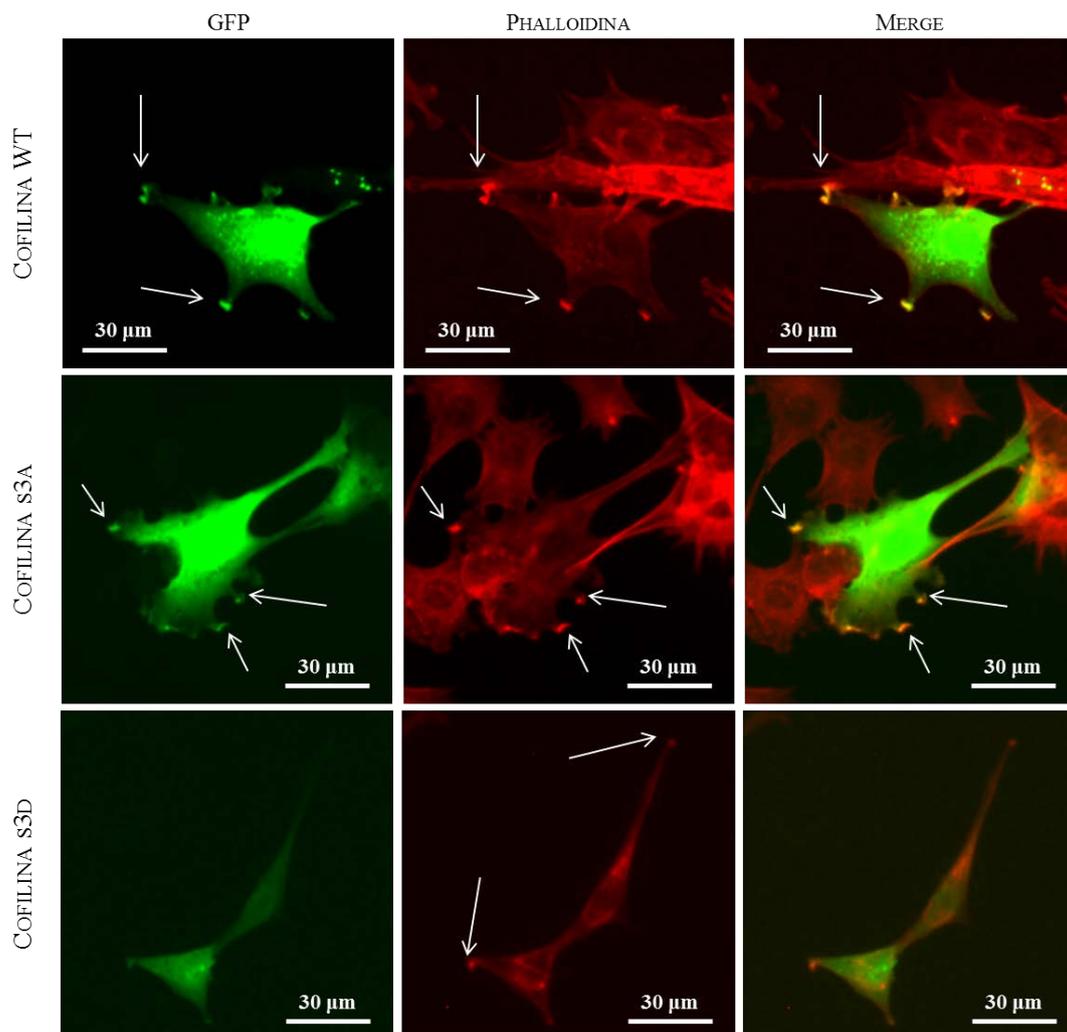
Inoltre è stato testato se Y27632 fosse in grado di interferire con l'effetto del DRD2 anche in migrazione. Le cellule HP75 sono state incubate con l'inibitore di ROCK per 18h dopo saggio di wound healing, confermando che la chinasi ROCK è indispensabile al recettore D2 per mediare i suoi effetti antimigratori (Figura 6B).



**Figura6.** L'inibitore di ROCK è in grado revertire l'abilità del BIM53097 di aumentare i livelli di p-cofilina e di ridurre la migrazione cellulare in cellule HP75. A) Le cellule sono state pretrattate 30 minuti con Y27632 e stimulate per 10 minuti con il BIM53097. Il grafico mostra la quantificazione della p-cofilina normalizzata sulla cofilina totale e rispetto ad una condizione non stimolata. La media  $\pm$  la deviazione standard deriva da 4 esperimenti indipendenti; . \*= $p < 0.05$ . L'immagine rappresenta un immunoblot rappresentativo marcato per p-cofilina e cofilina totale. B) Saggio di migrazione eseguito mediante wound healing. Le immagini sono prese a tempo zero, 0h, immediatamente dopo aver fatto la croce e dopo 18h in assenza o presenza di agonista e Y27632. Le immagini sono analizzate mediante T-Scratch, un software in grado di calcolare la percentuale di riduzione di area libera tra il t0 e t18. La media  $\pm$  la deviazione standard deriva da 3 indipendenti esperimenti, \*= $p < 0.05$  rispetto al basale. Gli esperimenti sono stati fatti in quadruplicato.

#### 4.5 EFFETTI DELL'OVERESPRESSIONE DI COFILINA WT E DEI SUOI MUTANTI SULLA MIGRAZIONE CELLULARE

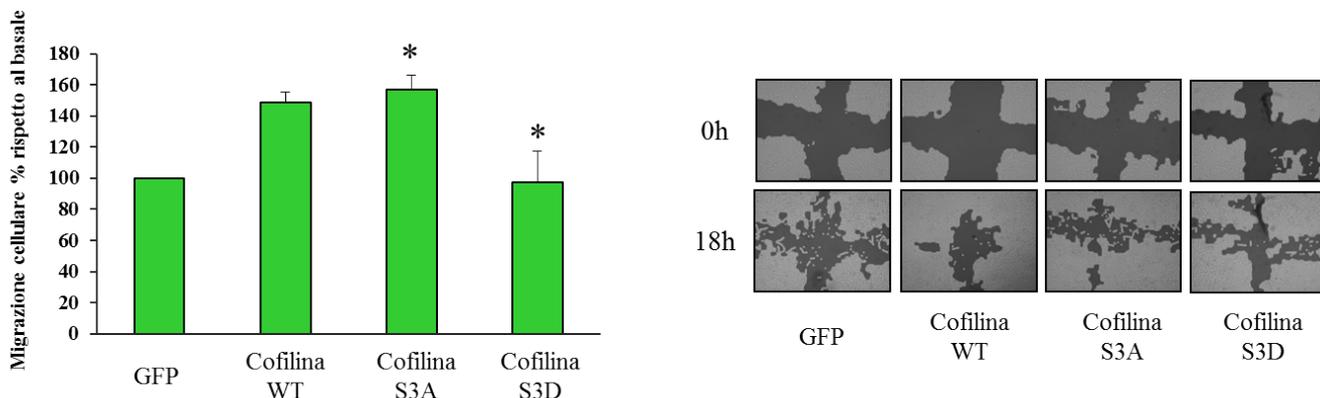
Per studiare il ruolo di cofilina nella regolazione della migrazione cellulare in cellule ipofisarie, sono stati over-espressi, in cellule HP75 dei costrutti, la cofilina wild-type e due mutanti, uno fosfodeficiente S3A (attivo) e uno fosfomimetico S3D (inattivo) (Figura 7). La marcatura dell'actina con falloidina mostra che sia la proteina wild-type che quella fosfodeficiente, S3A, localizzano nelle protrusioni della membrana arricchite in F-actina. Al contrario il mutante S3D si distribuisce all'interno di tutta la cellula.



