



UNIVERSITA' DI PISA

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Cellulare

Tesi di laurea

Espressioni delle varianti di “splicing” della fibronectina, durante la transizione epitelio-mesenchimale in linee tumorali della prostata

Relatore:

Prof. Mario Petrini

Candidata:

Simona Guendalina Manfrè

Anno Accademico 2013-2014

Indice

1.	Riassunto	pag. 3
2.	Introduzione	pag. 4
	2.1 Transizione epitelio-mesenchimale	pag. 5
	2.2 Ruolo della transizione epitelio-mesenchimale nei tumori	pag. 10
	2.3 Fibronectina e sue varianti di splicing	pag. 13
	2.4 Fibronectina oncofetale: ruolo fisiologico e nella patologia	pag.
	2.5 Tumore della prostata come modello di studio nella transizione epitelio-mesenchimale	
	2.6 Mesodermal Progenitor Cells (MPCs)	
3.	Scopo della tesi	
4.	Materiali e metodi	
	4.1 Colture cellulari e trattamento con TGF- β	
	4.2 Citofluorimetria	
	4.3 Western-blot	
	4.4 qRT-PCR	
	4.5 Analisi statistica	
5.	Risultati	
	5.1 Induzione della trasformazione EMT in cellule PC3	
	5.2 Induzione della trasformazione EMT in cellule DU145	
	5.3 Identificazione citofluorimetrica di cellule MSC, MPC durante induzione di trasformazione EMT nella linea cellulare PC3.	
	5.4 Studio delle varianti di splicing della FN in cellule PC3	
	5.5 Studio delle varianti di splicing della FN in cellule DU145	
6.	Discussione	
7.	Conclusioni	
8.	Bibliografia	

1. Riassunto

La Fibronectina (FN) è una glicoproteina della matrice extracellulare, fondamentale sia nell'embriogenesi, per la migrazione e il differenziamento cellulare, sia nel processo di cicatrizzazione, poiché favorisce la migrazione dei macrofagi e di altre cellule del sistema immunitario nell'area lesa. Un singolo gene codifica per la FN, tuttavia, nell'uomo sono state individuate 20 diverse varianti proteiche, tali varianti derivano da eventi di splicing alternativo di un dominio IIICS e di due esoni di tipo III chiamati Extra domini A e B (EDA e EDB). Una delle isoforme maggiormente studiata è la fibronectina oncofetale (fFN) espressa da cellule e tessuti sia embrionali che tumorali. Studi recenti indicano che l'espressione della fFN è particolarmente elevata nel cancro della prostata suggerendo l'utilizzo in radioterapia di anticorpi diretti contro questa isoforma, senza danneggiare l'epitelio ghiandolare prostatico normale che non esprime fFN. Inoltre la fFN è stata trovata non solo nel tumore primario ma anche in tumori secondari. Una delle ipotesi più recenti sostiene che il processo patologico, associato alla progressione neoplastica e alla metastatizzazione, possa verificarsi attraverso la transizione epitelio-mesenchimale (EMT).

Il nostro lavoro ha lo scopo di verificare l'associazione della EMT con l'induzione dell'espressione di fFN, in due linee cellulari di tumore della prostata, PC3 e DU145, utilizzando metodiche di biologia cellulare, molecolare e biochimiche. Le due linee cellulari sono state trattate con "transforming growth factor beta" (TGF- β), il principale induttore di EMT. Alla fine del trattamento, le cellule sono state sottoposte ad analisi di qRT-PCR e citofluorimetria indicando l'avvenuta transizione EMT come la riduzione dell'espressione di EpCAM ed E-caderina (E-cadh), entrambi marcatori delle linee epiteliali. Con la messa a punto di questi modelli sperimentali di EMT nel cancro alla prostata saranno studiate le isoforme della FN con particolare attenzione all'espressione di fFN attraverso l'utilizzo di: Western-blot, usando anticorpi specifici per verificare ed eventualmente confermare l'EMT.

2. Introduzione

2.1 Transizione epitelio-mesenchimale

Il termine transizione epitelio-mesenchimale (EMT) definisce una serie di eventi attraverso i quali le cellule epiteliali perdono alcune delle loro caratteristiche epiteliali e acquisiscono un fenotipo mesenchimale.

L' EMT è un processo dinamico e finemente regolato, ed è un evento fondamentale per gli esseri pluricellulari, in quanto permette la formazione di diversi tessuti e organi. Le prime descrizioni di tale processo, *in vitro*, risalgono ai primi anni 1980 da osservazioni fatte da Elizabeth Hay [Hay, 1995], e le prime scoperte lo definiscono fondamentale durante le fasi iniziali dello sviluppo embrionale [Nieto, 2011]. Studi successivi hanno evidenziato che l' EMT non solo è importante nell'embriogenesi e nell'organogenesi ma svolge un ruolo chiave anche in alcuni eventi patologici come il rimodellamento tissutale post infortunio [Weber et al., 2012] nella progressione tumorale e fibrogenesi [Klymkowsky et al., 2009]. Ulteriori studi di biologia cellulare e molecolare sulla EMT hanno evidenziato che genericamente questo programma viene definito da tre importanti cambiamenti del fenotipo cellulare [Boyer et al., 1993] [Hay, 1995]:

- ⌚ Cambiamento morfologico in coltura da un mono-strato di cellule epiteliali con polarità apicale-basale a cellule mesenchimali disperse a forma di fuso con sporgenze migratorie;
- ⌚ Cambiamento dei markers differenziativi da proteine di giunzione cellula-cellula e filamenti intermedi di citocheratina a filamenti di vimentina e fibronectina [Savagner et al., 1994];
- ⌚ Cambiamenti funzionali associati alla conversione da cellule stazionarie a cellule mobili che possono invadere la matrice extra cellulare (ECM).

Non sempre la EMT è associata ai tre tipi di cambiamenti; tuttavia la capacità di migrare e invadere l'ECM è considerata una caratteristica fondamentale del programma EMT.

La EMT si attiva a più passaggi di sviluppo embrionale per consentire la conversione di vari tipi di cellule epiteliali in mesenchimali. Questo processo non è irreversibile, il programma inverso, definito “transizione mesenchimale-epiteliale” (MET), si verifica sia durante l'embriogenesi che nel corso di diversi processi

patologici. [Boyer et al., 1993] [Davies, 1996]. La reversibilità di questo processo sottolinea l'enorme plasticità di alcune cellule embrionali e adulte che partecipano a processi di patogenesi della malattia.

Le cellule epiteliali formano generalmente un unico strato continuo in cui sono fittamente ammassate e strettamente unite mediante complessi giunzionali, tra cui desmosomi, giunzioni occludenti (tight junctions) e giunzioni serrate (gap junctions). Sono cellule polarizzate, in cui cioè è possibile individuare un polo basale, un polo apicale e dei poli laterali che differiscono tra loro nella distribuzione di marcatori di membrana e molecole di adesione, nella disposizione delle giunzioni intercellulari e degli organuli, nell'organizzazione del citoscheletro e nella funzione. Il polo basale è a contatto con la membrana basale, uno strato continuo di ECM specializzata a cui le cellule sono ancorate. Le molecole per l'adesione cellula-cellula coinvolgono membri della famiglia delle caderine, come la E-caderina, e hanno una localizzazione preferenziale sulle superfici laterali delle cellule, mentre le principali molecole per l'adesione con l'ECM si trovano al polo basale e appartengono alla famiglia delle integrine. Le cellule epiteliali possiedono inoltre filamenti intermedi di citocheratina, sono in grado di proliferare, ma non migrano al di fuori dell'epitelio e in coltura crescono in gruppi restando in contatto tra loro attraverso le giunzioni intercellulari.

Le cellule mesenchimali, invece, non formano strati organizzati, i contatti tra loro sono tipicamente ed esclusivamente focali e si stabiliscono attraverso numerose espansioni citoplasmatiche mediante la N-caderina. Molteplici sono invece i contatti con la matrice extracellulare, mediati dalle integrine. Le cellule mesenchimali non poggiano sulla membrana basale ma sono immerse in una matrice acellulare complessa e non presentano una polarizzazione nella distribuzione dei marcatori di membrana né del citoscheletro, inoltre possiedono filamenti intermedi di vimentina e hanno una forma irregolare, fusata o stellata; sono dotate di movimenti ameboidi e hanno la capacità di migrare. In coltura assumono una forma fibroblastoide e presentano le stress fibers. [Thiery et al., 2006]

L'EMT è un processo molto complesso a livello molecolare e coinvolge eventi biologici diversi. In un epitelio in transizione infatti scompare la polarizzazione, le giunzioni si disaggregano e i filamenti intermedi di citocheratina vengono sostituiti da stress fibers di F-actina. In seguito alla dissociazione delle giunzioni specializzate le cellule perdono i contatti intercellulari e assumono una forma allungata, riorganizzano il citoscheletro, acquisiscono nuovi recettori per la matrice

extracellulare ed esprimono le metalloproteasi (MMP) , che permettono alle cellule di attraversare la membrana basale, invadere la matrice sottostante e migrare.

Variazioni a livello molecolare osservate nell'EMT includono l'aumento dell'espressione di N-caderina, vimentina, α SMA (α Smooth Muscle Actin), Fibronectina, MMP-2, MMP-9, RhoB, LEF-1, p38MAPK; e la riduzione dell'espressione di E-caderina e citocheratina 18, la localizzazione nucleare della β -catenina, l'aumento della produzione dei fattori di trascrizione che inibiscono la produzione di E-caderina come Snail, Slug e Twist [Lamouille et al., 2014]. (figura1)

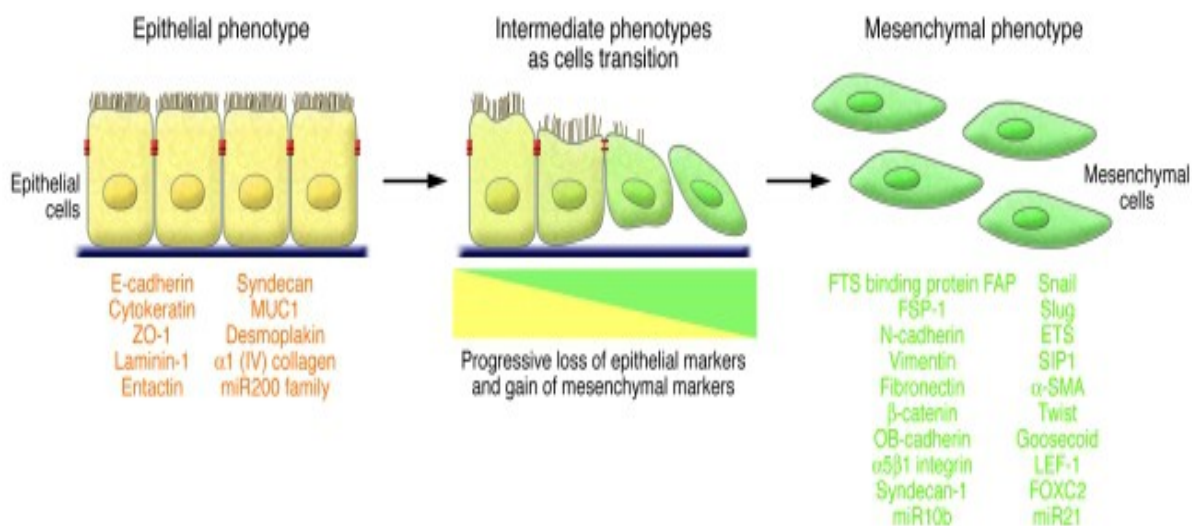


Figura 1.

L'EMT è indotta da segnali extracellulari, come componenti della matrice extracellulare, collagene e acido ialuronico, ma anche da fattori di crescita solubili come membri della famiglia del TGF- β (Transforming Growth Factor), dell'FGF (Fibroblast Growth Factor) o dell'EGF (Epidermal Growth Factor). Si tratta di fattori che legano recettori di membrana dotati di un dominio intracellulare con attività tirosin chinasi: dopo il legame con il ligando questo dominio del recettore viene fosforilato e recluta e attiva molecole effettrici intracellulari, come Ras, Rho, Rac e Src. Queste molecole, in particolare Ras, attivano il fattore trascrizionale Snail che inibisce l'espressione della E-caderina legando il promotore del gene e bloccandone l'espressione.

L'attivazione di Snail risulta quindi nella perdita dei marcatori epiteliali e nell'acquisizione di marcatori e di proprietà tipiche delle cellule mesenchimali come la morfologia di tipo fibroblastico, l'invasività e la capacità a migrare. Anche Wnt ha un ruolo importante nell'induzione dell'EMT: il suo legame al recettore inibisce l'attivazione di GSK3 β con conseguente aumento dei livelli citoplasmatici di β -catenina.

Quest'ultima migra nel nucleo e attiva la trascrizione di LEF-1, ciò porta ad una ridotta espressione di E-caderina e alla transizione delle cellule epiteliali verso il fenotipo mesenchimale [Kothari et al.,2014].

La EMT si può verificare in tre condizioni biologiche distinte con esiti funzionali differenti fra loro; è stata pertanto proposta una classificazione della EMT in tre diversi sottotipi a seconda del contesto biologico in cui essa si verifica, che prendono il nome di EMT di "Tipo 1", "Tipo 2", "Tipo 3" (Figura 2) [Kalluri et al., 2009].

EMT di Tipo 1

Nei primissimi stadi dell'embriogenesi, l'impianto dell'embrione e l'inizio della formazione della placenta sono entrambi associati ad una EMT che coinvolge l'endoderma. In particolare, le cellule del trofoblasto, precursori del citotrofoblasto, vanno incontro a EMT per facilitare l'invasione dell'endometrio e il conseguente corretto impianto dell'embrione. Durante lo sviluppo embrionale anche la fase di gastrulazione è interessata dal processo di EMT, attraverso il quale si arriva alla formazione dei tre foglietti embrionali [Vicovac et al.,1996], e le cellule epiteliali del neuroectoderma danno origine, sempre tramite EMT, a cellule migratorie della cresta neurale. A livello biochimico la EMT associata a questi processi di sviluppo è dipendente dal signaling di Wnt, mediato dal TGF- β [Kalluri et al., 2009].

EMT di Tipo 2

Questo tipo di EMT è associato alla fibrosi degli organi, processo che interessa alcuni tessuti epiteliali ed è mediato da cellule infiammatorie e fibroblasti che rilasciano una certa quantità di segnali pro-infiammatori, così come componenti della matrice extracellulare come collagene, laminina, elastina, fibronectina, e

tenascina. Durante la EMT di Tipo 2, le cellule epiteliali degli organi interessati continuano a mantenere una morfologia epiteliale e l'espressione di marcatori molecolari come citocheratine e caderina E, esprimendo allo stesso tempo il marcatore mesenchimale F SP1 (proteina specifica dei fibroblasti) e α -SMA (l'isoforma α dell'actina di muscolo liscio). Si trovano quindi in uno stadio intermedio definito "EMT parziale" [Kalluri et al., 2009].

EMT di Tipo 3

Questo tipo di EMT è associato alla progressione delle cellule neoplastiche che hanno subito in precedenza modifiche genetiche ed epigenetiche, in particolare di oncogeni e dei geni oncosoppressori, favorendo lo sviluppo di tumori localizzati. Cellule di carcinoma in fase EMT di tipo 3 possono invadere e metastatizzare, permettendo così la progressione tumorale [Kalluri et al., 2009].

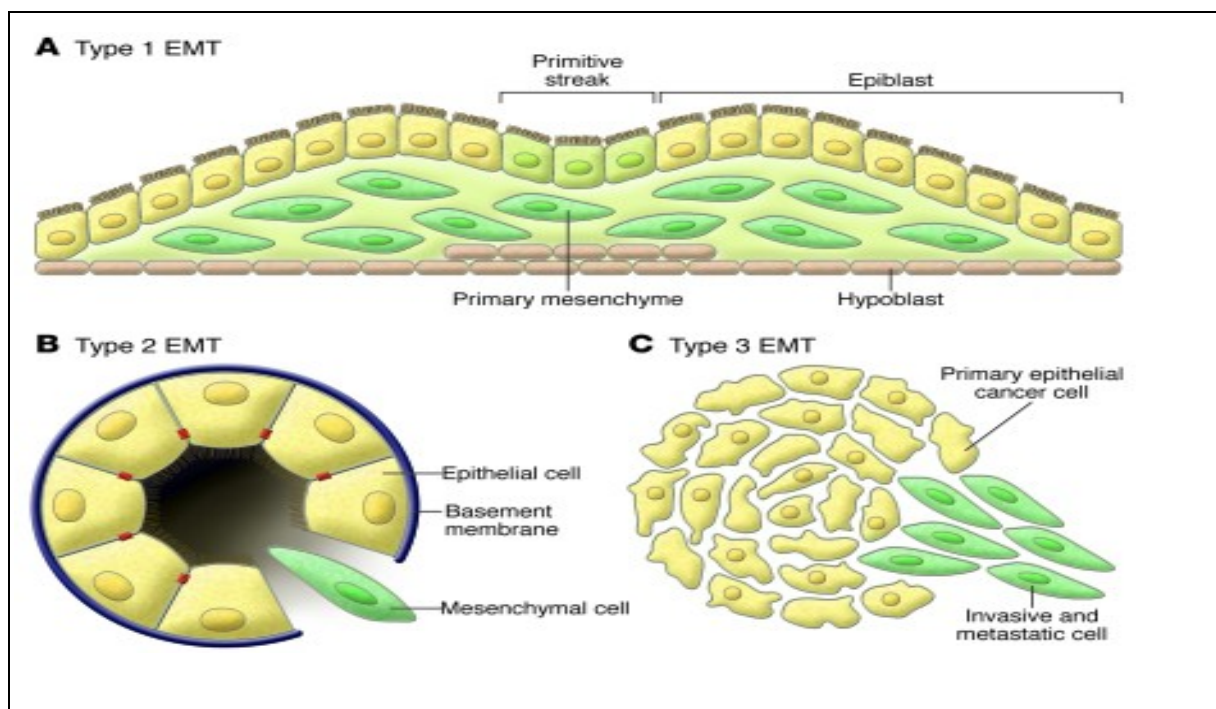


Figura 2.

2.2 Ruolo della transizione epitelio-mesenchimale nei tumori

I tumori primari epiteliali sono caratterizzati, in fase iniziale, da una crescita incontrollata determinata da una eccessiva proliferazione delle cellule epiteliali e da processi angiogenetici [Hanahan et al.,2000]. Le cellule che hanno acquisito un fenotipo invasivo cominciano ad invadere la membrana basale, questo evento segna l'inizio di un processo multifase che conduce alla diffusione delle metastasi in più distretti dell'organismo, con conseguente pericolo di vita. I controlli genetici e i meccanismi biochimici alla base dell'acquisizione del fenotipo invasivo e la successiva diffusione sistemica della cellula tumorale sono le aree più intensamente studiate. In molti di questi studi, la fase EMT è stata proposta come marker di malignità mediato dalle cellule tumorali epiteliali [Thiery,2002]. Esperimenti sui topi e con colture cellulari in vitro hanno dimostrato che le cellule di carcinoma possono perdere il fenotipo epiteliale e acquisirne uno mesenchimale esprimendo markers tipicamente mesenchimali come α -SMA, FSP1, vimentina, e desmina [Yang et al., 2008]. Queste cellule, di solito, si trovano sul fronte che interfaccia con lo stroma e sono le stesse cellule che nelle fasi successive invadono e metastatizzano. La EMT si configura, quindi, come un prerequisito per originare cellule tumorali capaci di infiltrare i tessuti circostanti e di metastatizzare (figura 3). Gli stadi legati al processo di invasione sono: l' intravasione, il trasporto attraverso il circolo sanguigno, extravasione, la formazione di micrometastasi, e in ultimo la colonizzazione (la crescita di piccole colonie in metastasi macroscopiche) [(Fidler et al.,2008) (Brabletz et al., 2001)] . Le cellule tumorali migratorie una volta superata la fase di EMT e stabilitesi in siti distanti formano colonie secondarie che somigliano, a livello istopatologico, a quelle del tumore primario da cui sono originate. Infatti, queste colonie non conservano per lungo tempo il fenotipo mesenchimale attribuito normalmente alle cellule che invadono ma revertono nel fenotipo originale. Questo comportamento è spiegato dal fatto che l' EMT per facilitare il processo di diffusione metastatica richiede alle cellule tumorali di perdere il fenotipo mesenchimale via MET durante la formazione del tumore secondario [Zeisberg et al., 2005]. L'induzione di EMT è probabilmente un meccanismo di importanza centrale nella progressione metastatica dei carcinomi e la successiva fase di MET è cruciale per indurre il processo di colonizzazione (figura 3). Tuttavia, molti aspetti di questo processo

meccanicistico non sono stati del tutto chiariti. L'utilizzo di nuovi modelli murini o sonde molecolari potrebbe far luce su vari aspetti legati ad EMT tra i quali, l'identificazione di tutti i segnali microambientali che inducono EMT o scoprire la natura dei cambiamenti a cui vanno incontro le cellule che le rendono sensibili ai segnali innescati da EMT o, in ultimo, chiarire la complessa via di segnalazione all'interno delle cellule epiteliali che orchestra i diversi programmi legati a EMT.

A differenza dell'EMT coinvolta nello sviluppo embrionale, che procede gradualmente sotto il controllo di segnali morfogenetici e generalmente correla con un cambiamento del destino cellulare, l'EMT oncogenica si verifica nel contesto di cambiamenti genetici imprevedibili presenti nelle cellule tumorali. Pertanto questo programma, nel cancro, è molto più difficile da prevedere e osservare in vivo, dal momento che solo un sottogruppo di cellule tumorali può subire EMT in qualsiasi momento. [Micalizzi et al., 2010].

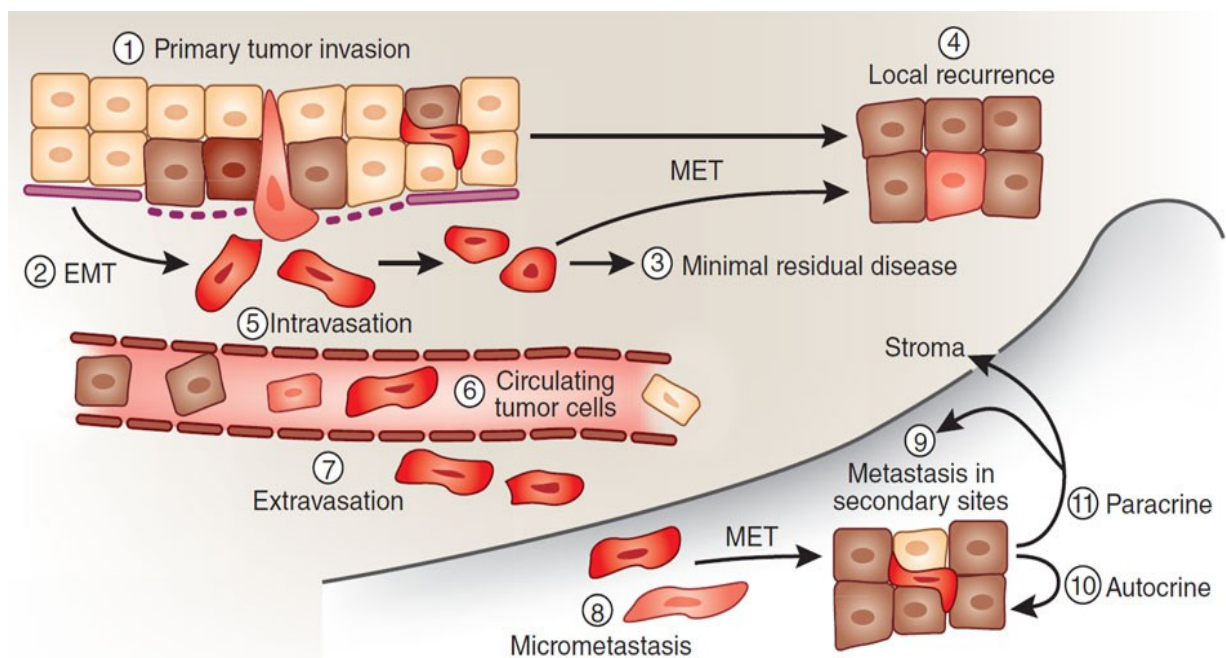


Figura 3.

Nella EMT si assiste spesso a questo avvicendamento di caderine tra l'E-caderina e la N-caderina. La funzione delle caderine dipende dalla loro associazione con il citoscheletro d'actina ed è mediata per mezzo dell'interazione tra la regione C-terminale delle caderine stesse e le proteine citoplasmatiche chiamate catenine. La stabilità dell'associazione tra le caderine e il citoscheletro d'actina è regolata dalla fosforilazione e defosforilazione della β -catenina. Questa è anche coinvolta nella regolazione

dell'espressione genica come mediatore della via di trasduzione del segnale Wnt, il quale controlla la sorte cellulare, e nell'EMT, in cui la β -catenina può essere presente all'interno del nucleo. Vi è inoltre la superfamiglia di fattori di trascrizione SNAIL, ZEB e TWIST che si attivano durante il processo EMT [(Acloque et al.,2009) (Zeisberg et al., 2009)]. In particolare SNAIL 1 e 2 sono in grado di reprimere la trascrizione dell'E-caderina, di aumentare l'espressione e l'attività delle MMP della matrice, di mediare l'EMT e l'invasione in linee cellulari di neoplasie umane.

La dimostrazione più evidente del coinvolgimento dell'EMT nella progressione dei tumori è la capacità da parte di molteplici regolatori dell'EMT di aumentare la formazione di tumori e/o metastasi: l'espressione di Snail aumenta l'aggressività di tumori della mammella indotti sperimentalmente e un'alta espressione di Snail è correlata ad un aumentato rischio di recidive e ad una minore sopravvivenza nel cancro della mammella nell'uomo [(Willis et al., 2005) (Sleeman,2000)]. Snail è espresso specificamente anche nel cancro invasivo del colon, nelle cellule che hanno oltrepassato la membrana basale, hanno perso l'espressione di E-caderina e presentano positività nucleare per β -catenina. La perdita di E-caderina è infatti segno caratteristico di carcinoma metastatico [De Craene et al.,2005]. L'EMT sembra avere un ruolo importante anche nel turnover cellulare dell'intestino nell'adulto: studi recenti hanno dimostrato che cellule mesoteliali della sierosa intestinale, che esprimono la proteina WT1, vanno incontro ad EMT. Le cellule mesenchimali così formate, se opportunamente stimolate, danno origine a cellule muscolari lisce dei vasi e ad altre linee cellulari dell'intestino [Wada et al.,2003] . Nel tumore al colon, le cellule che presentano proprietà di EMT sono localizzate alla periferia del tumore in cui sono pronte ad attivare tale processo [Usami et al., 2008].

Negli ultimi anni anche la Vimentina (VIM) ha acquisito molta importanza come marcatore di EMT [Satelli et al, 2011]. La VIM , un importante membro della famiglia proteica dei filamenti intermedi (IF) è ubiquitariamente espressa nelle cellule mesenchimali normali e svolge un ruolo nel mantenimento dell'integrità cellulare e fornisce resistenza contro lo stress. Un'elevata espressione della VIM è stata osservata in vari tumori epiteliali tra cui il cancro alla prostata, tumori gastrointestinali, tumori del sistema nervoso centrale, cancro al seno, melanoma maligno, cancro al polmone e altri tipi di tumori [Satelli et al., 2011] .

2.3 Fibronectina e sue varianti di splicing

Le fibronectine (FN) sono proteine appartenenti alla famiglia delle glicoproteine dimeriche, abbondanti nella matrice extracellulare (ECM). Vengono prodotte da diversi tipi di cellule e tessuti, sottoforma di dimero solubile e successivamente assemblate all'interno di fibrille multimeriche insolubili a livello della superficie cellulare. La ECM è una miscela di molti componenti molecolari differenti che variano tra organismi diversi e tra tessuti dello stesso organismo e talvolta variano con l'età dello sviluppo. Non è una struttura statica ma altamente dinamica che non solo fornisce un quadro fisico per cellule all'interno dei tessuti connettivi, ma genera anche segnali per lo sviluppo, l'omeostasi tissutale e le funzioni cellulari di base attraverso la sua composizione e capacità di esercitare forze meccaniche. L'ECM è composto da tre classi principali di macromolecole: proteine strutturali (collagene ed elastina), proteine specializzate (fibrillina, laminina, e FN), e glicosaminoglicani. Tra tutti i componenti della ECM, nei vertebrati, la FN ha ricevuto notevole attenzione per il suo ruolo nelle interazioni cellula-matrice. Questa glicoproteina è di fondamentale importanza per lo sviluppo dei vertebrati, in quanto embrioni di topi "knock-out" per il gene della FN presentano una precoce letalità [Freire-de-Lima, 2014]. La FN è anche uno dei più noti esempi di famiglia proteica generata da splicing alternativo di un singolo pre-mRNA che può generare almeno 20 diverse isoforme nell'uomo. Negli ultimi anni, notevoli progressi per chiarire le funzioni delle isoforme di splicing alternativo della FN sono stati ottenuti con lo sviluppo di topi ingegnerizzati [White et al., 2008]. Il gene della fibronectina, localizzato sul cromosoma 2, è stato uno dei primi geni individuato a subire splicing alternativo ([Kornblihtt et al., 19984]; [Kornblihtt et al., 19984]; [Schwarzbauer et al., 1983]; [White et al., 2008]) ed è uno dei modelli più studiati di splicing alternativo ([Buratti et al., 2004]; [Chauhan et al., 2004]; [Srebrow et al., 2002]; [White et al., 2008]). La FN è una glicoproteina multidominio che viene sintetizzata da molti tipi cellulari e secreta come dimero di subunità antiparallele quasi identiche di ~ 250 kDa legate covalentemente da due ponti disolfuro alla loro estremità C-terminale ([Pankov et al., 2002] [French-Constant, 1995] [Mao et al., 2005] [Barber et al., 2014]).

Le molecole di FN mature comprendono una serie di sequenze amminoacidiche ripetute, definite come moduli strutturali F-I, F-II e F-III. Dodici moduli F-I costituiscono la regione amino-terminale e C-terminale della molecola, e sono coinvolti principalmente nel legame di fibrina e collagene. Solo due moduli F-II si trovano nella FN e servono per legare il collagene. Il modulo più abbondante nella FN è F-III, che contiene la sequenza di riconoscimento del recettore RGD-FN con siti di legame per altre integrine e componenti della ECM [Bissell et al., 2001]. A seconda del tipo di tessuto e / o le condizioni cellulari, la molecola FN è costituito da 15-17 moduli F-III. La regione V, che non rientra in nessuna di queste categorie, con in più il dominio B (EDB) e il dominio aggiuntivo A (EDA) (entrambi moduli F-III), è regolata tramite splicing alternativo del pre-mRNA di FN [Radtke et al., 2005]. La regione V o IIICS si trova tra i moduli F-I e F-III è in grado di generare cinque (V0, V64, V89, V95 e V120) diverse varianti dopo lo splicing alternativo ([Radtke et al., 2005]; [Bissell et al.,2001]) (Figura 4). Tutte le varianti, eccetto V0 possono contenere l'esapeptide (VTHPGY) che può essere *O*-glycosylated sul suo residuo Thr da uno specifico enzima : GalNAc-T.

Un importante tipo di splicing avviene all'interno del gruppo centrale dei domini di tipo III, dove un "Exon skipping" porta o all'inclusione o l'esclusione di uno dei due domini aggiuntivi di tipo III EDB o EDA. Questo tipo di splicing è presente in molti vertebrati, tra cui *Xenopus*, pollo, topo e uomo.

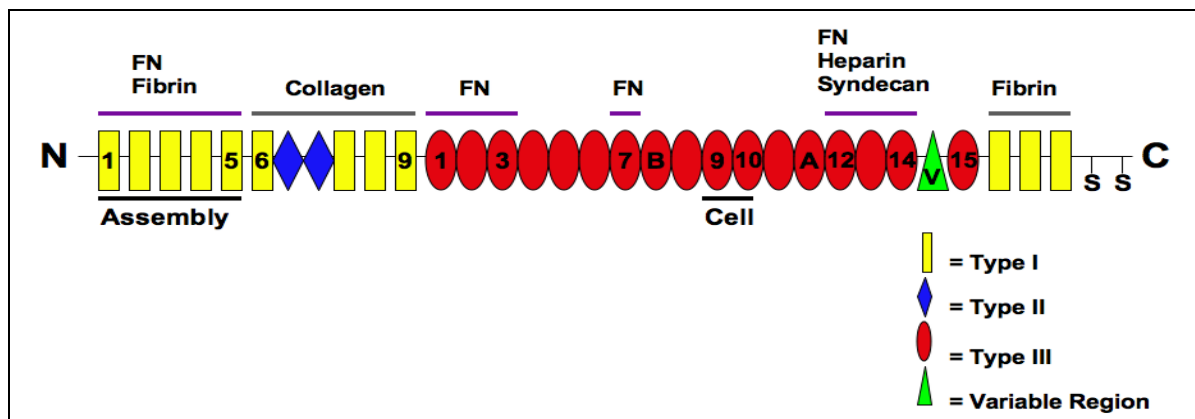


Figura 4

Una terza regione di splicing alternativo è localizzato nella regione V (di lunghezza variabile) o IIICS. Le variazioni strutturali in questa regione sono più complesse e specie dipendenti. Nella maggior parte delle specie studiate fino ad oggi, ad eccezione del pollo, questa regione può essere parzialmente o completamente inclusa o esclusa; per esempio, nella FN umana, ci possono essere cinque diverse varianti [Pankov et al., 2002]. Un quarto tipo di splicing si trova nella cartilagine, dove la forma predominante di FN manca dell'intera regione V. [Pankov et al., 2002]

La FN si può trovare nel plasma e in altri fluidi corporei come dimero solubile e nella ECM in forma insolubile. La FN plasmatica è sintetizzata dagli epatociti e secreta nel plasma sanguigno, dove circola a 300-400 mcg/ ml in forma inattiva [Zardi et al., 1979]. La FN cellulare viene sintetizzata da molti tipi cellulari, inclusi i fibroblasti, cellule endoteliali, condrociti cellule sinoviali e miociti [Mao et al., 2005].

La FN è presente solo nei vertebrati e la sua comparsa nell'evoluzione correla con la presenza di organismi dotati di endotelio vascolare. La FN è una glicoproteina multifunzionale che determina l'integrità tissutale e svolge varie funzioni in diversi organi e tessuti, svolge un ruolo importante nella adesione, la migrazione, la crescita e il differenziamento cellulare. Durante la riparazione dei tessuti, la FN viene convertita da molecola solubile inattiva, in fibrille biologicamente attive attraverso un processo dipendente dalle cellule [Roy et al., 2013], partecipa ad ogni fase della guarigione della ferita: emostasi, infiammazione, proliferazione e rimodellamento tissutale [Lenselink, 2013]. Nel corpo la FN viene rapidamente up-regolata in risposta al danno tissutale, diminuzioni dei livelli di FN sono stati osservati in caso di ferite "non healing" [Herrick et al., 1992]; mentre la deposizione nella matrice di FN aberrante può portare a malattie fibrotiche, con conseguente compromissione della funzione dell'organo [To et al., 2011]. In altri processi fisiologici e patologici si è visto che la FN plasmatica è essenziale per proteggere le cellule neuronali e non neuronali dall'apoptosi dopo ischemia focale transitoria del tessuto cerebrale [Sakai et al., 2001] e dopo traumi cerebrali [Tate et al., 2007] mentre la FN cellulare non è espressa in questi tessuti cerebrali danneggiati [To et al., 2011]. Le varianti di splicing della FN contenente i domini EDA e EDB sono sovra espresse nello sviluppo vascolare durante l'embriogenesi e in condizioni patologiche tra cui l'aterosclerosi, l'ipertrofia cardiaca e nei tumori [Astrofet et al., 2009].

La variante di splicing contenente il dominio EDB è altamente espressa durante l'angiogenesi nei tessuti neoplastici e normali [The MICAD Research Team, 2007], ma alti livelli di espressione della FN-EDB⁺ sono stati trovati nei tumori primari e metastatici al seno, al colon-retto e polmoni ([Santimaria et al., 2003]; [The MICAD Research Team, 2007])

Queste varianti di splicing nell'adulto sono spesso definite "fibronectina oncofetale" (fFN) per specificare la loro presenza durante l'embriogenesi e nei tumori [Ruoslahti, 2002].

2.4 Fibronectina oncofetale: ruolo fisiologico e nella patologia

I domini più abbondanti nella FN vengono classificati come FN-III e costituiscono la maggior parte della porzione interna della molecola. A differenza dei moduli di tipo I e II, quelli di tipo III non sono stabilizzati da legami disolfuro intradominio. Il dominio di tipo III costituisce la parte più eterogenea di questa proteina in quanto vi sono diverse varianti nell' uomo derivanti da eventi di splicing alternativo. L'espressione di queste isoforme è tessuto-specifica suggerendo un loro significato funzionale.

L'angiogenesi è un evento essenziale durante la tumorigenesi e spesso è accompagnata da aumentati livelli di espressione di due cosiddette isoforme "oncofetali" della fibronectina (fFN), che sono presenti solo durante lo sviluppo embrionale e la guarigione delle ferite [Schiefner et al., 2012]. Queste due varianti di splicing contengono i domini extra di tipo-III EDA e/o EDB.

Ulteriori studi hanno messo in evidenza la presenza di una terza isoforma oncofetale della FN dovuta a una *O-glicosilazione* sito specifica nel dominio IIICS della FN [Alisson-Silva et al., 2013].

La glicosilazione è una classe principale delle modificazioni post-traduzionali. Esistono due tipi fondamentali della glicosilazione delle proteine: N-glicosilazione e O-glicosilazione.

Modifiche dello stato di glicosilazione cellulare sono caratteristiche comuni di trasformazione maligna e progressione tumorale.

Nel 1985, Matsuura e Hakomori svilupparono un anticorpo monoclonale (mAB) chiamato FDC-6, che inizialmente reagiva con la FN cellulare espressa dai fibroblasti, ma non con l'isoforma plasmatica. Inoltre, gli autori dimostrarono che la FN isolata dai tessuti normali adulti non reagiva con FDC-6, mentre nella FN isolata da linee cellulari stabilizzate, come tessuti fetali e tumorali vi era una struttura extra che favoriva il legame con FDC-6. Questa FN venne definita fFN.

Attraverso la digestione proteolitica delle glicoproteine si vide che la struttura riconosciuta dall'anticorpo FDC-6 era presente nella regione variabile (V) o dominio IIICS della FN [Matsuura et al., 1985]. In seguito alla caratterizzazione della struttura primaria del dominio IIICS, Matsuura e colleghi isolarono la struttura specifica per il legame di FDC-6. Il confronto di questa struttura con altre che non

permettono il legame con l'anticorpo ha mostrato che l'epitopo che lega FDC-6 è composto da un GalNAc legato alla treonina (Thr) dell'esapeptide VTHPGY (Figura 5).

Questa FN glicosilata è specifica per i tessuti fetali e tumorali ed è assente nei normali tessuti adulti ([Matsuura et al., 1989]; [Freire-de-Lima, 2014]).