**Figura7.** Immagine rappresentativa della localizzazione intracellulare dei vettori cofilina wild-type; cofilina S3A, cofilina S3D trasfettati in modo transiente in cellule HP75. L'actina è marcata tramite la falloidina, in rosso. Solo la cofilina wild-type e S3A localizzano nelle protrusioni della membrana arricchite in actina. Il mutante S3D ha una distribuzione omogenea in tutta la cellula.

Dopo aver osservato la validità e localizzazione dei costrutti, sono stati allestiti saggi di migrazione mediante wound healing. Le cellule HP75, trasfettate, sono state incubate per 18h in assenza di stimolo ed è stato osservato che l'espressione del costrutto wild-type e della cofilina S3A erano in

grado di aumentare la migrazione cellulare del  $49\pm 6\%$  e del  $57\pm 9\%$  rispettivamente rispetto al vettore vuoto ( $P < 0.05$ ). Come ci si poteva aspettare, le cellule trasfettate con il mutante S3D, inattivo, sono del tutto comparabili a quelle con il vettore vuoto (Figura 8).

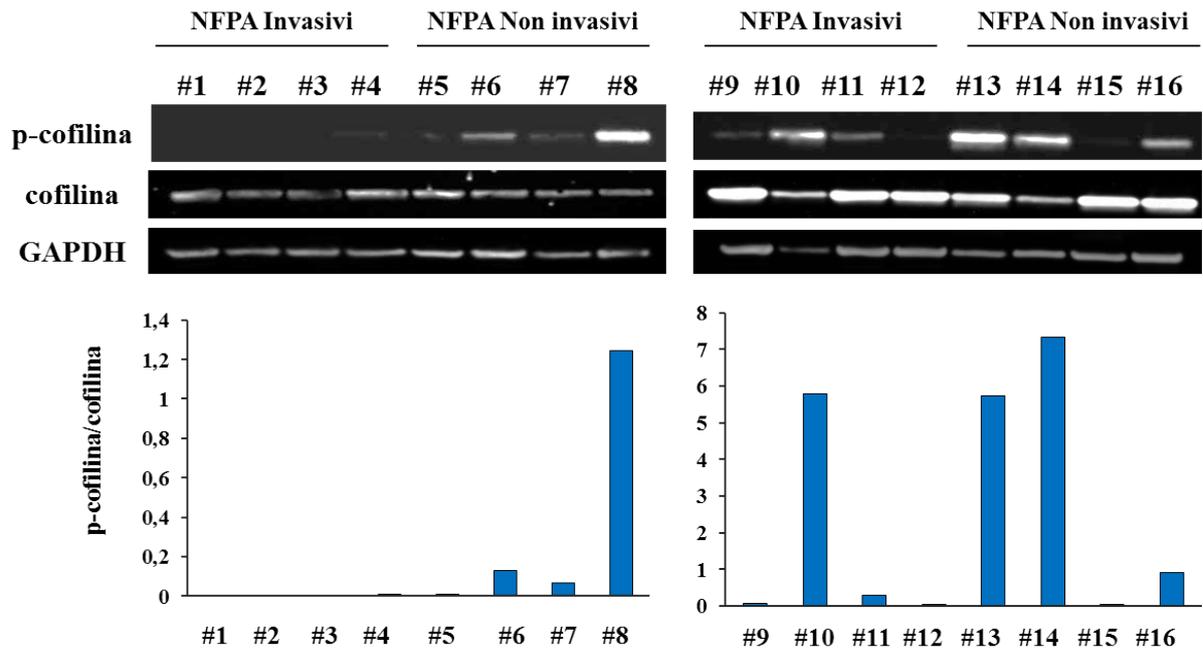


**Figura8.** Saggio di wound healing eseguito su cellule HP75 trasfettate per 48h. Le immagini sono prese a tempo zero, 0h, immediatamente dopo aver fatto la croce e dopo 18h. Le immagini sono analizzate mediante T-Scratch, un software in grado di calcolare la percentuale di riduzione di area libera tra il  $t_0$  e  $t_{18}$ . La media  $\pm$  la deviazione standard deriva da 3 indipendenti esperimenti,  $*=p < 0.05$  rispetto al plasmide EGFP. Gli esperimenti sono stati fatti in quadruplicato.

#### 4.6 LA FOSFORILAZIONE DI COFILINA E' FORTEMENTE RIDOTTA NEGLI NFPA INVASIVI

Per determinare se i livelli di cofilina e/o p-cofilina correlano con l'invasività negli NFPA, è stato allestito un Western blot con campioni derivanti da tessuti di NFPA invasivi e non invasivi. È stato dimostrato che i tumori invasivi, considerati tali se era presente l'invasione del seno cavernoso (Tabella 1), mostrano livelli di p-cofilina quasi assenti, in contrasto con gli alti livelli osservati nei campioni non invasivi (Figura 9). La media della p-cofilina rispetto alla cofilina totale è 0.77 nei tumori invasivi e 1.93 in quelli non invasivi. La distribuzione dei due gruppi differisce in modo statisticamente significativo, come dimostrato dall'analisi mediante test non parametrico Mann-Whitney ad una coda ( $U = 13.5$ ,  $n_1=n_2=8$ ,  $p < 0.05$  median 0.008 e 0.524 rispettivamente).

Al contrario, la media dei livelli di cofilina normalizzati sulla proteina housekeeping GAPDH non è statisticamente differente tra i tumori invasivi, media=2.18, e non invasivi, media =1.83. Non sono rilevabili differenze neppure tra il rapporto di p-cofilina rispetto alla cofilina totale per quanto riguarda gli NFPA con  $Ki67 > 1$  o  $Ki67 < 1$  (Tabella 1), suggerendo un'assenza di correlazione tra la fosforilazione di cofilina e la capacità proliferativa tumorale. Inoltre è da sottolineare come non esista correlazione tra i livelli di fosforilazione di cofilina e l'estensione sovrassellare.



**Figura9.** La cofilina fosforilata è fortemente ridotta negli NFPA invasivi. Immunoblot per p-cofilina, cofilina e GAPDH in tessuti tumorali caratterizzati in base all'invasione del seno cavernoso come invasivi o non invasivi. Il grafico mostra la quantizzazione della p-cofilina rispetto alla cofilina totale.

## 5. DISCUSSIONE

In questo lavoro è stato dimostrato che l'agonista del recettore della dopamina D2, BIM53097, è in grado di inibire la migrazione e l'invasione cellulare di cellule di NFPA e cellule HP75, attivando il pathway della cofilina. L'invasione locale è una caratteristica frequente negli NFPA, è presente infatti in circa il 40% dei pazienti. Dal momento che l'invasività è spesso causa di una peggior prognosi, in quanto è associata con una maggior probabilità di fallimento della terapia chirurgica ed ad un aumentata ricorrenza, comprendere i meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno, potrebbe favorire l'identificazione di marker di invasività. Sebbene studi precedenti avessero messo in luce fattori promuoventi l'invasione come ipossia (Yoshida D *et al.*, 2007), l'alta espressione e attività della collagenasi di tipo IV (Hussaini IM *et al.*, 2007; Kawamoto H *et al.*, 1996) oppure l'alterata espressione dei microRNA (miR-132; miR.15a; miR-16) (Renjie W *et al.*, 2015), i meccanismi molecolari, coinvolti nell'invasività di questi tumori benigni, non sono stati ancora completamente elucidati.