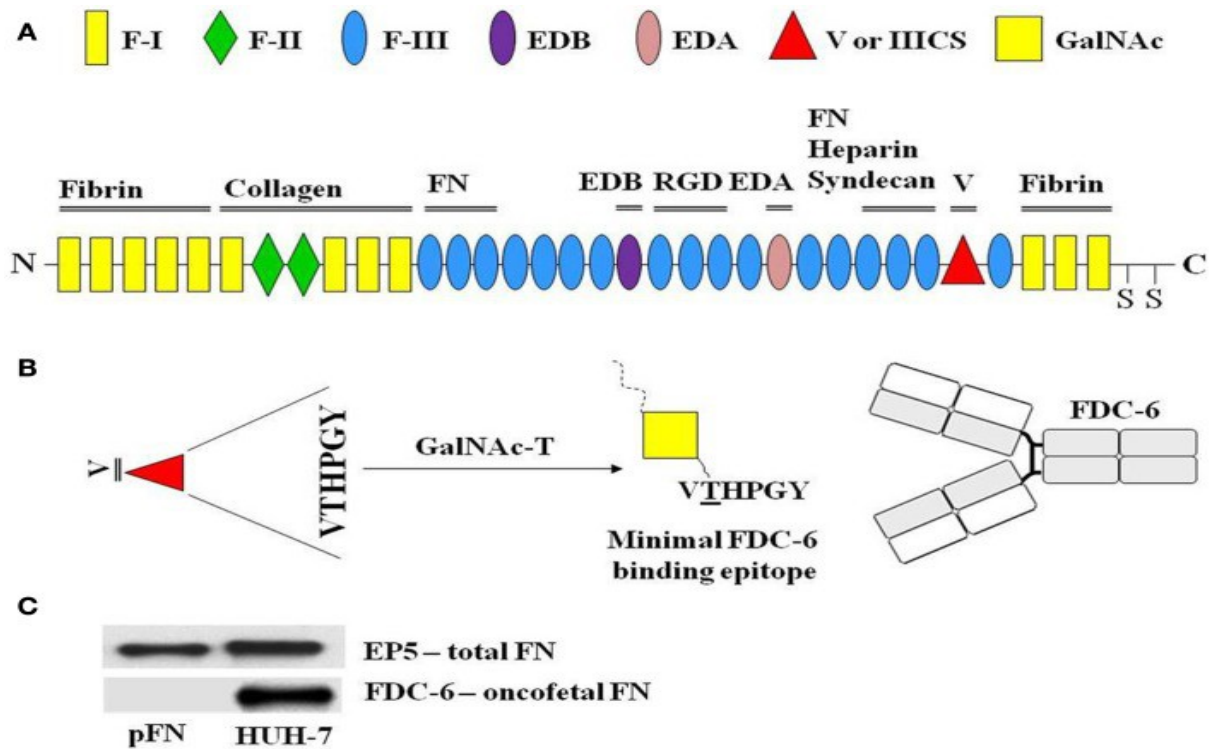


Figura 5.

La variante di splicing FN-EDB⁺ è costituita da 91 amminoacidi [Castellani et al., 2002], non è rilevabile in tessuti normali ad eccezione del sistema riproduttivo femminile dove il rimodellamento dei tessuti e l'angiogenesi sono processi fisiologici ricorrenti. E' up-regolato nei tessuti neoplastici e fetali [Carnemolla et al., 1989].

Poiché FN-EDB⁺ si accumula intorno alla neovascolarizzazione durante i processi angiogenetici ma non intorno ai vasi maturi, viene considerato un indicatore ideale di angiogenesi e la sua visualizzazione mediante immunostochimica può fornire informazioni sul livello di attività angiogenetica che avviene all'interno di un tessuto [Castellani et al., 1994].

E' stato prodotto un anticorpo ricombinante umano, L19, che reagisce specificamente con il dominio EDB della FN [Pini et al., 1998], e hanno recentemente dimostrato che L19 radiomarcato è in grado di riconoscere selettivamente e specificamente i vasi sanguigni tumorali non solo in modelli animali sperimentali, ma anche nei pazienti [Poli et al., 2013].

Un recente lavoro su un modello murino con soppressione simultanea dei due esoni EDA e EDB dal gene della FN ha iniziato a far luce sul ruolo delle due isoforme nello sviluppo vascolare [Astrof et al., 2007]. In questo modello murino ingegnerizzato, il fenotipo mostrava letalità embrionale a E10.5 con penetranza incompleta, presentando vari difetti cardiovascolari, insieme a una riduzione delle cellule α -SMA a E9.5 [White et al., 2011]. Questi risultati supportano un ruolo nello sviluppo cardiovascolare delle isoforme FN-EDB⁺ e EDA⁺ [Astrof et al., 2007]. Questi domini possono avere una qualche funzione ridondante, poiché l'inclusione di uno di essi nella molecola FN è sufficiente per conseguire il normale sviluppo dei vasi sanguigni [White et al., 2011].

L'isoforma FN-EDA⁺ ha dimostrato di avere un ruolo diretto e cruciale nella morfogenesi della valvola linfatica [Bazigou et al., 2009] suggerendo un probabile coinvolgimento nel linfedema primario.

La deposizione della FN-EDA⁺ nella ECM della "valve-leaflet" e la sua interazione con l'integrina $\alpha 9$ sono necessari per la normale formazione della valvola linfatica. La mancata interazione dovuta all'assenza del ligando o del recettore (o di entrambi), produce "leaflet" valvolari difettosi incapaci di evitare un patologico flusso retrogrado del fluido linfatico [Bazigou et al., 2009]. Coerentemente con questa osservazione, topi *nulli* per l'integrina $\alpha 9\beta 1$ si sviluppano normalmente, sono vitali, e muoiono poco dopo la nascita a causa di un difettoso sviluppo del sistema linfatico [Huang et al., 2000].

Da questi risultati si evince che FN-EDA⁺, l'integrina $\alpha 9$ e la loro interazione è importante per lo sviluppo e la funzionalità el sistema linfatico.

Nei tessuti adulti la presenza del dominio EDA nella molecola della FN è stata riscontrata in importanti processi patologici come l'aterosclerosi ([Tan et al., 2004] [Babaev et al., 2008]), fibrosi polmonare ([Hernnas et al., 1992];[Muro et al., 2008]) e fibrosi epatica [Jarnagin et al., 1994].

2.5 Tumore della prostata come modello di studio nella transizione

epitelio- mesenchimale

La prostata è una ghiandola presente solo negli uomini che produce una parte del liquido seminale rilasciato durante l'eiaculazione. E' a forma di cono appiattito con la base posta in alto e l'apice in basso. In condizioni normali, ha la dimensione di una noce, ma con il passare degli anni o a causa di alcune patologie può ingrossarsi fino a dare disturbi soprattutto di tipo urinario. E' situata davanti al retto, sotto la vescica e dietro la sinfisi pubica; è rivestita da un sottile involucro fibromuscolare, la capsula prostatica, ed è attraversata interamente dall'uretra. La prostata è suddivisa in quattro zone: la zona di transizione che costituisce il 5% della ghiandola, la zona centrale che rappresenta il 2% circa della ghiandola, la zona periferica che comprende il 70-75% di tutto l'organo e lo stroma fibromuscolare che costituisce il restante 18% della ghiandola ed è posizionato anteriormente.

Questa ghiandola è molto sensibile all'azione degli ormoni, in particolare di quelli maschili, come il testosterone, che ne influenzano la crescita. Il tumore alla prostata ha origine proprio dalle cellule secretorie presenti all'interno della ghiandola che cominciano a crescere in maniera incontrollata.

Nella prostata sono presenti diversi tipi di cellule, ciascuna delle quali può trasformarsi e diventare cancerosa, ma quasi tutti i tumori prostatici diagnosticati originano dalle cellule della ghiandola e sono di conseguenza chiamati adenocarcinomi. Oltre all'adenocarcinoma, nella prostata si possono trovare in rari casi anche sarcomi, carcinomi a piccole cellule e carcinomi a cellule di transizione.

La regione della ghiandola dove più frequentemente origina la malattia (75% dei casi) è la zona periferica della prostata che non ha contatto diretto con le vie urinarie (questo spiegherebbe come mai la sintomatologia sia pressoché assente negli stadi iniziali della malattia).

L'adenocarcinoma della prostata è il tumore maligno più frequente negli uomini, ed è al secondo posto come causa di morte per cancro negli Stati Uniti [Siegel et al., 2014].

Molto più comuni sono invece le patologie benigne che colpiscono la prostata, soprattutto dopo i 50 anni, e che talvolta provocano sintomi che potrebbero essere confusi con quelli del tumore.

Nell'iperplasia prostatica benigna la porzione centrale della prostata si ingrossa e la crescita eccessiva di questo tessuto comprime l'uretra provocando problemi nel passaggio dell'urina.

Nelle sue fasi iniziali, il tumore della prostata è asintomatico e viene diagnosticato in seguito alla visita urologica, che comporta esplorazione rettale, o controllo dell' antigene prostatico specifico (PSA) con un prelievo di sangue.

Le cellule tumorali prostatiche durante il processo di progressione e metastasi attraversano numerosi passaggi. Le cellule tumorali dal sito primario migrano in un luogo adiacente, invadendo i vasi sanguigni, in seguito alla EMT [Sakamoto et al., 2014].

Il tumore alla prostata è un tumore androgeno/dipendente. Durante le fasi iniziali della tumorigenesi, le cellule prostatiche tumorali per stimolare la crescita e inibire l'apoptosi hanno bisogno degli androgeni; di conseguenza il trattamento di tumori prostatici localizzati viene effettuata mediante deprivazione androgenica chirurgica o farmacologia [Nieto et al., 2007]. Tuttavia, nonostante il successo iniziale, dopo 2-3 anni, un certo numero di pazienti recidivi si sviluppa il tumore alla prostata metastatico resistente a castrazione [Harris et al., 2009].

Recenti studi suggeriscono un coinvolgimento del programma EMT durante la progressione tumorale, tra cui il cancro alla prostata [Matuszak et al., 2011]. L'epitelio adulto ospita un programma EMT dormiente attraverso fattori che mantengono i processi EMT in uno stato di quiescenza [Acloque et al., 2009]. Durante alcune patologie l'omeostasi epiteliale viene alterata di conseguenza viene riattivato il processo EMT [Thiery et al., 2009].

Recentemente sono emerse prove a sostegno del coinvolgimento dei processi EMT nella de-regolazione nella produzione degli androgeni, che si verifica durante lo sviluppo di carcinomi androgeno-indipendente avanzati. Inoltre è stata dimostrata la capacità degli androgeni di indurre indipendentemente l' EMT all'interno delle cellule tumorali di prostata, con conseguenti modifiche di invasione e motilità cellulare. Bassi livelli di androgeni possono promuovere EMT e la diffusione delle cellule tumorali [Zhu et al., 2010]. Una moltitudine di segnali forniti dal microambiente cellulare influenzano il destino cellulare, la proliferazione, la morfogenesi, la crescita e la differenziazione. La prostata è costituita da un compartimento epiteliale incorporato in un compartimento stromale che si

compone di fibroblasti, miofibroblasti e cellule muscolari lisce che esprimono gli androgeni [Niu et al., 2009]. Lo stroma è indispensabile per la formazione e il mantenimento della normale architettura tissutale. Il tessuto situato immediatamente adiacente ai tumori è istologicamente diverso dallo stroma normale; uno stroma gravemente alterato influenza la tumorigenesi nel contesto del microambiente tumorale [Matuszak et al., 2011]. La via di segnalazione del TGF- β assume un ruolo importante nelle interazioni tumore-stroma e nella regolazione del microambiente prostatico [Yang et al., 2005]. L'espressione stromale di questo fattore di crescita promuove l'angiogenesi e la progressione del tumore alla prostata [Yang et al., 2005]. In virtù del ruolo di regolazione centrale svolto da TGF- β nel coordinare la crescita cellulare e l'apoptosi durante la normale omeostasi della prostata, uno squilibrio sia nella produzione e/o risposta a TGF- β contribuisce alla crescita, sviluppo e progressione del tumore [Derynck et al., 2001];[Zhu et al., 2005]). Un aumento dell'espressione di TGF- β è stato trovato in pazienti con cancro avanzato alla prostata [Matuszak et al., 2011].

La EMT è stata collegata con la generazione e il mantenimento di popolazioni di cellule staminali durante la tumorigenesi ([Polyak et al., 2009];[Mani et al., 2008]). Le cellule tumorali della prostata che hanno subito EMT presentano fenotipi e trascrittomi riconducibili alle cellule staminali tumorali. ([Kong et al., 2010];[Klarmann et al., 2009]). Un'altra conseguenza dell' EMT è la generazione di cellule staminali tumorali (CSC) e lo sviluppo di resistenza terapeutica [Singh et al., 2010].

2.6 Mesodermal Progenitor Cells (MPCs)

Le cellule MPCs rappresentano una popolazione cellulare multipotente identificata ed isolata in coltura, da campioni di midollo osseo umano. L'identificazione di questa nuova popolazione cellulare è stata resa possibile quando, per la rigenerazione di tessuto osseo autologo, si è deciso di sostituire il siero di vitello fetale, utilizzato per l'isolamento delle Cellule Stromali Mesenchimali (MSCs), con siero umano adulto autologo allo scopo di ridurre il rischio di trasmissione di malattie infettive o di reazioni immunitarie. Queste condizioni colturali hanno consentito di osservare due differenti tipologie di cellule (figura 6) : le tipiche cellule mesenchimali allungate e alcune cellule atipiche rotondeggianti, con la regione centrale rifrangente per la presenza di un ispessimento citoplasmatico (cellule dette a “uovo fritto”) [Petrini et al,2009] [Trombi et al, 2009]. Queste ultime hanno dimostrato la capacità di differenziare verso cellule mesenchimali MSC, rivelando quindi natura di precursore. Allo stesso modo hanno anche dimostrato la capacità di differenziare verso le cellule endoteliali. In virtù di questo duplice potenziale differenziativo queste cellule sono state denominate: *mesodermal progenitor cell* (MPCs) [Petrini et al,2009]. Le MPCs mostrano caratteristiche che ne permettono la distinzione dalle cellule mesenchimali stromali, definite secondo il criterio ISCT, poiché sono cellule atipiche e rotondeggianti; sono resistenti al trattamento di distacco con tripsina e possiedono un'elevata capacità differenziativa mesenchimale.

Dal punto di vista immunofenotipico, le MPCs esprimono sulla loro superficie la presenza del CD31, CD105, ma non CD90 e altri tipici marcatori delle MSCs, tra cui STRO-1.[Pacini et al,2010].

Le cellule MPCs, inoltre mostravano un organizzazione dell'actina completamente differente dalle MSCs che mostrano le tipiche strutture dette a “*stress-fibers*” in corrispondenza dei complessi di adesione focale. Al contrario le cellule MPCs mostravano strutture di tipo podosomiale solitamente associate a processi di adesione e invasione tissutale. Inoltre un recente studio ha dimostrato l'associazione dei podosomi, presenti sulle MPCs con un aumentata capacità, di queste cellule, ad aderire all'endotelio. [Pacini et al, 2013].

In conseguenza di ciò, gli autori suggeriscono che solamente le MPCs ritengano la capacità di colonizzare tessuti danneggiati o in rimodellamento attraverso fenomeni di mobilitazione e invasione ed

una volta insidiate, sostenere processi di neoformazione attraverso il differenziamento verso la linea mesenchimale ed endoteliale, di cui sono capaci. [Fazzi et al, 2011]. Al contrario, i risultati suggeriscono che le cellule mesenchimali, mancando delle necessarie strutture molecolari (podosomi, invadosomi), non siano in grado di sostenere processi di invasione tissutale.

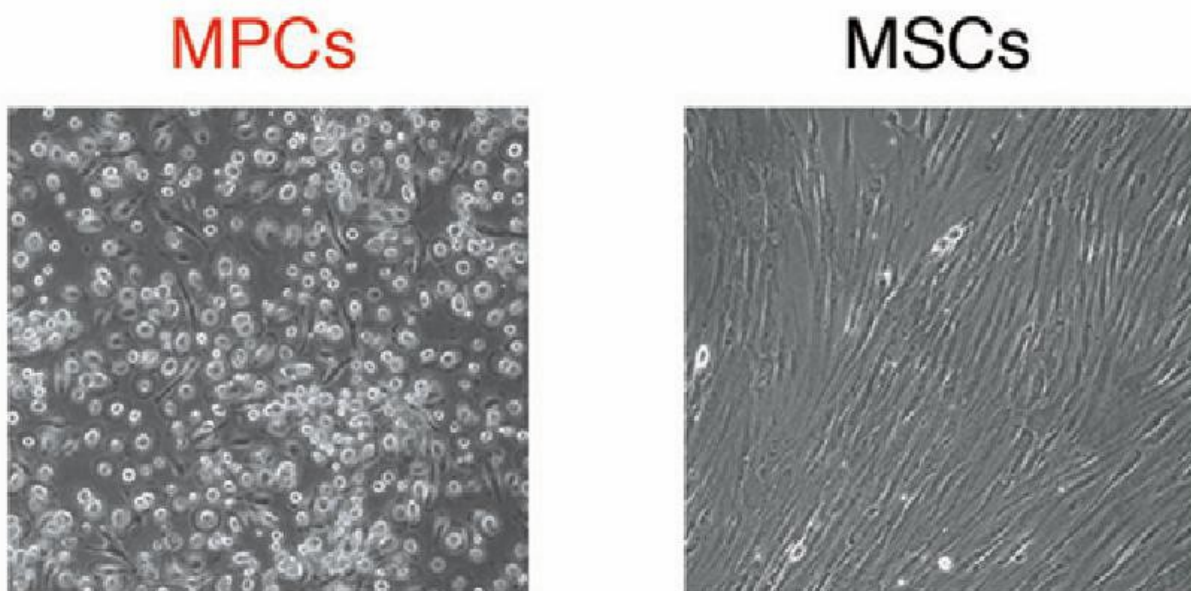


Figura 6

3. Scopo della tesi

Il presente lavoro ha due principali obiettivi.

Una volta verificata l'avvenuta induzione della EMT nelle due linee cellulari di tumore alla prostata, PC3 e DU145, trattate con TGF- β , considerato il principale induttore di EMT, abbiamo voluto verificare se la transizione EMT conducesse le cellule neoplastiche ad acquisire le caratteristiche mesenchimali attraverso una stabile o transiente espressione di marcatori caratteristici delle MPCs.

Parallelamente, questo lavoro si prefigge lo scopo di verificare l'ipotesi per cui la trasformazione EMT possa indurre e/o alterare l'espressione delle varie isoforme della fibronectina, con particolare attenzione alla forma oncofetale.

Una volta ottenuti, questi risultati potrebbero suggerire meccanismi alla base di recenti protocolli radioterapici che impiegano anticorpi diretti contro questa isoforma e che risultano altamente specifici nel veicolare i radioisotopi solamente nel tumore primario e/o secondario, con una bassissima captazione a livello dei tessuti normali.

4. **Materiali e metodi**

4.1 Colture cellulari e trattamento con TGF- β

Le linee cellulari tumorali di prostata PC3 e DU145 sono state acquistate dalla American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Le PC3 e DU145 sono state coltivate, rispettivamente, in RPMI/F12 (1:1) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e RPMI medium 1640 (Life Technologies) supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 2mM L-glutammina (Lonza, Walkersvilli, MD, USA), 100 IU/mL penicillina (Pharmacia & Upjohn S.p.a, Milano, Italia), 100 IU/mL streptomicina (Briston-Myers Squibb S.p.a, Sermoneta, Italia).

Per poter studiare se la EMT delle PC3 passa attraverso le cellule MPC, sono state messe in coltura le cellule PC3, per sei passaggi in due diversi mezzi di crescita, trattati e non con TGF- β 1. I due mezzi sono RPMI/F12 e il DMEM Low Glucose (Life Technologies) supplementato con 10% di siero umano del gruppo AB (Lonza), 1% glutamax e 1% penicillina e streptomicina.

Le cellule sono state incubate a una temperatura di 37°C, in atmosfera umidificata ed in presenza del 5% di CO₂/ 95% aria. Il mezzo di coltura è stato cambiato due volte a settimana. Per indurre il processo di EMT, le linee cellulari sono state trattate con 20 ng/mL di TGF- β 1 (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) per circa 30 giorni: 6 passaggi (p6). Le cellule sono state coltivate in fiasche per colture cellulari e, arrivate a confluenza, sono state staccate con 0.05% Tripsina-0,02% acido etilendiamminotetracetico (EDTA) (Life Technologies) per le successive espansioni. Le cellule, trattate e non trattate, sono state raccolte per l'analisi sia dopo 72h di trattamento (P0) sia a fine trattamento (P6). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

4.2 Analisi immunofenotipica

L'analisi delle caratteristiche antigeniche delle cellule è stata effettuata mediante citofluorimetria a flusso o FACS (*fluorescence-activated cell sorter*), utilizzando lo strumento MACSQuant® Analyzer, dotato di tre laser (Violetto 405 nm, Blu 488nm, Rosso 635 nm). Queste particolari lunghezze d'onda consentono un'efficace misura dei parametri fisici e possono eccitare fino a sette differenti fluorocromi. Questa metodica consente l'analisi a livello di singola cellula grazie al principio della "focalizzazione idrodinamica".