Il recettore della dopamina di tipo 2 è espresso nella maggioranza degli NFPA (Vieira Neto *et al.*, 2015; Colao A *et al.*, 2007) e anche nei residui post chirurgici (Babu A *et al.*, 2014). Inoltre il trattamento con cabergolina sembrerebbe ridurre le dimensioni del tumore in un sottogruppo di pazienti (Vieira Neto *et al.*, 2015; Colao A *et al.*, 2009). Evidenze *in vitro* hanno ulteriormente rafforzato questo dato, dimostrando che l'agonista del DRD2 sia in grado di indurre un effetto citostatico e citotossico *in vitro* (Peverelli E *et al.*, 2010; Florio T *et al.*, 2008). Nonostante ciò, la terapia medica con analoghi della dopamina non è, ad oggi, comunemente usata nella pratica clinica.

I dati presentati in questo lavoro mostrano un effetto inibitorio statisticamente significativo dell'agonista del DRD2, BIM53097, sulla migrazione e invasione cellulare di cellule di NFPA. Questo effetto risulta più forte nelle culture primarie rispetto alla linea cellulare HP75. La gran parte degli NFPA esaminati era responsiva all'agonista del DRD2 in termini di riduzione dell'invasione o della migrazione cellulare. La mancata risposta non è dovuta all'assenza del recettore, in quanto tutti gli NFPA utilizzati nello studio esprimevano il DRD2.

La capacità dell'agonista del DRD2 di inibire la migrazione cellulare è stata riportata in un recente studio, in cui il trattamento con dopamina, in cellule mesenchimali, riduce la migrazione cellulare e il rimodellamento del citoscheletro actinico (Shome S *et al.*, 2012). Questo rimane il primo lavoro in cui l'effetto antimigratorio della dopamina è stato testato in cellule di tumore ipofisario, dove gli analoghi della dopamina sono una possibile terapia medica.

È noto che l'attività della cofilina sia rilevante nel rimodellamento dell'actina durante la migrazione cellulare. Analisi di immunofluorescenza, in cellule HP75, hanno mostrato una distribuzione della

cofilina endogena sia citoplasmatica che nucleare, come atteso data la presenza del segnale di localizzazione nucleare. Inoltre è stato osservato un accumulo di cofilina nelle strutture protusive tipiche delle cellule in fase migratoria. Ovviamente la p-cofilina non si localizza nelle protusioni della membrana, confermando che solo la cofilina attiva, quella non fosforilata, partecipa alla riorganizzazione del citoscheletro, come riportato per altri tipi di cellule (Dawe HR et al., 2003, Nagata-Ohashi K et al., 2004; Nishita M et al., 2005).

Tramite analisi di Western blot è stato dimostrato che l'attivazione del DRD2 sia in grado di aumentare i livelli di cofilina fosforilata, con una conseguente riduzione dell'attività della cofilina stessa. L'aumento di p-cofilina avviene già a basse concentrazioni di BIM53097, 10nM, ed è più pronunciato negli NFPA che non nelle cellule HP75, perfettamente in linea con quanto emerso dai saggi di migrazione cellulare nei quali l'inibizione era maggiore in cellule di NFPA.

È stato inoltre osservato che il DRD2 esplica i suoi effetti sia sulla fosforilazione di cofilina sia sulla migrazione cellulare, attraverso il pathway RhoA/ROCK, come dimostrato dall'abolizione di questi suoi effetti, con coincubazione di BIM53097 e inibitore di ROCK. Questo suggerisce che il DRD2 regoli la motilità cellulare attivando la cascata chinasi RhoA/ROCK/LIMK.

È noto che il DRD2 si accoppi con le proteine G eterotrimeriche ( $G_o/G_i/G_q$ ), ma recenti studi hanno dimostrato che può legare anche le small G protein, come quelle della famiglia Rho con conseguente iperfosforilazione della cofilina (Senogles SE et al., 2000; Deyts C et al., 2009). Ad oggi, il meccanismo attraverso il quale il DRD2 attivi questo pathway non è noto, potrebbe agire tramite le proteine G eterotrimeriche o mediante proteine scaffold come la filamina A, che è già stato dimostrato essere essenziale sia per la corretta localizzazione in membrana sia per il corretto signaling del recettore (Peverelli E et al., 2012). Oppure potrebbero essere implicate le  $\beta$  arrestine, coinvolte sia nell'internalizzazione del recettore sia nel legame e nell'attivazione di Rho (Barnes WG et al., 2005; Ma X et al., 2012).

L'attivazione di questa cascata chinasi culmina con la fosforilazione, su una serina in posizione 3, della cofilina, con conseguente perdita della sua capacità di rimodellare il citoscheletro actinico e promuovere la migrazione.

In accordo con queste evidenze, l'over-espressione della cofilina wild-type o del mutante fosfodeficiente S3A, in cellule HP75, induce un aumento della migrazione cellulare, probabilmente dovuto all'aumento dell'attività della cofilina in queste cellule. L'over-espressione del mutante fosfomimetico S3D non modifica la migrazione cellulare rispetto al vettore vuoto, suggerendo che la fosforilazione sulla serina in posizione 3 è sufficiente ad abolire l'aumento della migrazione indotto da cofilina. Ovviamente l'over-espressione del mutante fosfomimetico non riduce la migrazione cellulare, in quanto, non fungendo da dominante negativo, la cofilina endogena, non

fosforilata, continua a svolgere la sua attività favorendo la migrazione, come accade nel controllo trasfettato solo con la proteina GFP.

La distribuzione intracellulare di questi mutanti trasfettati in cellule HP75 riproduce quella osservata con lo staining della cofilina endogena. Solo il mutante fosfodeficiente, S3A (attivo), si localizza in prossimità della membrana plasmatica nei lamellipodi, suggerendo che solo questa forma è in grado di partecipare alla riorganizzazione del citoscheletro, in accordo con i dati preesistenti sull'adenocarcinoma del colon (Popow-Woźniak A et al., 2012).

Infine, è stato osservato un differente grado di fosforilazione della cofilina in tessuti di NFPA derivanti da tumori invasivi e non invasivi. Il rapporto tra p-cofilina rispetto alla cofilina totale era più alto nei tumori non invasivi rispetto a quelli invasivi, il linea con l'effetto negativo che la fosforilazione della cofilina, operata dall'agonista del DRD2, esercita sulla migrazione e l'invasione in vitro.

L'invasività tumorale è definita sulla base dell'invasione del seno cavernoso (Di Ieva A et al., 2014). La definizione di aggressività ed invasività in letteratura è ancora controversa, ma sembrerebbe plausibile che invasività e proliferazione non siano strettamente legate. Possono esistere macroadenomi con un indice Ki67 molto elevato, ma non mostrare segni di invasività, invece possono presentarsi microadenomi con una alto potenziale invasivo. In accordo con queste osservazioni, i dati presentati mostrano una correlazione evidente tra il rapporto p-cofilina/cofilina solo per quanto concerne l'invasività dei tumori, non la proliferazione cellulare. Infatti non è stata osservata nessuna relazione tra Ki67 e rapporto p-cofilina/cofilina. Il linea con questo dato, non si sono riscontrate differenze nella fosforilazione di cofilina tra gli NFPA con estensione sovrassellare e quelli privi; infatti questo è un parametro legato all'eccessiva proliferazione non all'invasione dei tessuti circostanti.

Nel complesso questi dati identificano la fosforilazione di cofilina come un possibile marker di invasività nei tumori non secernenti. Ulteriori studi prospettici sono necessari per valutare come questo marker può essere utilizzato per predire il comportamento aggressivo del tumore e fornire informazioni utili alla prognosi. Questo potrebbe influenzare la gestione del paziente e l'uso di questi farmaci in clinica.

In conclusione, questi dati forniscono evidenze di un effetto negativo operato dall'attivazione del DRD2 sulla migrazione e invasione cellulare in cellule tumorali ipofisarie, suggerendo un possibile uso degli agonisti dopaminergici come terapia farmacologica nel trattamento degli NFPA.

Inoltre la presenza di un link tra il recettore della dopamina di tipo 2 e il pathway RHO/ROCK/LIMK/cofilina potrebbe rappresentare nuovi target farmacologici per il trattamento dei tumori ipofisari e più in generale dei tumori neuroendocrini.

## 6. REFERENZE

- Agnew BJ, Minamide LS, Bamburg JR. Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. *J Biol Chem.* 1995 Jul 21;270(29):17582-7.
- Ambrosi B, Faglia G, and the Multicenter Pituitary Tumour Study Group: Epidemiology of pituitary tumours, in Faglia G, Beck- Peccoz P, Ambrosi B, et al. (eds): *Pituitary Adenomas: New Trends in Basic and Clinical Research* Amsterdam: Excerpta Medica, 1991, pp 159–168
- An JJ, Cho SR, Jeong DW, Park KW, Ahn YS, Baik JH. Anti-proliferative effects and cell death mediated by two isoforms of dopamine D2 receptors in pituitary tumor cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2003 Aug 29;206(1-2):49-62.
- Andersen M, Bjerre P, Schrøder HD, Edal A, Høilund-Carlsen PF, Pedersen PH, Hagen C. In vivo secretory potential and the effect of combination therapy with octreotide and cabergoline in patients with clinically non-functioning pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001 Jan;54(1):23-30.
- Ando S, Sarlis NJ, Oldfield EH, Yen PM. Somatic mutation of TRbeta can cause a defect in negative regulation of TSH in a TSH-secreting pituitary tumor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Nov;86(11):5572-6.
- Andrianantoandro E, Pollard TD Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilina. *Mol Cell.* 2006 Oct 6;24(1):13-23.
- Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, Caroni P. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 1998; 393(6687):805-9. PMID: 9655397
- Asa SL. Practical pituitary pathology: what does the pathologist need to know? *Arch Pathol Lab Med.* 2008 Aug;132(8):1231-40. doi: 10.1043/1543-2165(2008)132[1231:PPPWDT]2.0.CO;2. Review.
- Asa SL. The role of hypothalamic hormones in the pathogenesis of pituitary adenomas. *Pathol Res Pract.* 1991 Jun;187(5):581-3
- Babu A, Luque RM, Glick R, Utset M, Fogelfeld L. Variability in quantitative expression of receptors in nonfunctioning pituitary macroadenomas-an opportunity for targeted medical therapy. *Endocr Pract.* 2014 Jan-Feb;20(1):15-25. doi: 10.4158/EP12411.OR.
- Barlier A, Vanbellinghen JF, Daly AF, Silvy M, Jaffrain-Rea ML, Trouillas J, Tamagno G, Cazabat L, Bours V, Brue T, Enjalbert A, Beckers A. Mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene are not highly prevalent among subjects with sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 May;92(5):1952-5. Epub 2007 Feb 13.
- Barnes WG, Reiter E, Violin JD, Ren XR, Milligan G, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation *J Biol Chem.* 2005 Mar 4;280(9):8041-50.
- Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev.* 2001 Dec;22(6):724-63.

- Bernard O. Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(6):1071-6. Epub 2006 Nov 28. Review.
- Bertherat J, Chanson P, Montminy M. The cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive factor CREB is constitutively activated in human somatotroph adenomas. *Mol Endocrinol.* 1995 Jul;9(7):777-83.
- Bevan JS, Burke CW. Non-functioning pituitary adenomas do not regress during bromocriptine therapy but possess membrane-bound dopamine receptors which bind bromocriptine. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1986 Nov;25(5):561-72
- Bevan JS, Webster J, Burke CW, Scanlon MF. Dopamine agonists and pituitary tumor shrinkage, *Endocr. Rev.* 13 (1992) 220–240
- Black PM, Hsu DW, Klibanski A, Kliman B, Jameson JL, Ridgway EC, Hedley-Whyte ET, Zervas NT. Hormone production in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Neurosurg.* 1987 Feb;66(2):244-50.
- Boikos SA, Stratakis CA. Pituitary pathology in patients with Carney Complex: growth-hormone producing hyperplasia or tumors and their association with other abnormalities. *Pituitary.* 2006;9(3):203-9. Review.
- Bolger GB, McCahill A, Huston E, Cheung YF, McSorley T, Baillie GS, Houslay MD. The unique amino-terminal region of the PDE4D5 cAMP phosphodiesterase isoform confers preferential interaction with beta-arrestins. *J Biol Chem.* 2003 Dec 5;278(49):49230-8. Epub 2003 Sep 18.
- Buckley N, Bates AS, Broome JC, Strange RC, Perrett CW, Burke CW, Clayton RN. p53 Protein accumulates in Cushing's adenomas and invasive non-functional adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Nov;79(5):1513-6. Corrected and republished in: *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 Feb;80(2):4 p following 692.
- Buurman H, Saeger W. Subclinical adenomas in postmortem pituitaries: classification and correlations to clinical data. *Eur J Endocrinol.* 2006 May;154(5):753-8.
- Cai S, Chen R, Li X, Cai Y, Ye Z, Li S, Li J, Huang H, Peng S, Wang J, Tao Y, Huang H, Wen X, Mo J, Deng Z, Wang J, Zhang Y, Gao X, Wen X. Downregulation of microRNA-23a suppresses prostate cancer metastasis by targeting the PAK6-LIMK1 signaling pathway. *Oncotarget.* 2015 Feb 28;6(6):3904-17
- Campbell KP, Stull JT. Skeletal muscle basement membrane-sarcolemma-cytoskeleton interaction minireview series. *J Biol Chem.* 2003 Apr 11;278(15):12599-600. Epub 2003 Jan 29.
- Carver LA, Bradfield CA. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem.* 1997 Apr 25;272(17):11452-6.
- Chahal HS, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, Korbonits M. Clinical, genetic and molecular characterization of patients with familial isolated pituitary adenomas (FIPA). *Trends Endocrinol Metab.* 2010 Jul;21(7):419-27. doi: 10.1016/j.tem.2010.02.007. Epub 2010 Jun 1. Review.

Chua BT, Volbracht C, Tan KO, Li R, Yu VC, Li P. Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction. *Nat Cell Biol.* 2003 Dec;5(12):1083-9. Epub 2003 Nov 23.

Clayton RN, Pfeifer M, Atkinson AB, Belchetz P, Wass JA, Kyrodimou E, Vanderpump M, Simpson D, Bicknell J, Farrell WE. Clin Different patterns of allelic loss (loss of heterozygosity) in recurrent human pituitary tumors provide evidence for multiclonal origins. *Cancer Res.* 2000 Oct;6(10):3973-82.

Colao A, Di Somma C, Pivonello R, Faggiano A, Lombardi G, Savastano S. Medical therapy for clinically non-functioning pituitary adenomas. *Endocr Relat Cancer.* 2008 Dec;15(4):905-15. doi: 10.1677/ERC-08-0181. Epub 2008 Sep 9. Review.

Colao A, Ferone D, Lastoria S, Cerbone G, Di Sarno A, Di Somma C, Lucci R, Lombardi G. Hormone levels and tumour size response to quinagolide and cabergoline in patients with prolactin-secreting and clinically non-functioning pituitary adenomas: predictive value of pituitary scintigraphy with <sup>123</sup>I-methoxybenzamide. *Clin. Endocrinol.* 52 (2000) 437–445.

Colao A, Pivonello R, Di Somma C, Savastano S, Grasso LF, Lombardi G. Medical therapy of pituitary adenomas: effects on tumor shrinkage. *Rev Endocr Metab Disord* 2009; 10(2):111-23.