La sospensione cellulare è quindi immessa a pressione nel sistema fluidico che provvede a inviare il campione ad una camera di flusso, nella quale si realizza un flusso laminare concentrico che provvede ad allineare le cellule. Queste ultime potranno così raggiungere singolarmente il punto di misurazione. Da questa interazione sono generati dei segnali dipendenti dalle caratteristiche fisiche e dalla presenza di marcatori fluorescenti sulla superficie, nel citoplasma o nel nucleo della cellula. Tali segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi semitrasparenti e filtri ottici ed inviati ai relativi sensori (fotomoltiplicatori) che ne misurano l'entità.

Ogni cellula che attraversa la camera a flusso genera un evento registrato dall'apparecchiatura elettronica, tali registrazioni includono caratteristiche di riflessione rifrazione ed emissione di fluorescenza. Nel citofluorimetro utilizzato nell'analisi in questione ogni evento genera la registrazione di sette parametri di fluorescenza più due di diffrazione\diffusione. Tali parametri possono essere visualizzati due a due con grafici a punti (dot plots), dove ogni punto corrisponde a un evento generato nel sistema. Eventuali addensamenti nel grafico a punti risultano quindi associabili a vere e proprie popolazioni di cellule accomunate da simili parametri fisici ed immunologici.

Per poter identificare la popolazione di MPC, le cellule PC3 cresciute nei due mezzi di coltura sono state analizzate a ogni passaggio. Dopo aver staccato con tripliselect le cellule e averle contate, 100 μ l di sospensione cellulare (5×10^5 cell) sono stati aliquotati in tubi con appropriati anticorpi monoclonali (mAb) e incubati a 4 °C per 30 minuti. In seguito i campioni sono stati lavati due volte con

MACSQuant® running buffer (Miltenyi Biotec) e analizzati. Gli anticorpi utilizzati sono: CD326 (EpCAM) APC, CD90 (THY-1) PerCP-Cy5.5, CD31 PE, STRO-1 FITC.

Le cellule PC3 e DU145 sono state analizzate mediante citometria a flusso a passaggio P0 e P6, al fine di detectare specifici antigeni di superficie in grado di confermare l'avvenuta EMT. Le cellule sono state quindi staccate con tripsina, contate e un totale di 100 μ l di sospensione cellulare (5×10^5 cell) è stato aliquotato in tubi con appropriati anticorpi mAbs e incubati per 30 minuti a 4°C. Successivamente i campioni sono stati lavati due volte con MACSQuant® running buffer (Miltenyi Biotec) e analizzati. Per la caratterizzazione fenotipica sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali: CD326 (EpCAM) APC , E-caderina PE e N-caderina PE, CD44 FITC, CD105 PE-Vio770.

Come controlli abbiamo utilizzato anticorpi non reattivi di identico isotipo.

4.3 Western-blot

Il western-blot è una tecnica immunochimica che permette di identificare la presenza di una determinata proteina in una miscela di proteine separate elettroforeticamente, mediante il riconoscimento di specifici anticorpi.

Il metodo consiste nell'elettro-trasferimento delle proteine dalla matrice del gel di acrilamide ad una membrana di nitrocellulosa, sulla quale è successivamente possibile analizzarle per mezzo di anticorpi specifici.

Il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di nitrocellulosa è stato effettuato mediante un sistema continuo semi-dry assemblato in un apposito blottatore.

Una volta rimosso il supernatante, le cellule sono state lisate in tampone RIPA Lysis Buffer a pH 7.4 (Santa Cruz), a cui è stato aggiunto un mix di inibitori di proteasi e fosfatasi. I campioni sono stati posti in ghiaccio per 20 minuti e, successivamente, centrifugati a 14.000 rpm per 20 minuti a 4°C. I sovranatanti, contenenti le proteine cellulari, sono stati raccolti e dosati mediante l'utilizzo dell'acido bicinconinico (BCA), utilizzando come riferimento una curva standard realizzata con concentrazioni note di una soluzione stock di BSA 1 µg/µl.

Metodo dell'acido bicinconinico: proteine e peptidi riducono gli ioni rameici a rameosi in ambiente basico. Gli ioni rameosi reagiscono con il reagente BCA, per formare un complesso viola-porpora (1 ione rameoso chelato da 2 molecole di BCA). Il colore viene misurato alla lunghezza d'onda di 562 nm, ed è lineare con la concentrazione proteica. Contribuiscono al colore legami peptidici, cisteina, cistina, triptofano, tirosina.

I campioni sono stati preparati prendendo 30 µg di estratti proteici cellulari a cui è stato aggiunto 10 µl di Loading buffer (2X Laemmli sample buffer) (Biorad). Le miscele ottenute sono state riscaldate a 99°C per 10 minuti e poi caricate su un gel Precast MiniProtean 4-20% (Biorad), insieme a 5 µl come marker per i pesi molecolari (Ladder Kaleidoscope) (Biorad). Le proteine sono state separate per elettroforesi in un tampone Tris-glicina contenente SDS 0.1% per 2 ore e poi trasferite su membrane di

nitrocellulosa tramite lo strumento Trans-Blot® Turbo Transfer System Biorad (semi-dry system) per 3 minuti.

Le membrane sono state bloccate con latte 5% (Nonfat Dry-Milk, Biorad) in tampone TBS-T (Tris buffered Saline-Tween 20, 0.1%, AbCam) per 1 ora a temperatura ambiente, in agitazione costante.

Quindi le membrane sono state incubate con gli anticorpi primari in soluzione di latte al 5% in TBS-T) o con albumina bovina sierica (BSA) 5% in TBS-T, per tutta la notte a 4°C, in agitazione costante. In questo lavoro sono stati utilizzati gli anticorpi presenti in tabella 1.

Nome	Specie/isotipo	Peso Molecolare	Diluizione	Ditta
α -Tubulin	Mouse/IgG1	52 kDa	1:2000	Cell Signaling
E-Cadherin	Rabbit/IgG	135 kDa	1:1000	Cell Signaling
N-Cadherin	Rabbit/IgG	140 kDa	1:1000	Cell Signaling
Vimentin	Rabbit/IgG	57 kDa	1:1000	Cell Signaling
EpCAM	Rabbit/IgG	35kDa	1:1000	AbCam
Goat-Anti-mouse	IgG		1:1000	Biorad
Goat-Anti-rabbit	IgG		1:1000	Biorad

Tabella 1

Successivamente le membrane sono state lavate per 3 volte in TBS-T ed incubate con opportuni anticorpi secondari in latte al 5% per 1 ora a temperatura ambiente ed in agitazione costante. Dopo ulteriori 3 lavaggi in TBS-T, l'immunoreattività è stata rilevata tramite una reazione di chemiluminescenza utilizzando l'*Enhanced ChemiLuminescence* (ECL) per 1 minuto (ECL detection kit, Amersham). L'ECL è una tecnica utilizzata per la rilevazione degli anticorpi secondari coniugati con la perossidasi: *Horseshoe Peroxidase* (HRP). Il complesso enzimatico della perossidasi catalizza la conversione del substrato ECL, creando un reagente sensibile che emette luce (chemiluminescenza). Ogni Kit contiene Luminolo e H₂O₂. Il substrato è il luminolo che viene ossidato, per aggiunta di H₂O₂ ad

acido 3-aminoftalico ed emette chemiluminescenza. Le intensità relative delle bande sono state misurate mediante analisi densitometrica, utilizzando il ChemiDoc (Biorad).

4.4 qRT- PCR

L'estrazione dell'RNA totale è stato effettuato con RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), secondo le istruzioni della casa produttrice. Questo sistema di estrazione è efficiente per diversi tessuti e linee cellulari. Dopo aver scongelato le cellule in azoto e aver preparato 50 μ l di buffer di lisi (5 μ l di β -mercaptoetanol x ml), ai campioni sono stati aggiunti 350 μ l di Buffer RLT+ β -mercaptoetanolo volticando vigorosamente. Successivamente il lisato e' stato trasferito in provette QIAshredd e centrifugato per due minuti a 10.000 rpm in una minicentrifuga. Il lisato purificato e' stato trasferito, attraverso la colonnina in un nuovo tubicino a cui vengono aggiunti 350 μ l di etanolo al 70%, mescolando delicatamente mediante inversione. In questo modo non si ottiene la precipitazione del RNA che non verrà pellettato, ma fatto legare ad una membrana silicea. Successivamente il campione è stato trasferito in una colonnina RNeasy e centrifugato per 15 secondi a 12.000 rpm. E' stato scartato l'eluato , aggiunti 700 μ l di Buffer RW1 e centrifugato per 15 secondi a 12.000 rpm. La colonnina con legato l'RNA viene trasferita in un nuovo tubo da microcentrifuga e si procede con due lavaggi utilizzando per ciascuno 500 μ l di Buffer RPE e centrifugando sempre per 15 secondi a 12.000 rpm. Per eliminare tutti i residui di etanolo è stata effettuata un'ulteriore centrifuga a vuoto a 14.000 rpm per un minuto. Con 40 μ l di H₂O RNeasy free è stata fatta fluire l'RNA dalla colonnina mediante centrifugazione per 1 minuto a 12.000 rpm.

CORSA ELETTROFORETICA

L'elettroforesi è una tecnica che permette la separazione delle molecole biologiche in base al loro peso molecolare, permettendo inoltre di stimarne anche quantità e qualità. Questa tecnica viene utilizzata di routine per quantificare e verificare la qualità del DNA e RNA estratto e per controllare le dimensioni dei frammenti amplificati tramite PCR. L'elettroforesi sfrutta la carica netta, positiva o negativa, che le molecole biologiche hanno una volta poste in una particolare soluzione salina. Se sottoposte al passaggio di corrente elettrica le molecole tenderanno a migrare verso l'elettrodo con carica opposta rispetto a

quella propria, separandosi in base al loro peso molecolare in quanto le molecole più grandi migreranno più lentamente rispetto a quelle più piccole. Il DNA, che ha una carica netta negativa, tenderà quindi a migrare verso l'anodo che presenta carica positiva. Utilizzando marcatori di peso molecolare e concentrazione nota (1 Kb Plus DNA Ladder In-vitrogen) è inoltre possibile stimare le dimensioni e le concentrazioni dei nostri campioni, derivanti da estrazioni di DNA, di RNA o da reazioni di PCR. L'elettroforesi viene normalmente condotta su gel di agarosio al 1% in tampone *Tris-Borate-EDTA* (TBE) 1X (0.8 g di agarosio in 4 ml di TBE). Per la colorazione degli acidi nucleici è stato utilizzato il colorante Bromuro di Etidio. Il gel solido viene immerso nel Buffer (30 ml di TBE e 300 ml di H₂O deionizzata) della vaschetta dove avviene la corsa. Quindi si possono caricare nel gel i campioni da controllare, preparati aggiungendo acqua deionizzata e gel loading buffer (blu di bromofenolo). La corsa viene condotta con un voltaggio che dipende dalle dimensioni del gel, circa 100V ogni 10 cm di gel.

PCR E DISEGNO DEI PRIMERS

La Reazione a Catena della Polimerasi o PCR è una tecnica che permette l'amplificazione esponenziale di frammenti di DNA sfruttando la capacità di sintesi del DNA dell'enzima DNA polimerasi che permette una duplicazione di tipo semiconservativa. Questo enzima infatti è in grado di sintetizzare copie multiple di una sequenza specifica di DNA racchiusa tra due brevi tratti di sequenza nota, su cui sono stati disegnati degli inneschi (primers) specifici. La PCR prevede l'alternarsi ciclica di tre fasi:

- **Denaturation**: fase di denaturazione della doppia elica di DNA a 94/95 °C per 30/60";
- **Annealing**: fase in cui i primers si attaccano alle due estremità del frammento da amplificare. Normalmente viene condotta a 55/60° C a seconda del contenuti in G-C dei primers, per 30/60";
- **Extension**: fase in cui la DNA polimerasi sintetizza i nuovi filamenti di DNA.

La polimerasi utilizzata nelle reazioni di PCR è stata isolata nei primi anni ottanta dal microrganismo *Thermus aquaticus*, identificato nelle pozze di acqua calda del parco nazionale di Yellowstone, negli Stati Uniti. Questo batterio che quindi vive normalmente a temperature di circa 75°C possiede una DNA polimerasi altamente termostabile, che quindi non viene degradata durante la prima fase di

denaturazione del DNA, in cui si deve lavorare a temperature di circa 95°C. Questa DNA polimerasi è stata denominata Taq polimerasi e ha un optimum di attività a 72°C, temperatura a cui normalmente viene condotta la fase di extension. L'esecuzione di queste reazioni cicliche a diverse temperature richiede un termociclatore in cui impostare tempi e temperature che devono essere applicati alla miscela la cui composizione può variare a seconda delle diverse applicazioni specifiche. Solitamente la PCR viene condotta per circa 35-40 cicli, alla fine dei quali normalmente si ottengono più di un miliardo di copie del tratto di DNA di interesse compreso tra i due primer forward e reverse.

I primers di tutti i geni analizzati sono stati disegnati con il Software Beacon Designer v.7 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) utilizzando le sequenze pubblicate sul database Gene Bank.

(Tabella 2)

Gene	Accession name	Forward primer	Reverse primer	Amplicone (bp)
EDA +	NM_212482	CCTGATGGTGAAGAAGAC	AGGAATAGCTGTGGACTG	132
EDA -	NM_212474	GCAGTAACCACTATTCCT	ATAAGTCCTGATAACAACCA	197
EDB +	NM_212482	AGGATACTACACAGTCACAGG	AGGAGGAACAGCCGTTTG	121
EDB -	NM_212474	TGATACCATCATCCAGC	GCAGGAGATTTGTTAAGACC	209
IIICS+	NM_212478	TGGGTATGCACTGGAAAT	CTACATTCGGCGGGTATG	164
IIICS+e-	NM_212482	GAATAATCAGAAGAGCGAGCC	ACTCAGAAGTGCCTGGAATG	V120= 464; V95= 389; V89= 371; V64= 296; V0= 104
TNC	NM_002160	GAGACTTGACTGCTACTG	ATGACTTCCTTGACTGTG	124
TNC-A1	NM_002160	ACTTCCTATGTCCTGAGAGG	GCTTGTTCACTGGATGCC	116
GALNT-6	NM_007210	TTCTATGGTGCCATCAAG	GTCCCTCTGAGTTGTGTA	141
CDH1	NM_004360	TAACCAGAATAAAGACCAAGTG	CAGCAGAATCAGAATTAGCA	166
CDH2	NM_001792	ATCACAGATTCGGGTAAT	CACAAGGATAAGCAGGAT	174
CDH3	NM_001793	TGCCACCTACCTTATCAT	AAATCCAAACCCTTCCTG	105
VIM	NM_003380	TCAGATTCAGGAACAGCAT	GGTCAGCAAACCTGGATTT	164
EPCAM	NM_002354.2	TTGCCGCAGCTCAGGAAG	CCGCTCTCATCGCAGTCAGG	250

Tabella 2

La normalizzazione dei geni housekeeping è stata effettuata con GeNorm; per le cellule PC3 sono stati utilizzati B2M e ATP5B. Per le cellule DU145 sono stati utilizzati 4 geni housekeeping (Actb, Atp5b, Gapdh, Hprt) (Tabella 3).

Gene	Accession name	Forward primer	Reverse primer	Amplifone
RPL13A	NM_012423	CCTGGAGGAGAAGAG GAAAGAGA	TTGAGGACCTCTGTGTA TTTGTCAA	126
B2M	NM_004048	GAGTATGCCTGCCGTG TG	AATCCAAATGCGGCATC T	110
HPRT1	NM_000194	AGACTTTGCTTTCCTTG GTCAGG	GTCTGGCTTATATCCAA CACTTCG	101
Actb	NM_001101	CGCCGCCAGCTCACCA TG	CACGATGGAGGGGAAG ACGG	120
GAPDH	NM_002046.5	CCCTTCATTGACCTCAA CTACATG	TGGGATTTCCATTGATG ACAAGC	115

Tabella 3.

I geni housekeeping ATP5B, SDHA e TOP1 sono stati presi da “GeNorm kit”(Primer Design). Per la normalizzazione dei geni housekeeping sono state prese in considerazione le linee guide presenti nel lavoro di Vandesompele. ([Vandesompele et al., 2002] [Hellemans et al., 2014]).

4.5 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il T-test non parametrico per coppie di dati appaiati. La significatività viene valutata a $p < 0.5$

5. Risultati

5.1 Induzione della trasformazione EMT in cellule PC3.

All'analisi citofluorimetrica la quasi totalità delle cellule PC3 non trattate, risultavano positive all'espressione di CD326 (CTRL P0; 89,4%) con una doppia distribuzione in termini d'intensità di fluorescenza. Risultava quindi possibile identificare una sottopopolazione caratterizzata da una elevata intensità di espressione di questo marcatore (CD326^{Bright}). (figura 7) Tale positività non si mostrava alterata durante i sei passaggi previsti dall'esperimento (CTRL P6; 90,4% di CD326⁺). Al contrario, cellule PC3 trattate con 20 µg/ml di TGF-β, mostravano una sensibile riduzione delle cellule CD326⁺ già dopo 72h dall'inizio del trattamento (TGF-β P0; 77,2%) , soprattutto dovuta a una sostanziale diminuzione delle cellule CD326^{Bright}. Al P6 la maggior parte delle cellule trattate, non esprimeva più questo marcatore e la componente ad alta intensità di espressione risultava pressoché assente (TGF-β P6 ; 40,8% di CD326⁺). Tale risultato è in accordo con la riduzione dell'espressione di EpCAM (CD326) generalmente riportata nei fenomeni di EMT. ([Giordano et al., 2012] [Mego et al., 2012] [Gorges et al., 2012]). Sorprendentemente, sia nelle cellule PC3 del controllo che in quelle trattate, non si verificava nessuna modificazione dell'espressione delle due caderine studiate (E-cadherin e N-cadherin). In modo simile , l'alta espressione dell'antigene CD44 non risultava affetta né dalla cultura né dal trattamento con TGF-β (tabella4). Tuttavia i dati derivanti dagli esperimenti di Western Blot (figura 8 e 9) oltre a indicare una riduzione dell'espressione di EpCAM già' dopo 72h di trattamento, mostravano una significativa riduzione dell'espressione di E-cadherin nelle culture trattate con TGF-β, in sostanziale disaccordo con i dati citofluorimetrici ma in accordo con quanto atteso nel caso di EMT. La bassa espressione di N-cadherin , su tutte le culture in esame , era invece confermata anche dai risultati del Western Blot.. A definitiva conferma di una efficiente trasformazione EMT, l'espressione di Vimentina risultava significativamente aumentata a seguito del trattamento con TGF-β, già a 72h dall'inizio dell'esperimento. I risultati ottenuti dagli esperimenti di qRT-PCR invece, risultavano in completo accordo con i risultati attesi, con una significativa riduzione di mRNA per *CDH1* (E-cadherin, p< 0,01), *CDH3* (P-Cadherin, p<0,01) e *EPCAM* (p<0,01) e induzione dell'espressione di *CDH2* (N-Cadherin,

$p < 0,001$) e *VIM* (Vimentina, $p < 0,01$). L'insieme di questi risultati confermano la validità del protocollo per l'induzione EMT nella linea cellulare tumorale PC3. (Figura 10)

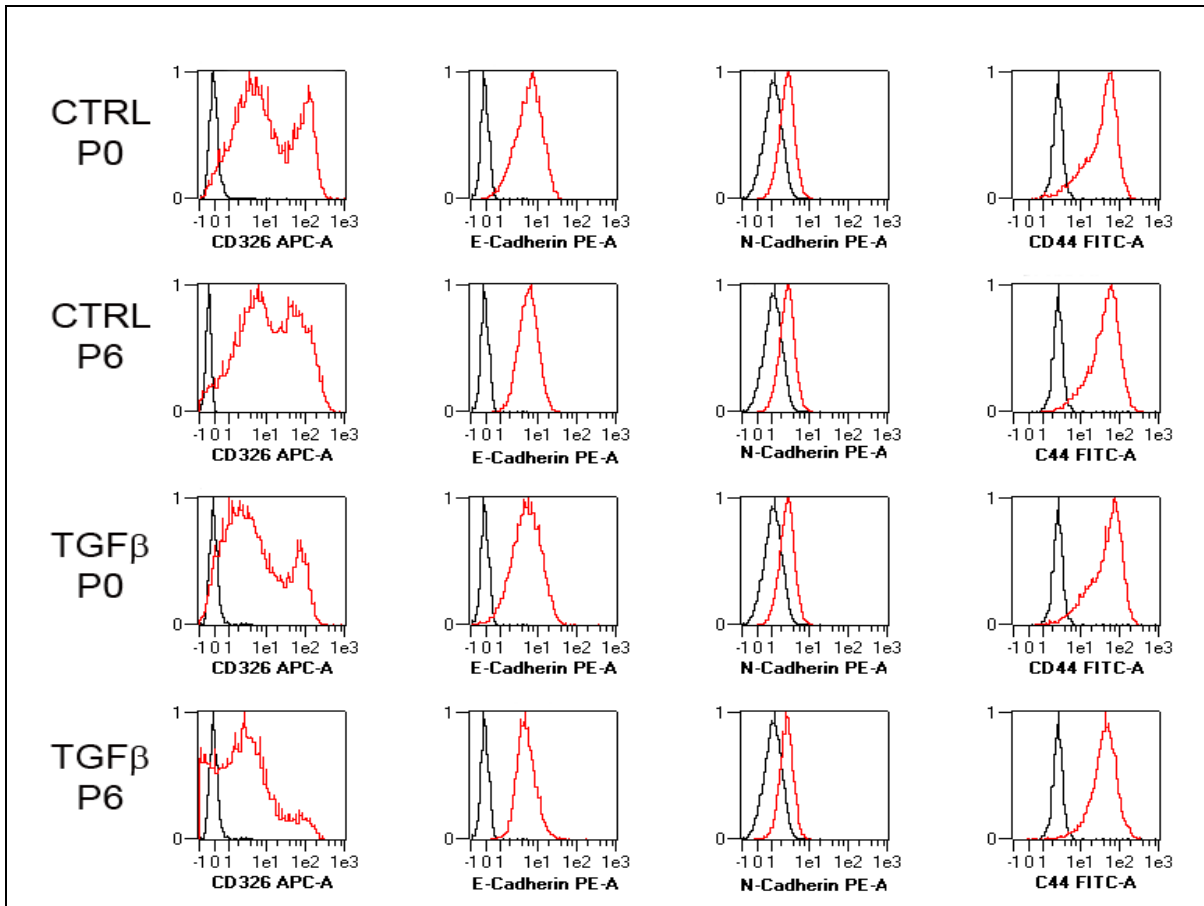


Figura 7

PC3	CTRL P0	CTRL P6	TGF-β P0	TGF-β P6
CD326	89,4%	90,4%	77,2%	40,8%
E-Cadherin	95,6%	98,1%	93,5%	97,0%
N-Cadherin	35,2%	36,7%	35,9%	36,9%
CD44	96,0%	95,1%	90,8%	91,2%

Tabella 4.