Collazo J, Zhu B, Larkin S, Martin SK, Pu H, Horbinski C, Koochekpour S, Kyprianou N. Cofilin drives cell-invasive and metastatic responses to TGF- $\beta$  in prostate cancer. *Cancer Res.* 2014 Apr 15;74(8):2362-73.

Cramer LP Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility. *Biochem Soc Symp.* 1999;65:173-205. Review.

Cronin MJ, Thorner MO, Hellmann P, Rogol AD Bromocriptine inhibits growth hormone release from rat pituitary cells in primary culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1984 Feb;175(2):191-5.

Dawe HR, Minamide LS, Bamburg JR, Cramer LP. ADF/cofilin controls cell polarity during fibroblast migration. *Curr Biol.* 2003 Feb 4;13(3):252-7.

de Bruin TW, Kwekkeboom DJ, Van't Verlaat JW, Reubi JC, Krenning EP, Lamberts SW, Croughs RJ Clinically nonfunctioning pituitary adenoma and octreotide response to long term high dose treatment, and studies in vitro, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75 (1992)310–1317.

de Oliveira SK1, Smolenski A. Phosphodiesterases link the aryl hydrocarbon receptor complex to cyclic nucleotide signaling. *Biochem Pharmacol.* 2009 Feb 15;77(4):723-33. doi:10.1016/j.bcp.2008.08.027. Epub 2008 Aug 31.

Degani S, Balzac F, Brancaccio M, Guazzone S, Retta SF, Silengo L, Eva A, Tarone G. The integrin cytoplasmic domain-associated protein ICAP-1 binds and regulates Rho family GTPases during cell spreading. *J Cell Biol.* 2002 Jan 21;156(2):377-87. Epub 2002 Jan 21

Dekkers OM, Hammer S, de Keizer RJ, Roelfsema F, Schutte PJ, Smit JW, Romijn JA & Pereira AM. The natural course of non-functioning pituitary macroadenomas. *European Journal of Endocrinology.* 2007, 156 217–224.

- DeMali KA, Barlow CA, Burridge K Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol.* 2002 Dec 9;159(5):881-91. Epub 2002 Dec 9.
- Deyts C, Galan-Rodriguez B, Martin E, Bouveyron N, Roze E, Charvin D, Caboche J, Bétuing S. Dopamine D2 receptor stimulation potentiates PolyQ-Huntingtin-induced mouse striatal neuron dysfunctions via Rho/ROCK-II activation. *PLoS One.* 2009 Dec 15;4(12):e8287.
- Di Ieva A, Rotondo F, Syro LV, Cusimano MD, Kovacs K. Aggressive pituitary adenomas diagnosis and emerging treatments. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10(7):423-35.
- Ding Y, Milosavljevic T, Alahari SK. Nischarin inhibits LIM kinase to regulate cofilin phosphorylation and cell invasion. *Mol Cell Biol.* 2008 Jun;28(11):3742-56. doi: 10.1128/MCB.01832-07. Epub 2008 Mar 10.
- Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol.* 1999 Sep;1(5):253-9.
- Faglia G, Spada A. Genesis of pituitary adenomas: state of the art. *J Neurooncol.* 2001 Sep;54(2):95-110. Review.
- Ferone D, Lastoria S, Colao A, Varrella P, Cerbone G, Acampa W, Merola B, Salvatore M, Lombardi G. Correlation of scintigraphic results using 123I-methoxybenzamide with hormone levels and tumor size response to quinagolide in patients with pituitary adenomas. *C J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Jan;83(1):248-52.
- Ferrante E, Ferraroni M, Castrignanò T, Menicatti L, Anagni M, Reimondo G, Del Monte P, Bernasconi D, Loli P, Faustini-Fustini M, Borretta G, Terzolo M, Losa M, Morabito A, Spada A, Beck-Peccoz P, Lania AG. Non-functioning pituitary adenoma database: a useful resource to improve the clinical management of pituitary tumors. *Eur J Endocrinol.* 2006;155(6):823-9.
- Florio T, Barbieri F, Spaziante R, Zona G, Hofland LJ, van Koetsveld PM, Feelders RA, Stalla GK, Theodoropoulou M, Culler MD, Dong J, Taylor JE, Moreau JP, Saveanu A, Gunz G, Dufour H, Jaquet P. Efficacy of a dopamine-somatostatin chimeric molecule, BIM-23A760, in the control of cell growth from primary cultures of human non-functioning pituitary adenomas: a multi-center study. *Endocr Relat Cancer.* 2008;15(2):583-96
- Foord SM, Peters JR, Dieguez C, Scanlon MF, Hall R. Dopamine receptors on intact anterior pituitary cells in culture: functional association with the inhibition of prolactin and thyrotropin. *Endocrinology.* 1983 May;112(5):1567-77.
- Formosa R, Xuereb-Anastasi A, Vassallo J. Aip regulates cAMP signalling and GH secretion in GH3 cells. *Endocr Relat Cancer.* 2013 Jun 27;20(4):495-505. doi: 10.1530/ERC-13-0043. Print 2013 Aug.
- Frantz C, Barreiro G, Dominguez L, Chen X, Eddy R, Condeelis J, Kelly MJ, Jacobson MP, Barber DL. Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding. *J Cell Biol.* 2008 Dec 1;183(5):865-79. doi: 10.1083/jcb.200804161. Epub 2008 Nov 24.

- Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci.* 2001 Jan;22(1):32-9. Review.
- Gebäck T, Schulz MM, Koumoutsakos P, Detmar M. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *BioTechniques* 2009;46:265–274
- Gejman R, Swearingen B, Hedley-Whyte ET. Role of Ki-67 proliferation index and p53 expression in predicting progression of pituitary adenomas. *Hum Pathol.* 2008 May;39(5):758-66. doi: 10.1016/j.humpath.2007.10.004.
- Gillett GT, Fox MF, Rowe PS, Casimir CM, Povey S. Mapping of human non-muscle type cofilin (CFL1) to chromosome 11q13 and muscle-type cofilin (CFL2) to chromosome 14. *Ann Hum Genet.* 1996 May;60(Pt 3):201-11
- Goldsmith PC, Cronin MJ, Weiner RI. Dopamine receptor sites in the anterior pituitary. *J Histochem Cytochem.* 1979 Aug;27(8):1205-7.
- Greenman Y and Stern N. Non-functioning pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009;23:625-38
- Greenman Y, Ouaknine G, Veshchev I, Reider-Groswasser II, Segev Y, Stern N. Postoperative surveillance of clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas: markers of tumour quiescence and regrowth. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003 Jun;58(6):763-9.
- Greenman Y, Tordjman K, Osher E, Veshchev I, Shenkerman G, Reider-Groswasser II, Segev Y, Ouaknine G, Stern N. Postoperative treatment of clinically nonfunctioning pituitary adenomas with dopamine agonists decreases tumour remnant growth. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005 Jul;63(1):39-44.
- Grossman A, Ross R, Charlesworth M, Adams CBT, Wass JAH, Doniach I & Besser GM. The effect of dopamine agonist therapy on large functionless pituitary tumours. *Clinical Endocrinology* 1985, 22 679–686.
- Guillemin R. Hypothalamic hormones a.k.a. hypothalamic releasing factors. *J Endocrinol.* 2005 Jan;184(1):11-28. Review.
- Gurniak CB, Perlas E, Witke W The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. *Dev Biol.* 2005 Feb 1;278(1):231-41.
- Hedner P, Valdemarsson S. Reduced size of a hormonally silent pituitary adenoma during treatment with CV 205-502, a new dopamine agonist mainly stimulating D2 receptors. *Neurosurgery.* 1989 Dec;25(6):948-50.
- Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K, Melmed S. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990 Dec;71(6):1427-33.
- Hofmann UB, Westphal JR, Van Kraats AA, Ruiters DJ, Van Muijen GN. Expression of integrin alpha(v)beta(3) correlates with activation of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-

MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2000 Jul 1;87(1):12-9

Hotulainen P, Paunola E, Vartiainen MK, Lappalainen P. Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell*. 2005 Feb;16(2):649-64. Epub 2004 Nov 17.

Hussaini IM, Trotter C, Zhao Y, Abdel-Fattah R, Amos S, Xiao A, Agi CU, Redpath GT, Fang Z, Leung GK, Lopes MB, Laws ER Jr. Matrix metalloproteinase-9 is differentially expressed in nonfunctioning invasive and noninvasive pituitary adenomas and increases invasion in human pituitary adenoma cell line. *Am J Pathol*. 2007 Jan;170(1):356-65.

Hynes RO, Lively JC, McCarty JH, Taverna D, Francis SE, Hodivala-Dilke K, Xiao Q. The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2002;67:143-53. Review

Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, Narumiya S. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol*. 2000 May;57(5):976-83.

Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, Narumiya S. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol*. 2000 May;57(5):976-83.

Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature*. 1992 Sep 24;359(6393):295-300.

Jefferson G. Extrasellar Extensions of Pituitary Adenomas: (Section of Neurology). *Proc R Soc Med*. 1940 May;33(7):433-58. No abstract available

Kanasaki H, Fukunaga K, Takahashi K, Miyazaki K, Miyamoto E. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase activation in bromocriptine-induced apoptosis in rat pituitary GH3 cells. *Biol Reprod*. 2000 Jun;62(6):1486-94.

Katoh K, Kano Y, Amano M, Onishi H, Kaibuchi K, Fujiwara K. Rho-kinase--mediated contraction of isolated stress fibers. *J Cell Biol*. 2001 Apr 30;153(3):569-84

Katznelson L, Alexander JM, Klibanski A. Clinical review 45: Clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 May;76(5):1089-94. Review. No abstract available.

Kawamoto H, Uozumi T, Kawamoto K, Arita K, Yano T, Hirohata T. Type IV collagenase activity and cavernous sinus invasion in human pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien)*. 1996; 138(4) : 390-5.

Kim KM, Valenzano KJ, Robinson SR, Yao WD, Barak LS, Caron MG. Differential regulation of the dopamine D2 and D3 receptors by G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins. *J Biol Chem*. 2001 Oct 5;276(40):37409-14.

Kiuchi T, Nagai T, Ohashi K, Watanabe N, Mizuno K. Live-cell imaging of G-actin dynamics using sequential FDAP. *Bioarchitecture*. 2011 Sep 1;1(5):240-244.

- Klibanski A, Shupnik MA, Bikkal HA, Black PM, Kliman B & Zervas NT. Dopaminergic regulation of alpha-subunit secretion and messenger ribonucleic acid levels in alpha-secreting pituitary tumours. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1988. 66 96–102
- Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta*. 2000 Feb 15;291(2):113-35.
- Kovacs K, Scheithauer BW, Horvath E, Lloyd RV. The World Health Organization classification of adenohypophysial neoplasms. A proposed five-tier scheme. *Cancer*. 1996 Aug 1;78(3):502-10.
- Lamberts SWJ & MacLeod RM Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Reviews*. 1990, 70 279–318.
- Lamberts SWJ, de Herder WW, van der Lely AJ & Hofland LJ. Imaging and medical management of clinically nonfunctioning pituitary tumours. *Endocrinologist*. 1995, 5 448–451.
- Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature*. 1989 Aug 31;340(6236):692-6.
- Lania AG, Mantovani G, Ferrero S, Pellegrini C, Bondioni S, Peverelli E, Braidotti P, Locatelli M, Zavanone ML, Ferrante E, Bosari S, Beck-Peccoz P, Spada A. Proliferation of transformed somatotroph cells related to low or absent expression of protein kinase a regulatory subunit 1A protein. *Cancer Res*. 2004 Dec 15;64(24):9193-8
- Lee SP, O'Dowd BF, Rajaram RD, Nguyen T, George SR. D2 dopamine receptor homodimerization is mediated by multiple sites of interaction, including an intermolecular interaction involving transmembrane domain 4. *Biochemistry*. 2003 Sep 23;42(37):11023-31.
- Lidhar K1, Korbonits M, Jordan S, Khalimova Z, Kaltsas G, Lu X, Clayton RN, Jenkins PJ, Monson JP, Besser GM, Lowe DG, Grossman AB. Low expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal corticotroph cells, corticotroph tumors, and malignant pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Oct;84(10):3823-30.
- Lleva RR. Diagnosis and management of pituitary adenomas. *Curr Opin Oncol*. 2011 Jan;23(1):53-60. doi: 10.1097/CCO.0b013e328341000f. Review.
- Losa M, Franzin A, Mangili F, Terreni MR, Barzaghi R, Veglia F, Mortini P, Giovanelli M. Proliferation index of nonfunctioning pituitary adenomas: correlations with clinical characteristics and long-term follow-up results. *Neurosurgery*. 2000 Dec;47(6):1313-8; discussion 1318-9.
- Losa M, Mortini P, Barzaghi R, Ribotto P, Terreni MR, Marzoli SB, Pieralli S, Giovanelli M. Early results of surgery in patients with nonfunctioning pituitary adenoma and analysis of the risk of tumor recurrence. *J Neurosurg*. 2008 Mar;108(3):525-32. doi: 10.3171/JNS/2008/108/3/0525.
- Ma X, Zhao Y, Daaka Y, Nie Z. Acute activation of  $\beta$ 2-adrenergic receptor regulates focal adhesions through  $\beta$ Arrestin2- and p115RhoGEF protein-mediated activation of RhoA. *J Biol Chem*. 2012 Jun 1;287(23):18925-36.

- Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*. 1999 Aug 6;285(5429):895-8.
- Meador-Woodruff JH, Mansour A, Grandy DK, Damask SP, Civelli O, Watson SJ Jr. Distribution of D5 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Neurosci Lett*. 1992 Oct 12;145(2):209-12.
- Meiji BP, Lopes MS, Ellegala DB, Alden T, Laws Jr ER: The long-term significance of microscopic dural invasion in 354 patients with pituitary adenomas treated with transsphenoidal surgery. *J Neurosurg* 2002, 96:195–208
- Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(11):1603-18
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M & Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews* 1998 78 189–225.
- Mohammed, A.A., Rotondo, F., Munoz, D.G., Kovacs, K., Bilbao, J.M., Karamchandani, J.R., Di Ieva, A., Cusimano, M.D.1, 2015 Sep. Diagnostic and prognostic biomarkers of a sellar melanocytic tumor mimicking pituitary adenoma: case report and literature review. *Pathol. Res. Pract*. 211 (9), 682e687
- Monsalves E, Larjani S, Loyola Godoy B, Juraschka K, Carvalho F, Kucharczyk W, Kulkarni A, Mete O, Gentili F, Ezzat S, Zadeh G. Growth patterns of pituitary adenomas and histopathological correlates. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Apr;99(4):1330-8. doi: 10.1210/jc.2013-3054. Epub 2014 Jan 1.
- Nadella KS, Saji M, Jacob NK, Pavel E, Ringel MD, Kirschner LS. Regulation of actin function by protein kinase A-mediated phosphorylation of Limk1. *EMBO Rep*. 2009 Jun;10(6):599-605. doi: 10.1038/embor.2009.58. Epub 2009 May 8.
- Nagai S, Moreno O, Smith CA, Ivanchuk S, Romagnuolo R, Golbourn B, Weeks A, Seol HJ, Rutka JT. Role of the cofilin activity cycle in astrocytoma migration and invasion. *Genes Cancer*. 2011 Sep;2(9):859-69. doi: 10.1177/1947601911431839.
- Nagata-Ohashi K1, Ohta Y, Goto K, Chiba S, Mori R, Nishita M, Ohashi K, Kousaka K, Iwamatsu A, Niwa R, Uemura T, Mizuno K A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia. *J Cell Biol*. 2004 May 24;165(4):465-71.
- Nakayama K1, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*. 1996 May 31;85(5):707-20.
- Namkung Y, Sibley DR. Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem*. 2004 Nov 19;279(47):49533-41. Epub 2004 Sep 3.
- Nishita M, Tomizawa C, Yamamoto M, Horita Y, Ohashi K, Mizuno K Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration. *J Cell Biol*. 2005 Oct 24;171(2):349-59. Epub 2005 Oct 17.