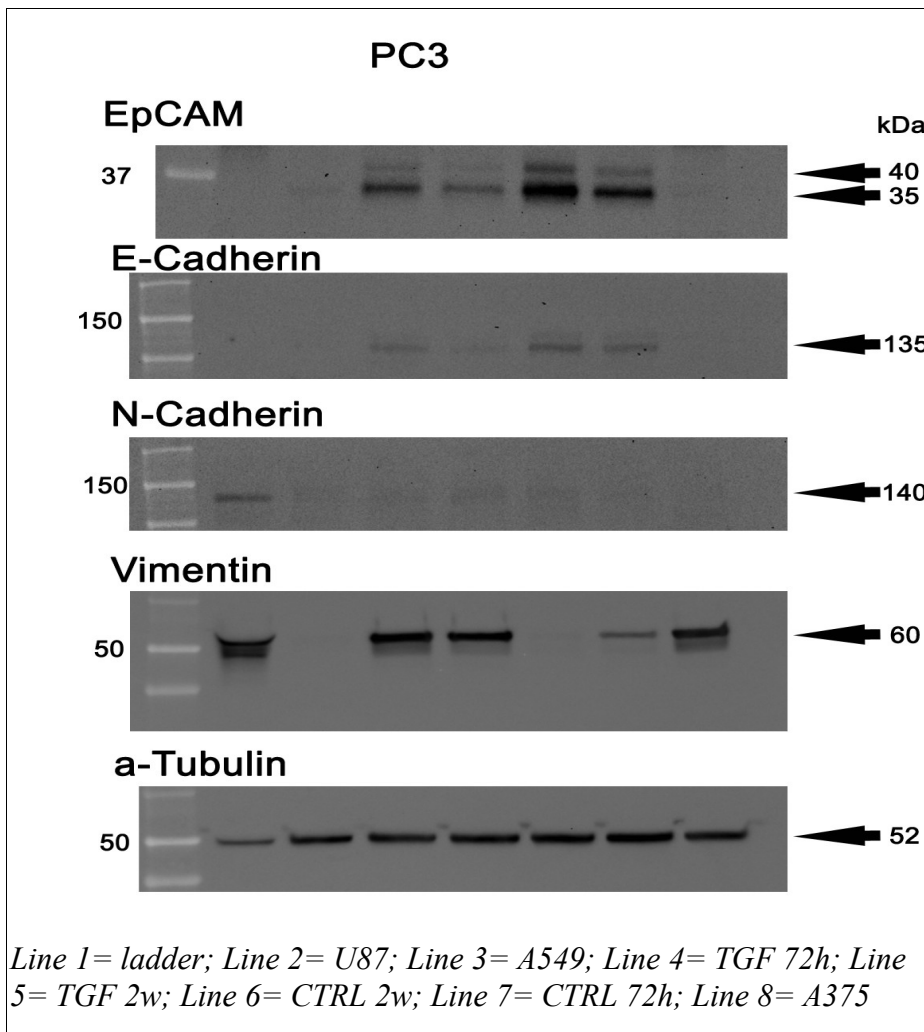


Figura 8

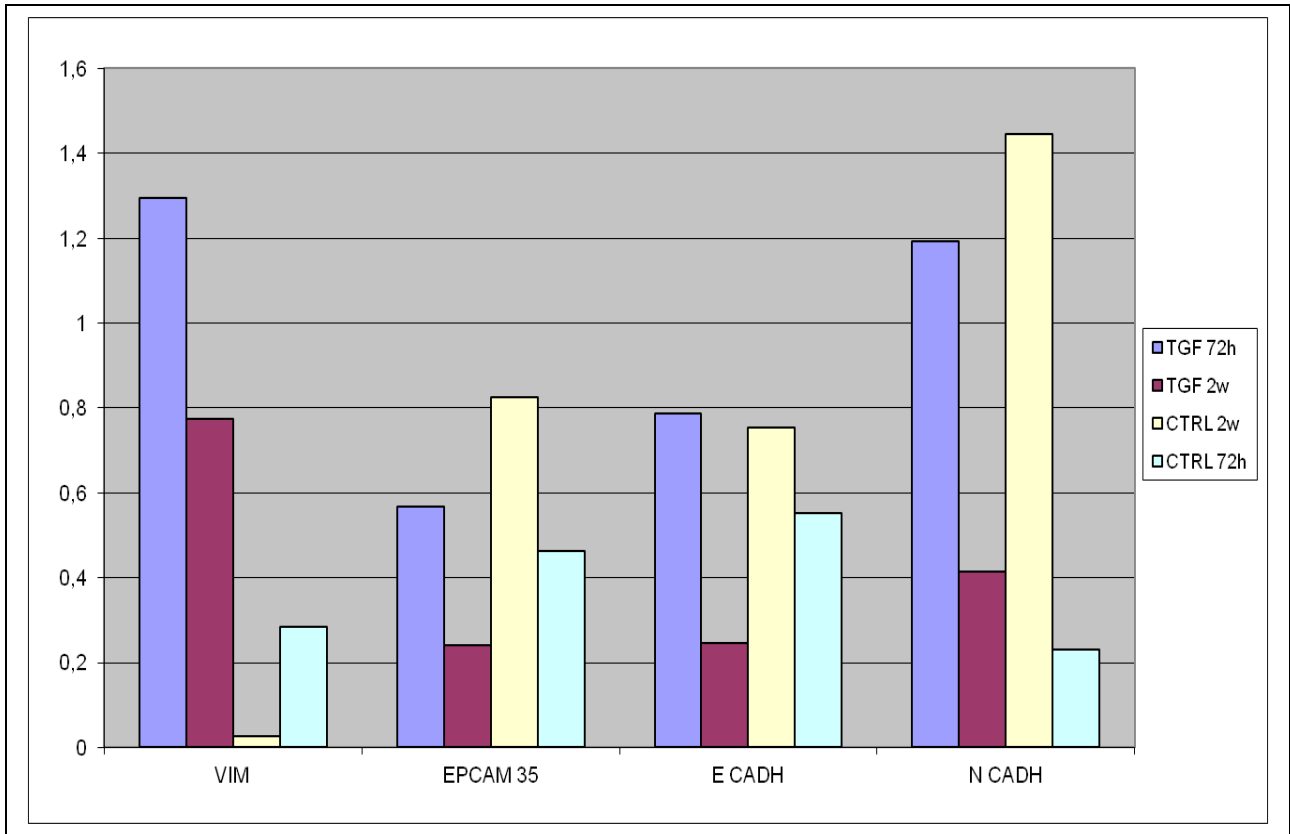


Figura 9

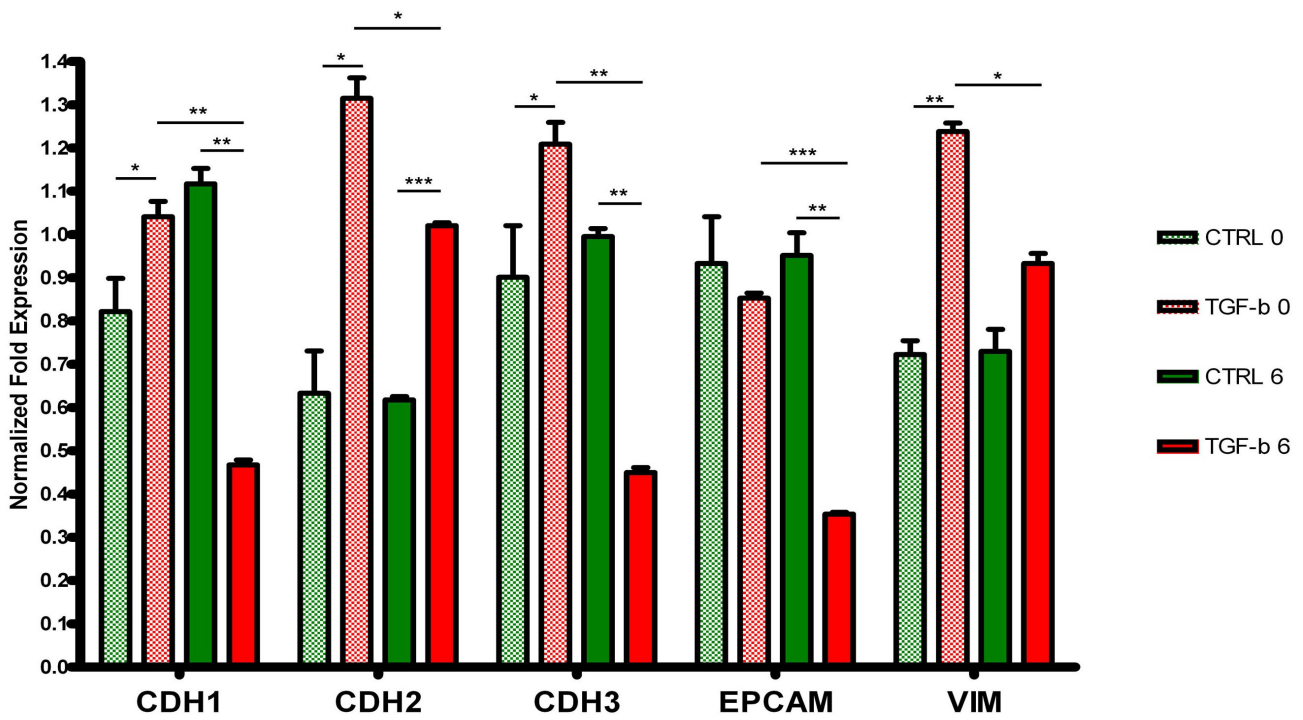


Figura 10

5.2 Induzione della trasformazione EMT in cellule DU145

All'analisi citofluorimetrica tutte le cellule DU145 non trattate, risultavano positive all'espressione di CD326 (CTRL P0; 99,8%). Come per la linea cellulare PC3 questa positività non si mostrava alterata durante i sei passaggi dell'esperimento (CTRL P6; 99,9% di CD326⁺). Al contrario, delle cellule PC3 dopo solo 72h di trattamento con 20 µg/ml di TGF-β, le cellule DU145 non mostravano nessuna alterazione significativa dell'espressione di CD326 (TGF-β P0; 98,3%). Tuttavia al P6, solo nelle colture trattate, risultava detectabile la presenza di una significativa frazione di cellule CD326-negative contribuendo a una misurabile riduzione dell'espressione di questo marcatore (TGF-β P6 ; 86,2% di CD326⁺) (Figura 11). Tale risultato suggerisce che le cellule DU145 necessitano di più tempo per indurre fenomeni di EMT. In accordo con i dati presenti in letteratura le DU145 non esprimevano la N-Cadherin neanche a seguito del trattamento. Tuttavia la maggior parte delle cellule non trattate risultavano essere positive all'espressione di E-Cadherin (CTRL P0; 75,4%), che si manteneva inalterata dopo sei passaggi (CTRL P6; 78,8% di E-Cadherin⁺). Al contrario, in seguito al trattamento con TGF-β, già dopo 72h si otteneva una significativa diminuzione delle cellule positive a E-Cadherin (TGF-β P0; 41,7%), le quali si riducevano ulteriormente al P6 (TGF-β P6 ; 30,6%). In modo simile a quanto ottenuto dagli esperimenti con PC3, l'alta espressione di CD44 risultava invariata ed indipendente, quindi, sia dal tempo di coltura che dal trattamento. (Tabella 5). In disaccordo con questi dati risultavano i risultati ottenuti con i Western Blot dove l'espressione della EpCAM subiva una riduzione evidente dopo 72h e a fine esperimento. Tuttavia i dati di citofluorimetria venivano confermati, in parte, con esperimenti di Western Blot i quali indicavano una significativa riduzione dell'espressione di E-cadherin in seguito al trattamento con TGF-β inoltre in nessun campione veniva espressa la N-Cadherin, e un'aumentata espressione della Vimentina risultava significativa già a 72h di trattamento (figura 12 e 13). In accordo con i risultati attesi e ad ulteriore conferma di un'avvenuta EMT, i dati ottenuti da esperimenti di qRT-PCR mostravano una significativa riduzione di mRNA per *CDH1* (E-cadherin, p<0,001), e *EPCAM* (p<0,01) risultava associata a un significativo aumento dell'espressione di *VIM* (Vimentina, p<0,01). L'assenza di N-cadherin sulla superficie delle DU145 era inoltre confermata dalla mancata espressione di *CDH2*. (figura 14)

Questi risultati confermano la validità del protocollo per l'induzione EMT anche in cellule DU145.

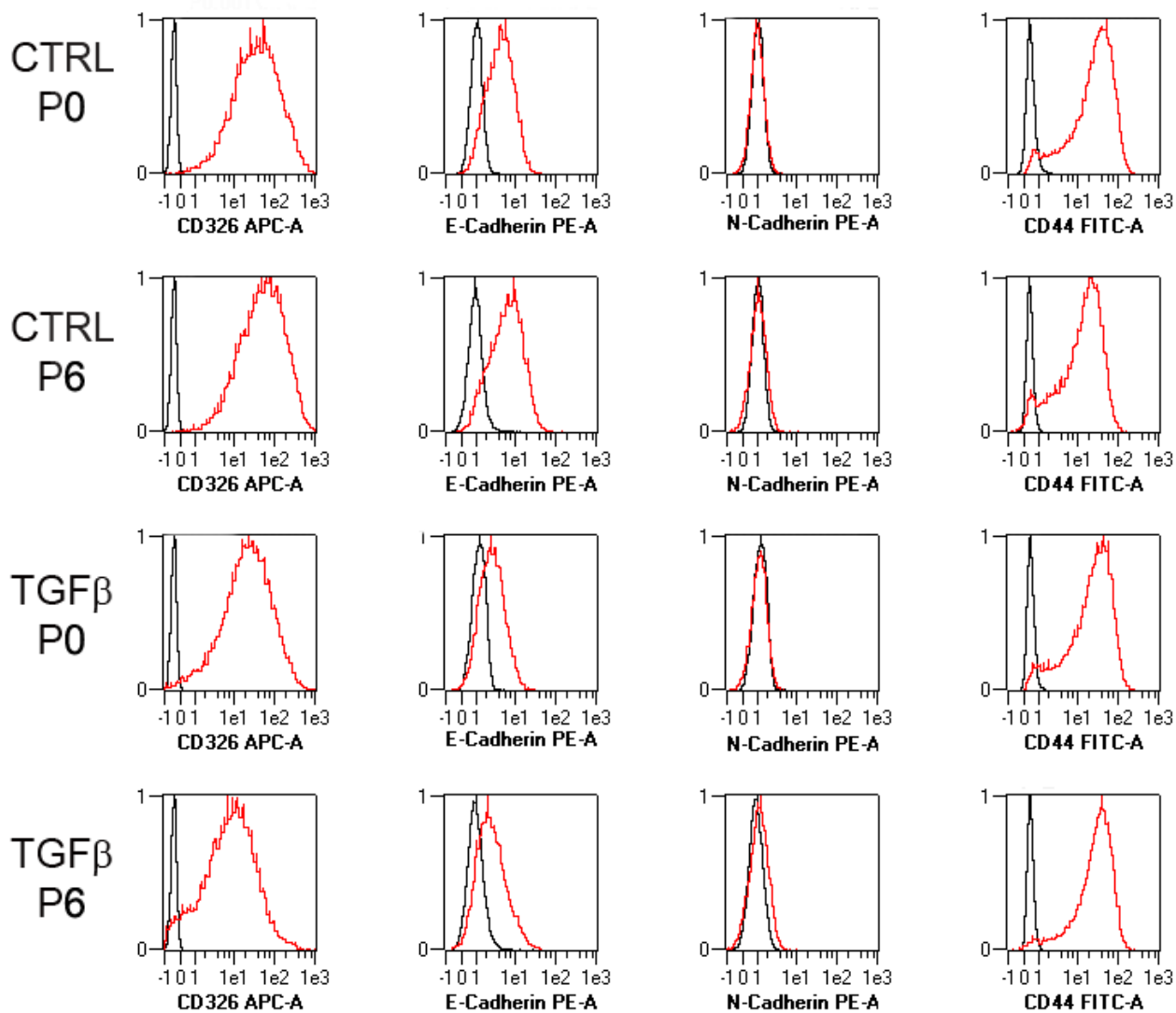


Figura 11

DU145	CTRL P0	CTRL P6	TGF-β P0	TGF-β P6
CD326	99,8%	99,9%	98,3%	86,2%
E-Cadherin	75,4%	78,8%	41,7%	30,6%
N-Cadherin	2,0%	4,6%	5,0%	8,9%
CD44	93,8%	88,6%	92,9%	96,0%

Tabella 5

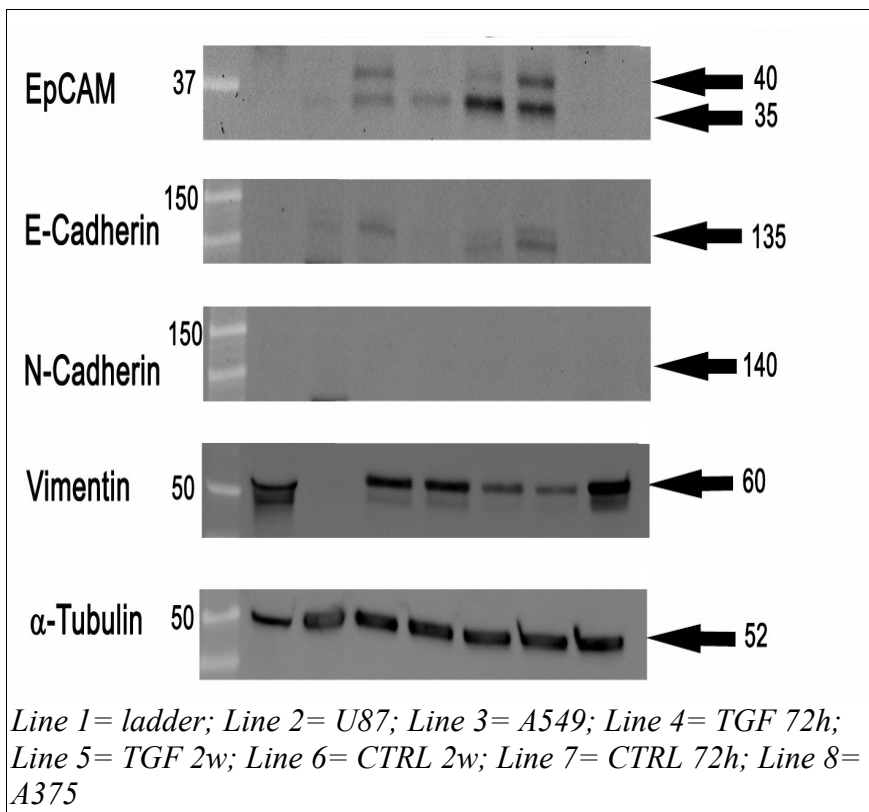


Figura 12

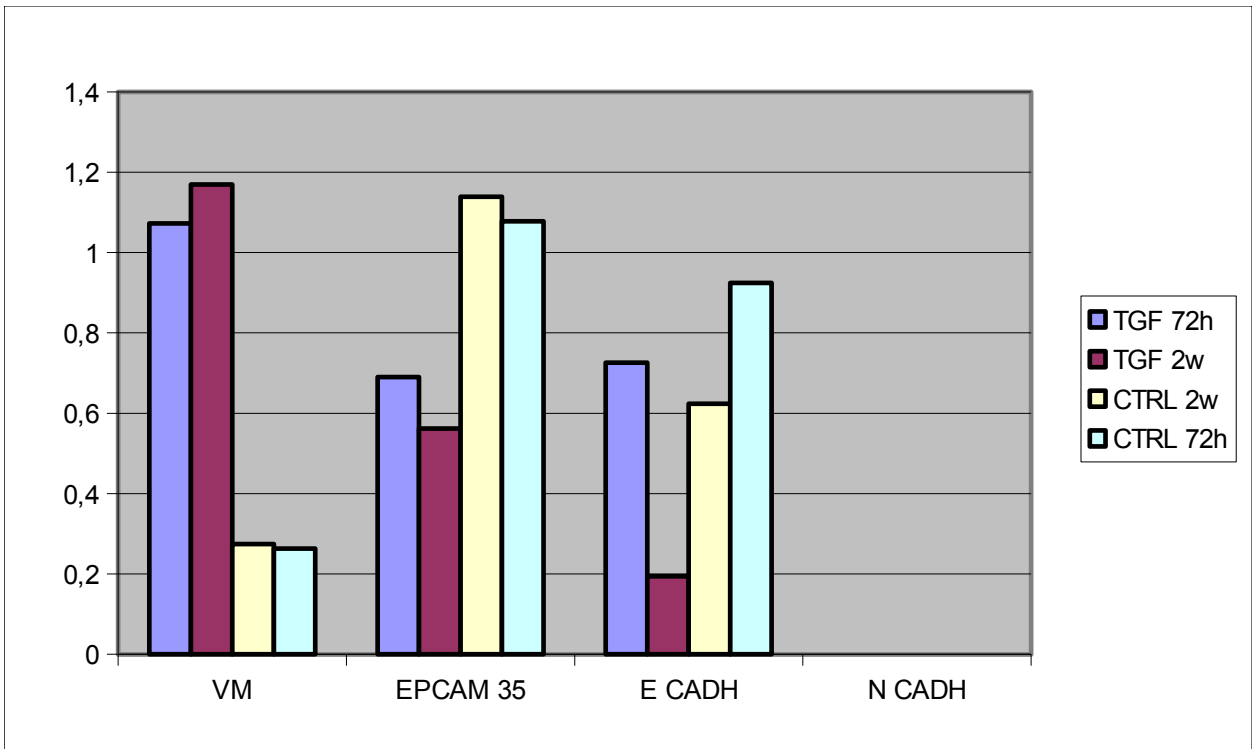


Figura 13

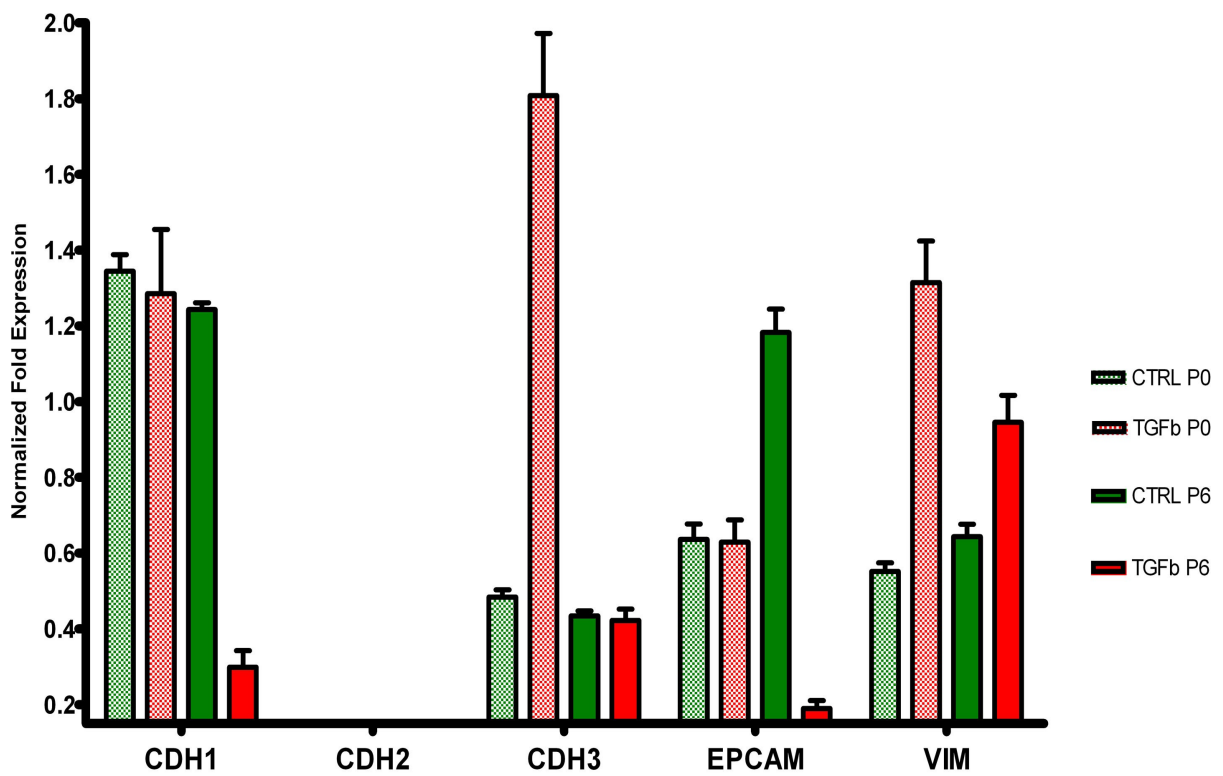


Figura 14

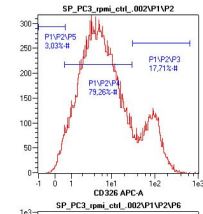
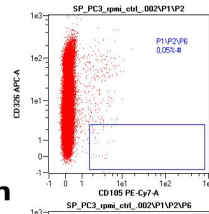
5.3 Identificazione citofluorimetrica di cellule MSC, MPC durante induzione di trasformazione EMT nella linea cellulare PC3.

Al fine di verificare la presenza di cellule mesenchimali MSC e MPC ad ognuno dei sei passaggi è stata analizzata la componente CD105 + e CD326neg nelle diverse culture. Tra queste cellule è stata quantificata la presenza sia di cellule con fenotipo mesenchimale(CD90+ STRO1 +) che con fenotipo MPC (CD90neg; CD31+). (Figure 15, 16, 17, 18)

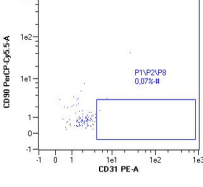
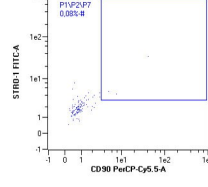
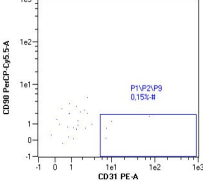
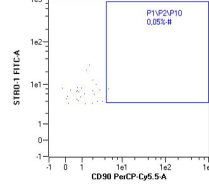
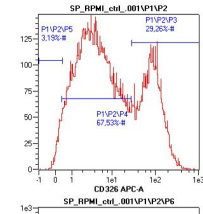
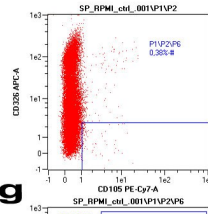
In nessuno dei passaggi analizzati, in entrambe le condizioni di coltura, è stata detectata una componente significativa di elementi riconducibili a cellule MSC o MPC. (Tabella 6)

RPMI 10% FBS
CTRL

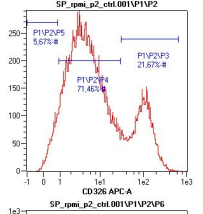
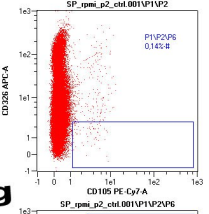
72h



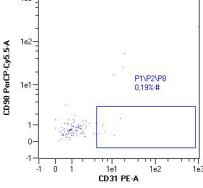
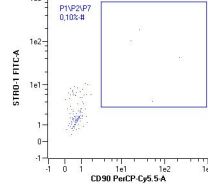
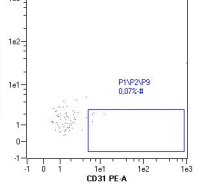
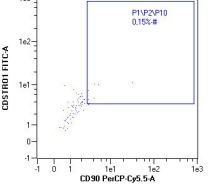
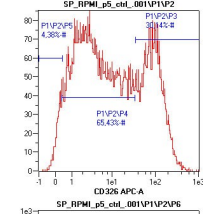
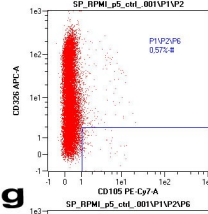
8g



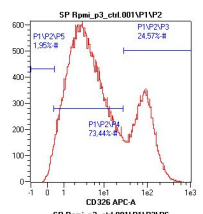
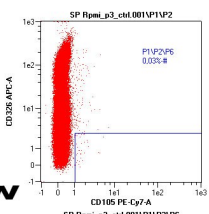
4g



10g



1w



2w

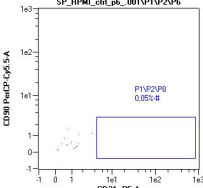
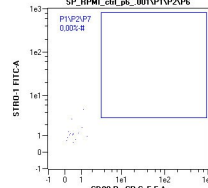
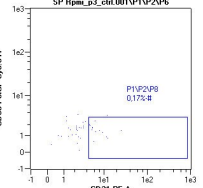
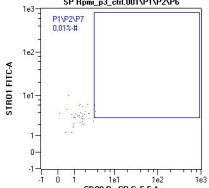
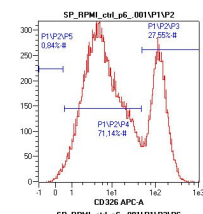
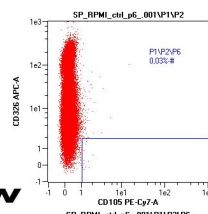