- Niwa R, Nagata-Ohashi K, Takeichi M, Mizuno K, Uemura T. Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell*. 2002 Jan 25;108(2):233-46.
- Nobels FR, de Herder WW, van den Brink WM, Kwekkeboom DJ, Hofland LJ, Zuyderwijk J, de Jong FH & Lamberts SW. Long-term treatment with the dopamine agonist quinagolide of patients with clinically non-functioning pituitary adenoma. *European Journal of Endocrinology*. 2000, 143 615–621.
- Nomikos P, Ladar C, Fahlbusch R, Buchfelder M. Impact of primary surgery on pituitary function in patients with non-functioning pituitary adenomas -- a study on 721 patients. *Acta Neurochir (Wien)*. 2004 Jan;146(1):27-35. Epub 2004 Jan 7. Erratum in: *Acta Neurochir (Wien)*. 2004
- Ohta Y, Kousaka K, Nagata-Ohashi K, Ohashi K, Muramoto A, Shima Y, Niwa R, Uemura T, Mizuno K. Differential activities, subcellular distribution and tissue expression patterns of three members of Slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin. *Genes Cells*. 2003 Oct;8(10):811-24.
- Pederson T. As functional nuclear actin comes into view, is it globular, filamentous, or both? *J Cell Biol*. 2008 Mar 24;180(6):1061-4. doi: 10.1083/jcb.200709082. Epub 2008 Mar 17. Review.
- Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol*. 1997 Apr;11(4):433-41.
- Peverelli E, Mantovani G, Vitali E, Elli FM, Olgiati L, Ferrero S, Laws ER, Della Mina P, Villa A, Beck-Peccoz A, Spada A, Lania AG. Filamin-A is essential for dopamine D2 receptor expression and signaling in tumorous lactotrophs. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Mar;97(3):967-77
- Peverelli E, Olgiati L, Locatelli M, Magni P, Fustini MF, Frank G, Mantovani G, Beck-Peccoz P, Spada A, Lania A. The dopamine-somatostatin chimeric compound BIM-23A760 exerts antiproliferative and cytotoxic effects in human non-functioning pituitary tumors by activating ERK1/2 and p38 pathways. *Cancer Lett* 2010; 288(2):170-6.
- Pfannstiel J, Cyrklaff M, Habermann A, Stoeva S, Griffiths G, Shoeman R, Faulstich H. Human cofilin forms oligomers exhibiting actin bundling activity. *J Biol Chem*. 2001 Dec 28;276(52):49476-84. Epub 2001 Oct 25.
- Phillips, J., East, H.E., French, S.E., Melcescu, E., Hamilton, R.D., Nicholas, W.C., Fratkin, J.F., Parent, A.D., Luzardo, G., Koch, C.A., 2012 Oct-Dec. What causes a prolactinoma to be aggressive or to become a pituitary carcinoma? *Hormones (Athens)* 11 (4), 477e482.
- Pivonello R, Ferone D, Lombardi G, Colao A, Lamberts SW, Hofland LJ. Novel insights in dopamine receptor physiology. *Eur J Endocrinol*. 2007 Apr;156 Suppl 1:S13-21. Review. Erratum in: *Eur J Endocrinol*. 2007 Oct;157(4):543.
- Pivonello R, Matrone C, Filippella M, Cavallo LM, Di Somma C, Cappabianca P, Colao A, Annunziato L, Lombardi G. Dopamine receptor expression and function in clinically nonfunctioning pituitary tumors: comparison with the effectiveness of cabergoline treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Apr;89(4):1674-83.

- Popow-Woźniak A, Mazur AJ, Mannherz HG, Malicka-Błaszkiwicz M, Nowak D. Cofilin overexpression affects actin cytoskeleton organization and migration of human colon adenocarcinoma cells. *Histochem Cell Biol.* 2012 Nov;138(5):725-36.
- Pullan PT, Carroll WM, Chakera TM, Khangure MS & Vaughan RJ- Management of extra-sellar pituitary tumours with bromocriptine: comparison of prolactin secreting and non-functioning tumours using half-field visual evoked potentials and computerised tomography. *Australian and New Zealand Journal of Medicine.* 1985, 15 203–208
- Reddy R, Cudlip S, Byrne JV, Karavitaki N, Wass JA. Can we ever stop imaging in surgically treated and radiotherapy-naive patients with non-functioning pituitary adenoma? *Eur J Endocrinol.* 2011 Nov;165(5):739-44. doi: 10.1530/EJE-11-0566. Epub 2011 Sep 7.
- Regen CM, Horwitz AF. Dynamics of beta 1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts. *J Cell Biol.* 1992 Dec;119(5):1347-59.
- Renjie W, Haiqian L. MiR-132, miR-15a and miR-16 synergistically inhibit pituitary tumor cell proliferation, invasion and migration by targeting Sox5. *Cancer Lett.* 2015 Jan 28;356(2 Pt B):568-78.
- Renner U, Arzberger T, Pagotto U, Leimgruber S, Uhl E, Müller A, Lange M, Weindl A, Stalla GK. Heterogeneous dopamine D2 receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Apr;83(4):1368-75.
- Renner U, Mojto J, Lange M, Müller OA, von Werder K, Stalla GK, Effect of bromocriptine and SMS 201-995 on growth of humansomatotrophic and non-functioning pituitary adenoma cells in vitro *Eur. J. Endocrinol.* 130 (1994) 80–91
- Righi, A., Morandi, L., Leonardi, E., Farnedi, A., Marucci, G., Sisto, A., Frank, G., Faustini-Fustini, M., Zoli, M., Mazzatenta, D., Agati, R., Foschini, M.P., 2013 Nov. Galectin-3 expression in pituitary adenomas as a marker of aggressive behavior. *Hum. Pathol.* 44 (11), 2400e2409.
- Roelfsema F, Biermasz NR, Pereira AM. Clinical factors involved in the recurrence of pituitary adenomas after surgical remission: a structured review and meta-analysis. *Pituitary.* 2012 Mar;15(1):71-83. doi: 10.1007/s11102-011-0347-7. Review
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell.* 1999 Apr 16;97(2):221-31
- Roncaroli F, Scheithauer BW. Papillary tumor of the pineal region and spindle cell oncocytoma of the pituitary: new tumor entities in the 2007 WHO Classification. *Brain Pathol.* 2007 Jul;17(3):314-8.
- Rosenthal EL, Hotary K, Bradford C, Weiss SJ. Role of membrane type 1-matrix metalloproteinase and gelatinase A in head and neck squamous cell carcinoma invasion in vitro. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999 Oct;121(4):337-43.

Sameni M, Dosesco J, Sloane BF. Imaging proteolysis by living human glioma cells. *Biol Chem.* 2001 May;382(5):785-8.

Scheithauer BW, Kovacs KT, Laws ER Jr, Randall RV. Pathology of invasive pituitary tumors with special reference to functional classification. *J Neurosurg.* 1986 Dec;65(6):733-44.

Schwartz MA, Shattil SJ. Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends Biochem Sci.* 2000 Aug;25(8):388-91. Review.

Selman WR, Laws Jr ER, Scheithauer BW, Carpenter SM: The occurrence of dural invasion in pituitary adenomas. *J Neurosurg* 1986,64:402–407.

Senogles SE, Heimert TL, Odife ER & Quasney MW. A region of the third intracellular loop of the short form of the D2 dopamine receptor dictates Gi coupling specificity. *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279 1601–1606

Senogles SE. D2s dopamine receptor mediates phospholipase D and antiproliferation. *Mol Cell Endocrinol.* 2003 Nov 14;209(1-2):61-9.

Shome S, Dasgupta PS, Basu S. Dopamine regulates mobilization of mesenchymal stem cells during wound angiogenesis. *PLoS One.* 2012;7(2):e31682

Skalhegg BS, Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* 2000 Aug 1;5:D678-93. Review.

Smilenov LB, Mikhailov A, Pelham RJ, Marcantonio EE, Gundersen GG. Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science.* 1999 Nov 5;286(5442):1172-4.

Snyder PJ. Clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1993 Mar;22(1):163-75. Review.

Somlyo AV, Phelps C, Dipierro C, Eto M, Read P, Barrett M, Gibson JJ, Burnitz MC, Myers C, Somlyo AP. Rho kinase and matrix metalloproteinase inhibitors cooperate to inhibit angiogenesis and growth of human prostate cancer xenotransplants. *FASEB J.* 2003 Feb;17(2):223-34.

Spada A, Vallar L, Faglia G. G protein oncogenes in pituitary tumors. *Trends Endocrinol Metab.* 1992 Dec;3(10):355-60.

Spiegel AM. Mutations in G proteins and G protein-coupled receptors in endocrine disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Jul;81(7):2434-42. Review. No abstract available.

Stolp B, Reichman-Fried M, Abraham L, Pan X, Giese SI, Hannemann S, Goulimari P, Raz E, Grosse R, Fackler OT. HIV-1 Nef interferes with host cell motility by deregulation of Cofilin. *Cell Host Microbe.* 2009 Aug 20;6(2):174-86. doi: 10.1016/j.chom.2009.06.004.

Sumi T, Matsumoto K, Nakamura T. Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 2001 Jan 5;276(1):670-6.

- Takemura M, Mishima T, Wang Y, Kasahara J, Fukunaga K, Ohashi K, Mizuno K. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV-mediated LIM kinase activation is critical for calcium signal-induced neurite outgrowth. *J Biol Chem*. 2009 Oct 16;284(42):28554-62. doi: 10.1074/jbc.M109.006296. Epub 2009 Aug 20.
- Tordjman K, Stern N, Ouaknine G, Yossiphov Y, Razon N, Nordenskjöld M, Friedman E. Activating mutations of the Gs alpha-gene in nonfunctioning pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Sep;77(3):765-9.
- Toshima J, Toshima JY, Amano T, Yang N, Narumiya S, Mizuno K. Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol Biol Cell*. 2001 Apr;12(4):1131-45.
- Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hosoya H, Hartshorne DJ, Matsumura F. Activation of myosin phosphatase targeting subunit by mitosis-specific phosphorylation. *J Cell Biol*. 1999 Feb 22;144(4):735-44.
- Trivellin G, Korbonits M. AIP and its interacting partners. *J Endocrinol*. 2011 Aug;210(2):137-55. doi: 10.1530/JOE-11-0054. Epub 2011 Mar 31.
- Turner HE, Nagy Z, Sullivan N, Esiri MM, Wass JA. Expression analysis of cyclins in pituitary adenomas and the normal pituitary gland. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000 Sep;53(3):337-44.
- Turner HE. Audit of selected patients with nonfunctioning pituitary adenomas treated. et al. 1999, *Clinical Endocrinology*, Vol. 51, pp. 281–284
- Vallone D, Picetti R & Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2000 24 125–132
- Van Tol HH, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB, Jovanovic V Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature*. 1992 Jul 9;358(6382):149-52.
- Vandeva S, Jaffrain-Rea ML, Daly AF, Tichomirowa M, Zacharieva S, Beckers A. The genetics of pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010 Jun;24(3):461-76. doi: 10.1016/j.beem.2010.03.001. Review.
- Vargas G, Gonzalez B2, Ramirez C2, Ferreira A1, Espinosa E1, Mendoza V1, Guinto G3, Lopez-Felix B4, Zepeda E4, Mercado M2. Clinical characteristics and treatment outcome of 485 patients with nonfunctioning pituitary macroadenomas. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:756069. doi: 10.1155/2015/756069. Epub 2015 Feb 8.
- Vieira Neto L, Wildemberg LE, Moraes AB, Colli LM, Kasuki L, Marques NV, Gasparetto EL, de Castro M, Takiya CM, Gadelha MR. Dopamine receptor subtype 2 expression profile in non-functioning pituitary adenomas and in vivo response to cabergoline therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015; 82(5):739-46.
- Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gündogdu S, De Menis E, Mäkinen MJ, Launonen V, Karhu A,

- Aaltonen LA. Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science*. 2006 May 26;312(5777):1228-30.
- Wang W, Mouneimne G, Sidani M, Wyckoff J, Chen X, Makris A, Goswami S, Bresnick AR, Condeelis JS. The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. *J Cell Biol*. 2006;173(3):395-404.
- Wang Y, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Baron B, Yoshino S, Maehara S, Maehara Y, Oka M, Nakamura K. Cofilin-phosphatase slingshot-1L (SSH1L) is over-expressed in pancreatic cancer (PC) and contributes to tumor cell migration. *Cancer Lett*. 2015 May 1;360(2):171-6
- Williamson EA, Ince PG, Harrison D, Kendall-Taylor P, Harris PE G-protein mutations in human pituitary adrenocorticotrophic hormone-secreting adenomas. *Eur J Clin Invest*. 1995 Feb;25(2):128-31.
- Woloschak M, Roberts JL, Post K c-myc, c-fos, and c-myb gene expression in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Jul;79(1):253-7.
- Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta*. 2007 May;1773(5):642-52. Epub 2006 Jul 14.
- Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, Nishida E, Mizuno K. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature*. 1998 Jun 25;393(6687):809-12
- Yoder A, Yu D, Dong L, Iyer SR, Xu X, Kelly J, Liu J, Wang W, Vorster PJ, Agulto L, Stephany DA, Cooper JN, Marsh JW, Wu Y. HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells. *Cell*. 2008 Sep 5;134(5):782-92. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.036.
- Yonezawa K, Tamaki N, Kokunai T. Clinical features and growth fractions of pituitary adenomas. *Surg Neurol*. 1997 Nov;48(5):494-500.
- Yoshida D, Teramoto A. Elevated cell invasion is induced by hypoxia in a human pituitary adenoma cell line. *Cell Adh Migr*. 2007 Jan-Mar;1(1):43-51.
- Zada G, Woodmansee WW, Ramkissoon S, Amadio J, Nose V, Laws ER Jr. Atypical pituitary adenomas: incidence, clinical characteristics, and implications. *J Neurosurg*. 2011 Feb;114(2):336-44. doi: 10.3171/2010.8.JNS10290. Epub 2010 Sep 24.
- Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*. 2001 Oct;114(Pt 20):3583-90. Review.
- Zheng B, Han M, Bernier M, Wen JK. Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *FEBS J*. 2009 May;276(10):2669-85. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.06986.x. Review.