Figura 15

RPMI / 10% FBS TGF-B

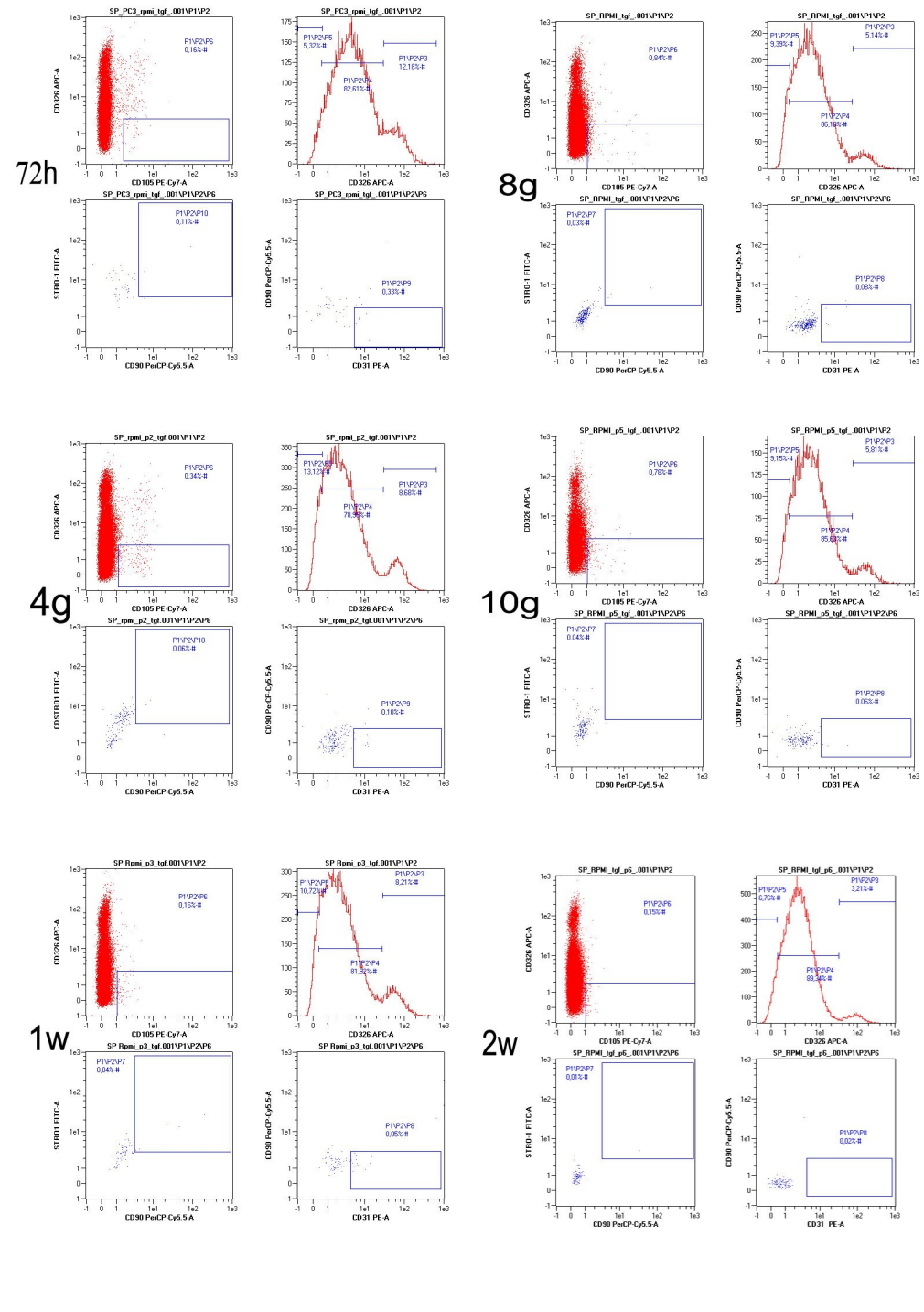


Figura 16

PhABs CTRL

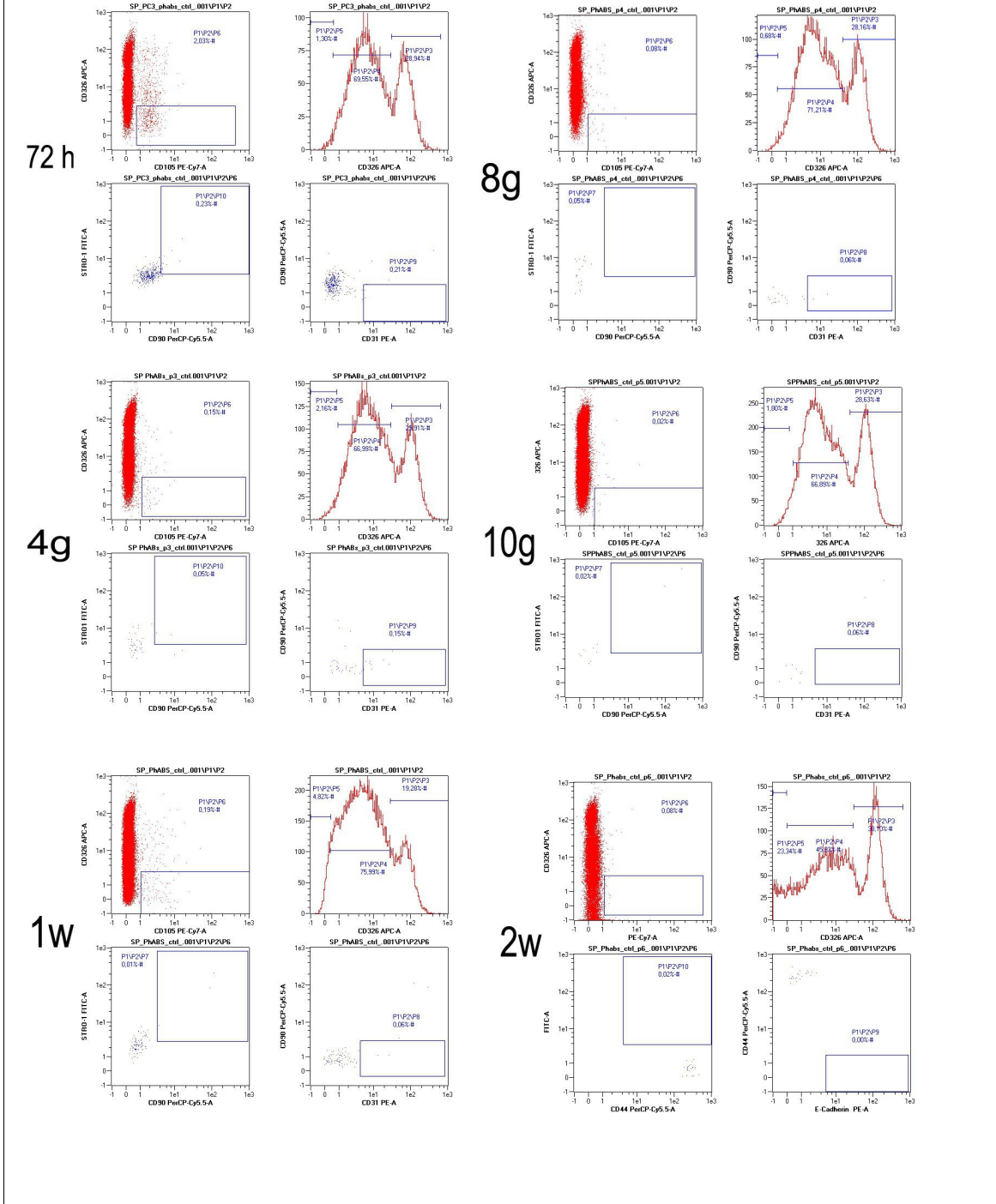


Figura 17

PhABs TGF-B

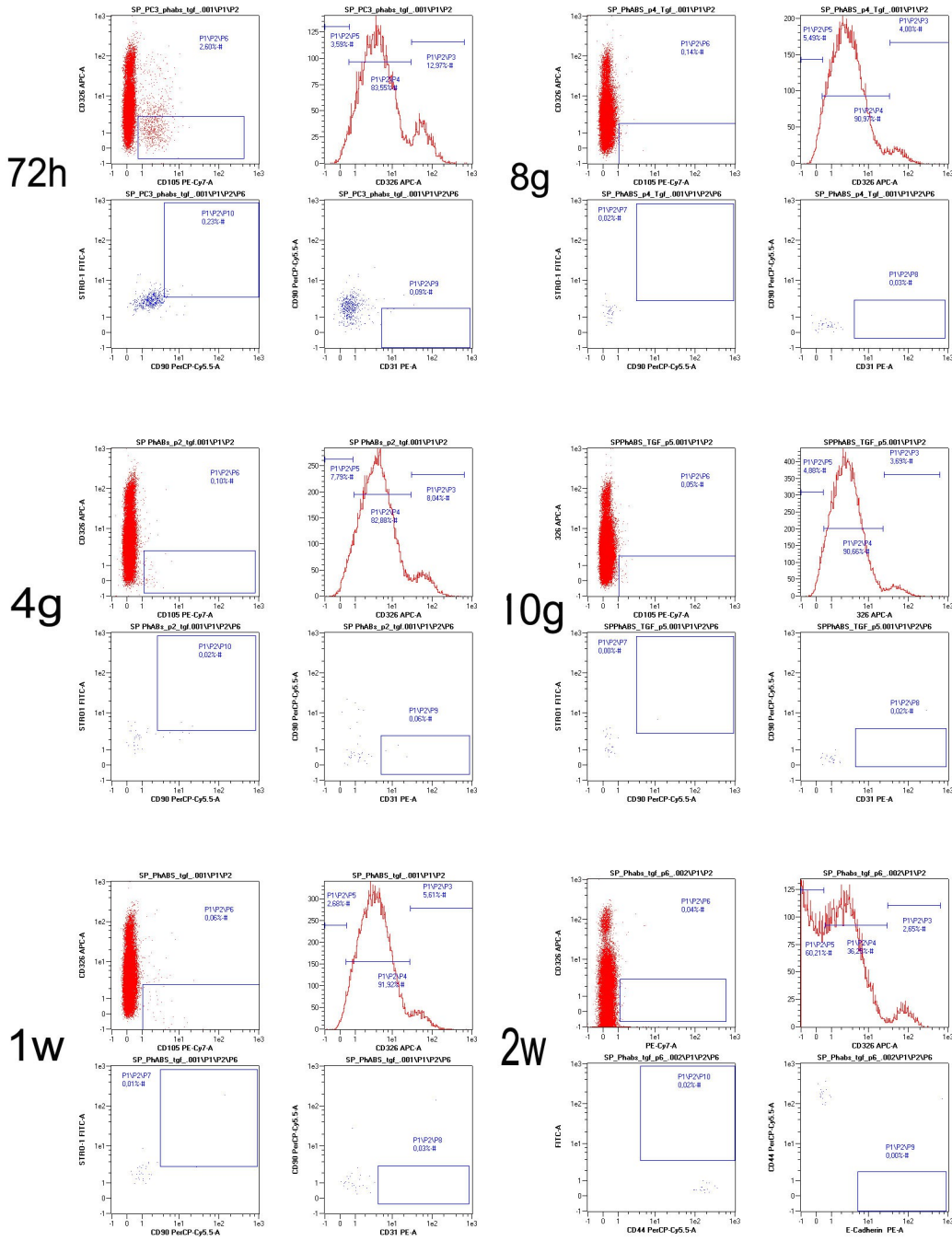


Figura 18

		P1	P2	P3	P4	P5	P6
RPMI CTRL	CD326neg	3,03%	5,67%	1,95%	3,19%	4,38%	0,84%
	CD326dim	79,26%	71,46%	73,44%	67,53%	65,43%	71,14%
	CD326 bright	17,71%	21,67%	24,57%	29,26%	30,14%	27,55%
	MSCs	0,05%	0,15%	0,01%	0,08%	0,10%	0,00%
	MPCs	0,15%	0,07%	0,17%	0,07%	0,19%	0,05%
RPMI TGF	CD326neg	P1 5,32%	P2 13,12%	P3 10,72%	P4 9,39%	P5 9,15%	P6 6,76%
	CD326dim	82,61%	78,96%	81,82%	86,18%	85,63%	89,34%
	CD326 bright	12,18%	8,68%	8,21%	5,14%	5,81%	3,21%
	MSCs	0,11%	0,06%	0,04%	0,03%	0,04%	0,01%
	MPCs	0,33%	0,10%	0,05%	0,08%	0,06%	0,02%
PhAB S CTRL	CD326neg	P1 1,30%	P2 2,16%	P3 4,82%	P4 0,68%	P5 1,80%	P6 23,34%
	CD326dim	69,55%	66,99%	75,99%	71,21%	66,89%	45,93%
	CD326 bright	28,94%	29,91%	19,28%	28,16%	28,63%	30,10%
	MSCs	0,23%	0,05%	0,01%	0,05%	0,02%	0,02%
	MPCs	0,21%	0,15%	0,06%	0,06%	0,06%	0,00%
PhAB S TGF	CD326neg	P1 3,59%	P2 7,79%	P3 2,68%	P4 5,49%	P5 4,88%	P6 60,21%
	CD326dim	83,55%	82,88%	91,92%	90,97%	90,66%	36,25%
	CD326 bright	12,97%	8,04%	5,61%	4,00%	3,69%	2,65%
	MSCs	0,23%	0,02%	0,01%	0,02%	0,00%	0,02%
	MPCs	0,09%	0,06%	0,03%	0,03%	0,02%	0,00%

Tabella 6.

5.4 Studio delle varianti di splicing della FN in cellule PC3

Dati relativi alle diverse isoforme della FN presenti nelle due linee cellulari sono stati ottenuti tramite esperimenti qRT-PCR. Da tali risultati si evince che le cellule PC3 esprimono le varie isoforme di fibronectina, ma non esprimono l'isoforma con il dominio EDB (FnEDB⁺), che viene indotta dal trattamento con TGF- β . Tuttavia a fine esperimento non si verificano significative alterazioni di FnEDA⁺, FnEDB⁻, e della FN contenente il dominio IIICS sia a livello qualitativo che quantitativo. L'espressione dell'isoforma senza il dominio EDA (FnEDA⁻) si riduce dopo il trattamento: al contrario FnEDB⁺ aumenta in maniera significativa gi  dopo 72h di trattamento ($p < 0,01$), e la sua espressione risulta elevata dopo i sei passaggi previsti dall'esperimento. (Figura 19)

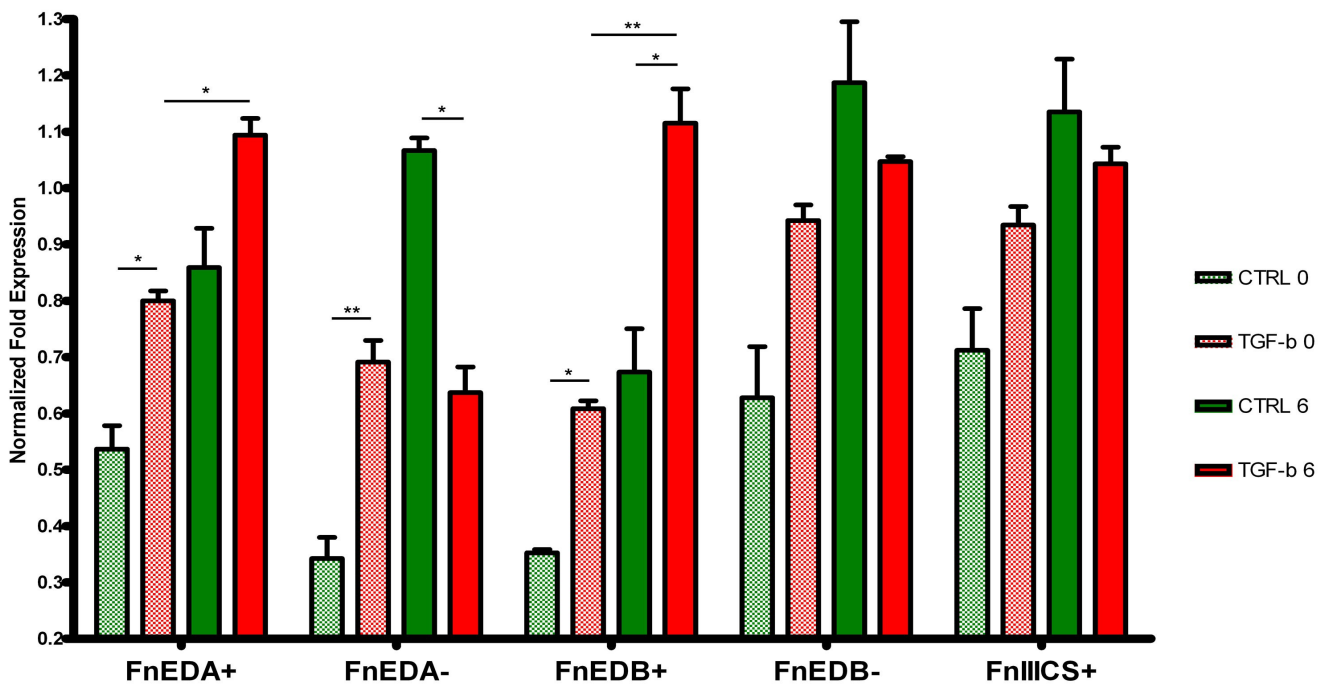


Figura 19

5.5 Studio delle varianti di splicing della FN in cellule DU145

Dallo studio sulle varianti di splicing della FN nelle cellule DU145 si evince che, a differenza delle PC3, l'espressione delle fibronectine viene indotta in seguito al trattamento.

Tutte le isoforme studiate mostrano solo dopo 72h un significativo aumento dell'espressione di: FnEDA⁺ (FN con dominio A; $p < 0,001$), FnEDA⁻ (FN senza dominio a; $p < 0,001$), FnEDB⁺ (FN con dominio B; $p < 0,001$), FnEDB⁻ (FN senza dominio B; $p < 0,001$) e FnIIICS⁺ (FN con dominio IIICS; $p < 0,001$).

Sulla base dei risultati ottenuti è possibile affermare che la presenza dell'isoforma oncofetale della FN (fFN) aumenta dopo aver indotto la EMT (Figura 20)

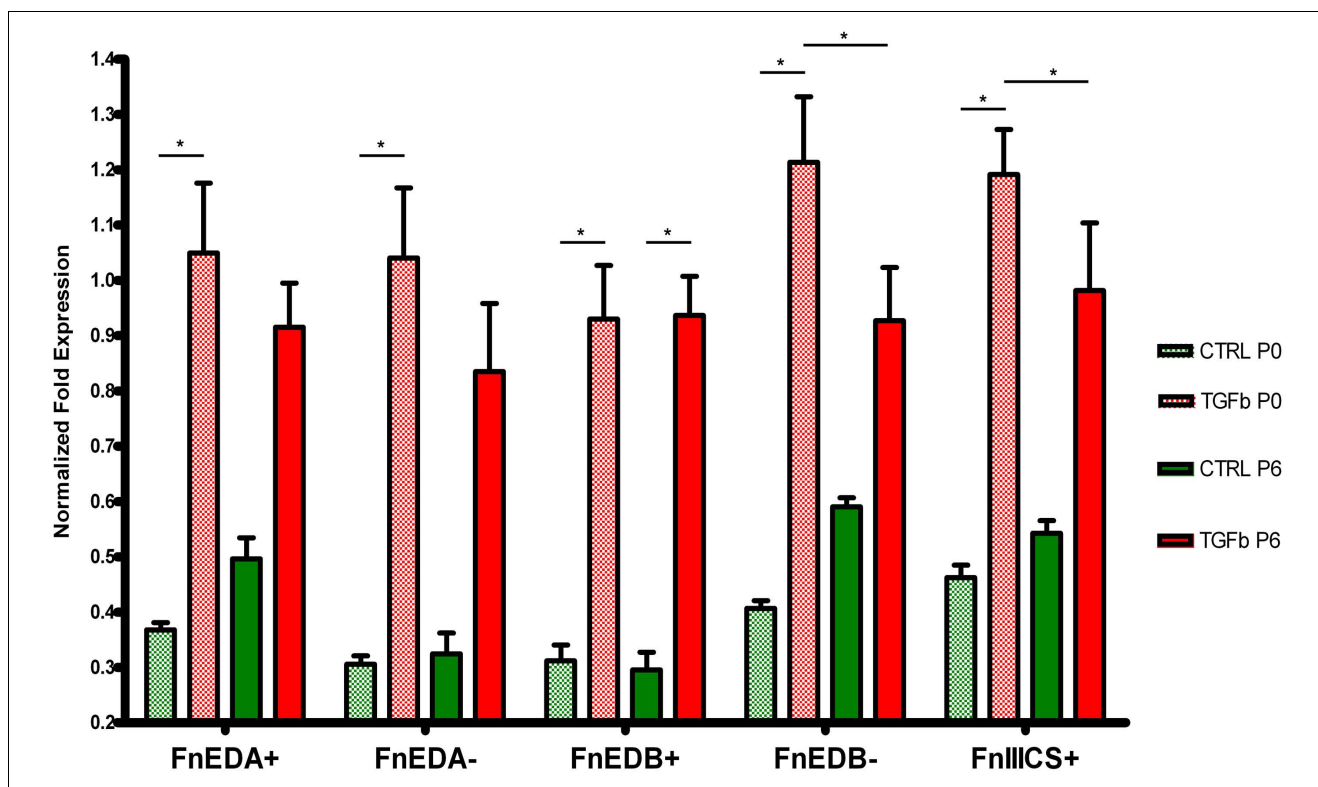


Figura 20

6. DISCUSSIONE

La maggior parte degli organi e dei tessuti adulti derivano da una serie di conversioni di cellule epiteliali a cellule mesenchimali e da mesenchimali a epiteliali, attraverso la EMT e il processo inverso MET. Le cellule epiteliali si presentano come uno strato continuo e sono tenute insieme tramite complessi giunzionali formati da desmosomi, giunzioni occludenti e giunzioni serrate. Sono cellule polarizzate in cui è possibile individuare un polo basale e uno apicale. Viceversa, cellule mesenchimali o stromali sono liberamente organizzati in una matrice extracellulare tridimensionale e comprendono tessuti connettivi adiacenti agli epiteli. La conversione di cellule epiteliali a cellule mesenchimali è fondamentale per lo sviluppo embrionale e comporta profondi cambiamenti fenotipici che includono la perdita di adesione cellula-cellula, la perdita della polarità cellulare, e l'acquisizione delle proprietà migratorie ed invasive.

L' EMT si verifica non solo durante lo sviluppo embrionale ma è considerato un fenomeno importante anche nella progressione dei carcinomi e nella metastatizzazione. Durante la progressione tumorale, le cellule di carcinoma, soprattutto quelle presenti al fronte invasivo del tumore primario, mostrano frequentemente una down-regolazione dei marcatori del fenotipo epiteliale e un'aumentata espressione di marcatori mesenchimali. La EMT si configura, quindi, come prerequisito per originare cellule tumorali capaci di infiltrare i tessuti circostanti e di metastatizzare.

Sono stati identificati dei marcatori molecolari per valutare se una cellula epiteliale è andata o meno incontro al processo EMT. Il principale marcatore è la perdita della E-caderina, evento associato alla distruzione delle giunzioni cellula-cellula.

La perdita graduale della E-caderina, la principale proteina transmembrana delle fasce aderenti delle cellule epiteliali differenziate e polarizzate, si correla con l'aggressività di numerosi carcinomi e con il peggioramento della prognosi, mentre l'espressione forzata di E-caderina tramite transfezione sopprime lo sviluppo del tumore in diversi modelli sperimentali tumorali in vitro e in vivo. [Nelson e Nusse, 2004].

L' EpCAM (*“Epithelial cell adhesion molecule”*) è una glicoproteina transmembrana degli epiteli di 40 KDa, coinvolta nell'attivazione di pathways intracellulari connessi con la proliferazione e la polarità cellulare. E'

presente in numerosi tipi di carcinoma, come quello della mammella e dell'ovaio [Trzpis et al., 2007] dove un' aumentata espressione della proteina correla con una prognosi peggiore.

La N-caderina (caderina neurale) normalmente si trova espressa solo nelle cellule del sistema nervoso, ma viene prodotta in alcune cellule di carcinoma che hanno perso l'espressione dell'E-caderina e, in questo contesto cellulare, è associata ad un aumentato potenziale invasivo [Nieman et al., 1999].

La vimentina è una proteina del citoscheletro appartenente alla famiglia dei filamenti intermedi espressa nelle cellule di origine mesenchimale ed è un marcatore di EMT ampiamente utilizzato [Mendez et al., 2010]. Dati in letteratura suggeriscono che il silenziamento della vimentina induce le cellule mesenchimali ad adottare morfologie epiteliali, e che la trasfezione di vimentina in cellule epiteliali le induce ad adottare morfologie mesenchimali in seguito all'assemblaggio dei filamenti intermedi di vimentina. Diversi studi hanno dimostrato che la up-regolazione della vimentina nei carcinomi correla con i parametri di malignità quali il grado di incidenza del tumore e la sopravvivenza [Hendrix et al., 1996].

Anche se i processi di EMT sono documentati in molti modelli cellulari tumorali in vitro, il significato di EMT durante la progressione del cancro e anche la sua rilevanza nei tessuti tumorali umani non è ancora del tutto definita. Questa questione è dovuta principalmente alla mancanza di prove convincenti di EMT in campioni clinici [Thiery et al., 2009].

Un altro punto interessante è la discrepanza tra i risultati ottenuti in vitro, in linee cellulari tumorali, e in vivo, nei tumori umani, in cui sono state rilevate solo alcune cellule che hanno subito o sono in procinto di subire un EMT (Thompson et al., 2005). È possibile che nei tumori umani le condizioni cellulari non consentono una completa EMT e le cellule rispondono solo parzialmente a questi stimoli, mentre alle stesse condizioni, in vitro si verifica una transizione molto estesa. In ogni caso, questa EMT parziale ottenuta in vivo potrebbe comportare l'acquisizione di alcuni marcatori mesenchimali e mostrare maggiore invasione pur mantenendo la maggior parte delle caratteristiche epiteliali. [Garcia, 2014].

Per meglio comprendere i dati ottenuti relativamente all'avvenuta EMT e alla morfologia cellulare, è necessario considerare che è stato precedentemente dimostrato che cellule invasive e metastatiche possono conservare un fenotipo epiteliale differenziato [Rajasekaran et al., 2004]. Tale apparente controversia può essere spiegata come un fenomeno di EMT incompleta, suggerendo che la transizione di cellule epiteliali

verso il fenotipo mesenchimale, così come delle cellule tumorali verso un fenotipo aggressivo maligno, non è un evento “tutto o nulla”, bensì un processo a più fasi che si manifesta in una vasta gamma di cambiamenti fenotipici [Christiansen e Rajasekaran, 2006]. Inoltre, le fasi che caratterizzano il processo di EMT non necessariamente si verificano consecutivamente e non sono tutte obbligatoriamente presenti in un dato campione.

Sulla base di queste indicazioni, pur non essendoci cambiamenti nella morfologia cellulare evidenti al microscopio ottico, in seguito al trattamento con TGF- β sia nelle PC3 che nelle DU145, i nostri risultati ottenuti affermano che c'è stata una parziale EMT. In nessuna delle due linee cellulari utilizzate si verifica lo "switching" delle caderine; infatti la citofluorimetria delle PC3 mette in evidenza solo una riduzione di cellule EpCAM positive e non mostra variazione nell'espressione delle due caderine, mentre nelle cellule DU145 dopo il trattamento si ha una significativa riduzione dell' E-caderina ma queste cellule non esprimono N-caderina. A conferma dell'EMT vi sono i dati di western-blot dove in entrambe le linee cellulari, PC3 e DU145 la riduzione della E-caderina e di EpCAM è seguita da un' aumentata espressione della Vimentina. L'unico dato che ci permette di affermare lo "switching" delle caderine proviene dalla metodica PCR nelle cellule PC3 dove sia E-caderina che EpCAM mostrano una significativa riduzione correlata con un' aumentata espressione sia di N-caderina che di Vimentina. La stessa metodica nelle cellule DU145 conferma i dati del western-blot.

Nel seguente lavoro, inoltre, è stata studiata anche l'espressione della fibronectina una glicoproteina considerata, anch'essa marcatore delle cellule mesenchimali. Le PC3 non trattate, oltre ad esprimere già sia la N-caderina che la Vimentina, esprimono tutte le varianti della fibronectina. Questo dato potrebbe essere spiegato dal fatto che queste cellule appartengono ad un tumore secondario. Tuttavia il trattamento con il TGF- β determina dopo 72h un aumento delle varie isoforme in particolare dell'isoforma contenente il dominio EDB. Le cellule DU145 mostrano l'espressione genica di fibronectina solo dopo essere state trattate. Le cellule PC3 in seguito ad induzione con TGF- β , analizzate al citofluorimetro, non rivelano sulla loro superficie cellulare antigeni tipici dei progenitori mesodermali (MPCs), perciò possiamo affermare che il processo EMT non passa attraverso le MPC.

7. Conclusioni

A conclusione degli esperimenti effettuati è possibile evidenziare che in seguito all'induzione dell'EMT le cellule PC3 non passano attraverso lo stato di MPCs. Inoltre essendo una linea cellulare metastatica, le PC3, mostrano sia caratteristiche epiteliali che mesenchimali e questo porta a pensare che stanno già subendo una transizione epitelio-mesenchimale. Tuttavia il trattamento facilita l'incremento dei marcatori mesenchimali permettendo di affermare l'avvenuta, seppur parziale, EMT. Anche dallo studio della FN e delle diverse isoforme di splicing si evincono differenze di espressione tra le due linee cellulari utilizzate durante gli esperimenti. In particolar modo le cellule PC3 esprimono già tutte le diverse isoforme della FN e dopo il trattamento questa espressione aumenta in maniera significativa, soprattutto in riferimento all'isoforma contenente il dominio EDB.

La linea cellulare DU145 è stata isolata da tumore primario. I dati ottenuti su questa linea cellulare permettono di affermare l'avvenuta EMT, infatti pur non essendoci un totale spegnimento dei marcatori epiteliali, in seguito al trattamento con il TGF- β vi è l'acquisizione del fenotipo mesenchimale. Il trattamento delle DU145 ha messo in evidenza che queste cellule necessitano di più tempo per indurre la EMT.

I dati di PCR mostrano che la linea cellulare di tumore primario non presenta espressione delle isoforme di FN e che il trattamento favorisce l'aumento dell' isoforma EDB⁺ già dopo 72h.

Tutto ciò permette di affermare l'associazione dell'induzione di EMT con l'aumentata espressione dell' isoforma oncofetale della fibronectina, fortificando l'idea di poter utilizzare, tale isoforma come target in radioterapia.

8. Bibliografia

- ⌚ Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner- Frasen M, Nieto MA." *Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease*". *J Clin Invest*. 2009;119:14-38-49
- ⌚ Alisson-Silva F, Freire-de-Lima L, Donadio JL, Lucena MC, Penha L, Sà-Diniz JN, Dias WB, Todeschini AR." *Increase of O-glycosylated oncofetal fibronectin in high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition of cultured human epithelial cells*". *PloS One*. 2013;8:e60471
- ⌚ Astrof S, Crowley D, Hynes RO. " *Multiple cardiovascular defects caused by the absence of alternatively spliced segments of fibronectin*". *Dev Biol*. 2007;311:11-24
- ⌚ Astrof S, Hyner RO." *Fibronectins in vascular morphogenesis. Angiogenesis*". 2009;12:165-75
- ⌚ Babaev VR, Porro F, Linton MF, Fazio S, Barelle FE, Muro AF. " *Absence of regulated splicing of fibronectin EDA exon reduces atherosclerosis in mice. Atherosclerosis*". 2008;197:534-40
- ⌚ Barber T, Esteban-Pretel G, Marin MP, Timoneda J. " *Vitamin a deficiency and alterations in the extracellular matrix*". *Nutrients*. 2014;6:4984-5017
- ⌚ Bazigou E, Xie S, Chen C, Weston A, Miura N, Sorokin L, Adams R, Muro AF, Sheppard D, Makinen T. " *Integrin-alpha9 is required for fibronectin matrix assembly during lymphatic valve morphogenesis*". *Dev Cell*. 2009;17:175-86
- ⌚ Bissell MJ, Radisky D. " *Putting tumours in context*". *Nat Rev Cancer*. 2011;1:46-54
- ⌚ Boyer B, Thiery JP." *Epithelium-mesenchyme interconversion as example of epithelial plasticity*". *Apmis*.1993;101:257-68
- ⌚ Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Kirchner T. " *Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment*". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10356-61

- ⌚ Buratti E, Muro AF, Giombi M, Gherbassi D, Iaconcig A, Baralle FE. "RNA folding affects the recruitment of SR proteins by mouse and human polypurinic enhancer elements in the fibronectin EDA exon". *Mol Cell Biol.* 2004;24:1387-400
- ⌚ Carnemolla B, Balza E, Siri A, Zardi L, Nicotra MR, Bigotti A, Natali PG." A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors". *J Cell Biol.* 1989;108:1139-48
- ⌚ Castellani P, Borsi L, Carnemolla B, Birò A, Dorcaratto A, Viale GL, Neri D, Zardi L. "Differentiation between high- and low-grade astrocytoma using a human recombinant antibody to the extra domain-B of fibronectin". *Am J Pathol.* 2002;161:1695-700
- ⌚ Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Nardi L. "The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis". *Int J Cancer.* 1994;59:612-8
- ⌚ Chauhan AK, Iaconcing A, Baralle FE, Muro AF." Alternative splicing of fibronectin: a mouse model demonstrates the identity of in vitro and in vivo systems and the processing autonomy of regulated exons in adult mice". *Gene.* 2004;7:55-63
- ⌚ Christiansen JJ, Rajasekaran AK. "Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis." *Cancer Res.* 2006;66: 8319-26.
- ⌚ Davies JA. "Mesenchyme to epithelium transition during development of the mammalian kidney tubule". *Acta Anat.*1996;156:187-201
- ⌚ De Craene B, Gilbert B, Stove C, Bruyneel E, van Roy F, Berx G. "The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program". *Cancer Res.* 2005;65:6237-44
- ⌚ Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. "TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression". *Nat Genet.* 2001;29:117-29

- ⌚ Fazzi R, Pacini S, Carnicelli V, Trombi L, Montali M, Lazzarini E, Petrini M. "Mesodermal progenitor cells (MPCs) differentiate into mesenchymal stromal cells (MSCs) by activation of Wnt5/calmodulin signalling pathway". *PLoS One*. 2011;6:e25600
- ⌚ French-Constant C. "Alternative splicing of fibronectin--many different proteins but few different functions". *Exp Cell Res*. 1995;221:261-71
- ⌚ Fidler IJ, Poste G. "The "seed and soil" hypothesis revisited". *Lancet Oncol*. 2008;9:808
- ⌚ Freire-de-Lima L. "Sweet and sour: the impact of differential glycosylation in cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition". *Front Oncol*. 2014;4:59
- ⌚ García de Herreros A. "Epithelial to mesenchymal transition in tumor cells as consequence of phenotypic instability". *Front Cell Dev Biol*. 2014;2:71
- ⌚ Giordano A, Gao H, Anfossi S, Cohen E, Mego M, Lee BN, Tin S, De Laurentiis M, Parker CA, Alvarez RH, Valero V, Ueno NT, De Placido S, Mani SA, Esteva FJ, Cristofanilli M, Reuben JM. "Epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in patients with HER2-positive metastatic breast cancer". *Mol Cancer Ther*. 2012;11:2526-34
- ⌚ Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Rose L, Zollner TM, Krahn T, von Ahsen O. "Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition." *BMC Cancer*. 2012;12:178
- ⌚ Hanahan D, Weinberg RA. "The hallmarks of cancer". *Cell*. 2000;100:57-70
- ⌚ Harris WP, Mostaghel EA, Nelson PS, Montgomery B. "Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion". *Nat Clin Pract Urol*. 2009;6:76-85
- ⌚ Hay ED. "An overview of epithelio-mesenchymal transformation". *Acta Anat*. 1995; 154:8-20
- ⌚ Hellemans J, Vandesompele J. "Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis". *Methods Mol Biol*. 2014;1160:19-26

- ⌚ Hendrix MJ, Seftor EA, Chu YW, Trevor KT, Seftor RE. *"Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis."* *Cancer Metastasis Rev* .1996;15:507-25.
- ⌚ Hernnas J, Nettelblatt O, Bjermer L, Sarnstrand B, Malmstrom A, Hallgren R." *Alveolar accumulation of fibronectin and hyaluronan precedes bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat"*. *Eur Respir J*. 1992; 5:404-10
- ⌚ Herrick SE, Sloan P, McGurk M, Freak L, McCollum CN, Ferguson MW. *"Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers"*. *Am J Pathol*. 1992;141:1085-95
- ⌚ Huang XZ, Wu JF, Ferrando R, Lee JH, Wang YL, Farese RV Jr, Sheppard D. *"Fatal bilateral chylothorax in mice lacking the integrin alpha9beta1"*. *Mol Cell Biol*. 2000;20:5208-15
- ⌚ Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliansky VE, Wang SS, Bissell DM. *"Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis"*. *J Cell Biol*. 1994;127:2037-48
- ⌚ Kalluri R, Weinberg RA. *"The basics of epithelial-mesenchymal transition"*. *J Clin Invest*. 2009;119:1420-8
- ⌚ Klarmann GJ, Hurt EM, Mathews LA, Zhang X, Duhagon MA, Mistree T, Thomas SB, Farrar WL. *"Invasive prostate cancer cells are tumor initiating cells that have a stem cell-like genomic signature"*. *Clin Exp Metastasis*. 2009;26:433-46
- ⌚ Klymkowsky MW, Savagner P. *"Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe"*. *Am J Pathol*.2009;174:1588-1593
- ⌚ Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Li Y, Wang Z, Sethi S, Sarkar FH. *"Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells"*. *PloS One*. 2010;5:e12445
- ⌚ Kornblihtt AR, Vibe-Pedersen K, Baralle FE. *"Human fibronectin: cell specific alternative mRNA splicing generates polypeptide chains differing in the number of internal repeats"*. *Nucleic Acids Res*. 1984;12:5853-68

- ⌚ Kornblihtt AR, Vibe-Pedersen K, Baralle FE. "*Human fibronectin: molecular cloning evidence for two mRNA species differing by an internal segment coding for a structural domain*". *Embo J.* 1984;3:221-6
- ⌚ Kothari AN, Mi Z, Zapf M, Kuo PC. "*Novel clinical therapeutics targeting the epithelial to mesenchymal transition*". *Clin Transl Med.*2014;15:3-35
- ⌚ Lamouille S, Xu J, Derynck R. "*Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*". *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15:178-96
- ⌚ Lenselink EA. "*Role of fibronectin in normal wound healing*". *Int Wound J.* 2013;7:9999
- ⌚ Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. "*The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*". *Cell.* 2008;133:704-15
- ⌚ Mao Y, Schwarzbauer JE. "*Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process*". *Matrix Biol.* 2005;24:389-99
- ⌚ Matsuura H, Greene T, Hakomori S. "*An alpha-N-acetylgalactosaminylation at the threonine residue of a defined peptide sequence creates the oncofetal peptide epitope in human fibronectin*". *J Biol Chem.* 1989;264:10472-6
- ⌚ Matsuura H, Hakomori S. "*The oncofetal domain of fibronectin defined by monoclonal antibody FDC-6: its presence in fibronectins from fetal and tumor tissues and its absence in those from normal adult tissues and plasma*". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:6517-2
- ⌚ Matuszak EA, Kyprianou N. "*Androgen regulation of epithelial-mesenchymal transition in prostate tumorigenesis*". *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2011;6:469-482
- ⌚ Matuszak EA, Kyprianou N. "*Androgen regulation of epithelial-mesenchymal transition in prostate tumorigenesis*". *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2011;6:469-482
- ⌚ Mego M, Mani SA, Lee BN, Li C, Evans KW, Cohen EN, Gao H, Jackson SA, Giordano A, Hortobagyi GN, Cristofanilli M, Lucci A, Reuben JM. "*Expression of epithelial-mesenchymal*

transition-inducing transcription factors in primary breast cancer: The effect of neoadjuvant therapy”.

Int J Cancer. 2012;130:808-16

- ⌚ Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. "Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition." *Faseb J.* 2010;24:1838-51
- ⌚ Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. " Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression". *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010;15:117-34
- ⌚ Muro AF, Moretti FA, Moore BB, Yan M, Atrasz RG, Wilke CA, Flaherty KR, Martinez FJ, Tsui JL, Sheppard D, Baralle FE, Toews GB, White ES. "An essential role for fibronectin extra type III domain A in pulmonary fibrosis". *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:638-45
- ⌚ Nelson WJ, Nusse R. "Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways." *Science .* 2004;303:1483-7
- ⌚ Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. "N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression". *J.Cell Biol.* 1999;147:631-44
- ⌚ Nieto M, Finn S, Loda M, Hahn WC. "Prostate cancer: Re-focusing on androgen receptor signaling". *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:1562-8
- ⌚ NietoMA. "The ins and out of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease". *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011; 27:347-376
- ⌚ Niu YN, Xia SJ. "Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer". *Asian Androl.* 2009;11:28-35
- ⌚ Pacini S, Carnicelli V, Trombi L, Montali M, Fazzi R, Lazzarini E, Giannotti S, Petrini M. "Constitutive expression of pluripotency-associated genes in mesodermal progenitor cells (MPCs)". *PLoS One.* 2010;25:e9861
- ⌚ Pacini S., Fazzi R., Montali M., Carnicelli V., Lazzarini E., Petrini M., "Specific integrin expression is associated with podosome-like structures on mesodermal progenitor cells". *Stem Cells Dev.* 2013 Jun 15;22:1830-8

- 🕒 Pankov R, Yamada KM. "*Fibronectin at a glance*". *J Cell Sci.* 2002;115:3861-3
- 🕒 Petrini M, Pacini S, Trombi L, Fazzi R, Montali M, Ikehara S, Abraham NG. "*Identification and purification of mesodermal progenitor cells from human adult bone marrow*". *Stem Cell Dev.* 2009;18:857-66
- 🕒 Pini A, Viti F, Santucci A, Carnemolla B, Zardi L, Neri P, Neri D." *Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel*". *J Biol Chem.* 1998;273:21769-76
- 🕒 Poli GL, Bianchi C, Virota G, Bettini A, Moretti R, Trachsel E, Elia G, Giovannoni L, Neri D, Bruno A. "*Radretumab radioimmunotherapy in patients with brain metastasis: a 124I-L19SIP dosimetric PET study*". *Cancer Immunol Res.* 2013;1:134-43
- 🕒 Polyak K, Weinberg RA. "*Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits*". *Nat Rev Cancer.* 2009;9:265-73
- 🕒 Radtke F, Clevers H. "*Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin*". *Science.* 2005;307:1904-9
- 🕒 Rajasekaran SA, Gopal J, Espineda C, Ryazantsev S, Schneeberger EE, Rajasekaran AK. "*HPAF-II, a cell culture model to study pancreatic epithelial cell structure and function*". *Pancreas.* 2004;29:e77-83.
- 🕒 Roy DC, Hocking DC. "*Recombinant fibronectin matrix mimetics specify integrin adhesion and extracellular matrix assembly*". *Tissue Eng Part A.* 2013;19:558-70
- 🕒 Ruoslahti E. "*Specialization of tumour vasculature*". *Nat Rev Cancer.* 2002;2:83-90
- 🕒 Sakai T, Jonson KJ, Murozono M, Sakai K, Magnuson MA, Wieloch T, Cronberg T, Isshiki A, Erickson HP, Fassler R. "*Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis*". *Nat Med.* 2001,7:324-30
- 🕒 Sakamoto S, Ichikawa T. "*Mechanism of prostate cancer invasion and metastasi*". *Nihon Rinsho.* 2014;72:2086-9

- 🕒 Santamaria M, Moscatelli G, Viale GL, Giovannoni L, Neri G, Viti F, Leprini A, Borsi L, Castellani P, Zardi L, Neri D, Riva P. *"Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer"*. *Clin Cancer Res.* 2003;9:571-9
- 🕒 Satelli A, Li S. *"Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy"*. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68:3033-46
- 🕒 Savagner P, Vallés AM, Jouanneau j, Yamada KM, Thiery JP. *"Alternative splicing in fibroblast growth factor receptor 2 is associated with induced epithelial-mesenchymal transition in rat bladder carcinoma cells"*. *Mol Biol Cell.* 1994;5:851-62
- 🕒 Schiefner A, Gebauer M, Skerra A. *"Extra-domain B in oncofetal fibronectin structurally promotes fibrillar head-to-tail dimerization of extracellular matrix protein"*. *J Biol Chem.* 2012;287:17578-88
- 🕒 Schwarzbauer JE, Tamkun JW, Lemischka IR, Hynes RO. *"Three different fibronectin mRNAs arise by alternative splicing within the coding region"*. *Cell.* 1983;35:421-31
- 🕒 Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. *"Cancer statistics, 2014"*. *CA Cancer J Clin.* 2014;64:9-29
- 🕒 Singh A, Settleman J. *"EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer"*. *Oncogene.* 2010;29:4741-51
- 🕒 Sleeman JP. *"The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors"*. *Recent Results Cancer Res.* 2000;157:55-81
- 🕒 Srebrow A, Blaustein M, Kornblihtt AR. *"Regulation of fibronectin alternative splicing by a basement membrane-like extracellular matrix"*. *FEBS Lett.* 2002;514:285-9
- 🕒 Tan MH, Sun Z, Opitz SL, Schmidt TE, Peters JH, George EL. *"Deletion of the alternatively spliced fibronectin EIIIA domain in mice reduces atherosclerosis"*. *Blood.* 2004;104:11-8
- 🕒 Tate CC, Garcia AJ, LaPlaca MC. *"Plasma fibronectin is neuroprotective following traumatic brain injury"*. *Exp Neurol.* 2007;207:13-22
- 🕒 The MICAD Research Team. *"⁷⁶Br-Human recombinant anti-ED-B fibronectin L19-small immunoprotein"*. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD).* 2007.

- ⌚ Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. "*Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*". *Cell*. 2009;139:871-90
- ⌚ Thiery JP, Sleeman JP. "*Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*". *Nat Rev Mol Cell Biol*.2006;7:131-42
- ⌚ Thiery JP." *Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression*". *Nat Rev Cancer*. 2002;2:442-54
- ⌚ To WS, Midwood KS. "*Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair*". *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011;4:21
- ⌚ Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. "*Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?*". *Cancer Res*. 2005;65:5991-5
- ⌚ Trombi L, Pacini S, Montali M, Fazzi R, Chiellini F, Petrini M. "*Selective culture of mesodermal progenitor cells*". *Stem Cell Dev*. 2009;18:1227-34
- ⌚ Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC." *Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule*". *Am J Pathol* 2007;171:386-96
- ⌚ Usami Y, Satake S, Nakayama F, Matsumoto M, Ohnuma K, Komori T, Semba S, Ito A, Yokozaki H. "*Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression*". *J Pathol*. 2008;215:330-9
- ⌚ Vandesompele J, De preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. "*Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*". *Genome Biol*. 2002;3:RESEARCH0034
- ⌚ Vicòvac L, Aplin JD. "*Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation*". *Acta Anat*. 1996;156:202-16
- ⌚ Wada AM, Smith TK, Osler ME, Reese DE, Bader DM. "*Epicardial/Mesothelial cell line retains vasculogenic potential of embryonic epicardium*". *Circ Res*. 2003;92:525-31
- ⌚ Weber CE, Li NY, Wai PY, Kuo PC. "*Epithelial-mesenchymal transition, TGF- β , and osteopontin in wound healing and tissue remodeling after injury*". *J Burn Care Res*.2012; 33:311-318

- ⌚ White ES, Baralle FE, Muro AF. "New insights into form and function of fibronectin splice variants". *J Pathol.* 2008;216:1-14
- ⌚ White ES, Muro AF. "Fibronectin splice variants: understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models". *IUBMB Life.* 2011;63:538-46
- ⌚ Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z. "Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis". *Am J Pathol.* 2005;166:1321-32
- ⌚ Yang F, Tuxhorn JA, Ressler SJ, McAlhany SJ, Dang TD, Rowley DR. "Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis". *Cancer Res.* 2005;65:8887-95
- ⌚ Yang J, Weinberg RA. "Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis". *Dev Cell.* 2008;14:818-29
- ⌚ Zardi L, Cecconi C, Barbieri O, Carnemolla B, Picca M, Santi L. "Concentration of fibronectin in plasma of tumor-bearing mice and synthesis by Ehrlich ascites tumor cells". *Cancer Res.* 1979;39:2774-9
- ⌚ Zeisberg M, Neilson EG. "Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions". *J Clin Invest.* 2009;119:1429-37
- ⌚ Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. "Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney". *J Biol Chem.* 2005;280:8094-100
- ⌚ Zhu B, Kyprianou N. "Transforming growth factor beta and prostate cancer". *Cancer Treat Res.* 2005;126:157-73
- ⌚ Zhu ML, Kyprianou N. "Role of androgens and the androgen receptor in epithelial-mesenchymal transition and invasion of prostate cancer cells". *FASEB J.* 2010; 24:769-77