



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

Dottorato di Ricerca in

Biologia Applicata e Medicina Sperimentale

XXX ciclo

Coordinatore: Prof.ssa Maria Assunta Lo Gullo

**Caratterizzazione della risposta all'ipossia
in differenti linee cellulari di Neuroblastoma umano**

Tesi di Dottorato di:

Dott.ssa **Maria Laura Giunta**

Tutor:

Chiar.mo Prof. **Riccardo Ientile**

SSD BIO/12 – BIOCHIMICA CLINICA E BIOLOGIA MOLECOLARE CLINICA

Triennio AAcc 2014/2015-AAcc 2016/2017

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 4
1. Il Neuroblastoma	pag. 4
1.1 Definizione e caratteristiche cliniche	pag. 4
1.2 Basi genetiche del neuroblastoma.....	pag. 7
1.2.1 Ruolo di N-MYC nel neuroblastoma.....	pag. 9
1.2.2 Altre anomalie genetiche del neuroblastoma	pag. 16
1.3 Uno sguardo al Ciclo Cellulare nel Neuroblastoma ad alto rischio.....	pag. 20
2. L'Ipossia.....	pag. 27
2.1 Caratteristiche generali.....	pag. 27
2.2 La Transglutaminasi 2 ed il suo ruolo in condizioni di ipossia	pag. 35
2.3 Effetti dell'ipossia sul neuroblastoma.....	pag. 49
SCOPO DELLA TESI	pag. 57
MATERIALI E METODI	pag. 59
1. Colture cellulari	pag. 59
2. Esposizione delle SHSY5Y e delle IMR-32 ad ipossia.....	pag. 60
3. Saggio di vitalità cellulare con MTT	pag. 60
4. Analisi di espressione genica	pag. 61
4.1 Estrazione e quantificazione dell'RNA totale	pag. 61
4.2 Retrotrascrizione	pag. 62
4.3 Real Time PCR.....	pag. 62
5. Analisi di espressione ed attività di specifiche proteine.....	pag. 65
5.1 Isolamento di proteine nucleari e citoplasmatiche.....	pag. 65
5.2 Saggio di cambiamento della mobilità elettroforetica (EMSA)	pag. 66
5.2.1 Marcatura della sonda.....	pag. 67
5.2.2 EMSA, lavaggi e sviluppo della membrana.....	pag. 67
5.3 SDS-PAGE e Western Blot	pag. 68

6. Analisi del ciclo cellulare tramite citofluorimetria a flusso.....	pag. 70
7. Elettroforesi su gel a singola cellula (SCGE) o Comet assay	pag. 73
8. Analisi statistica.....	pag. 75
RISULTATI E DISCUSSIONE.....	pag. 76
1. Valutazione e confronto della risposta delle SHSY5Y all'esposizione ad un microambiente ipossico in due tempi diversi	pag. 76
2. Valutazione e confronto della risposta delle IMR-32 all'esposizione ad un microambiente ipossico in due tempi diversi	pag. 98
CONCLUSIONI	pag. 119
BIBLIOGRAFIA.....	pag. 122

INTRODUZIONE

1. IL NEUROBLASTOMA

1.1 Definizione e caratteristiche cliniche

Il neuroblastoma, il più comune tumore solido extracranico dell'infanzia, è stato descritto per la prima volta nel 1910 dal patologo statunitense James Homer Wright, che gli diede questo nome a causa dell'aspetto delle sue cellule, caratterizzate da fibrille con un arrangiamento simile ai neuroblasti (Huang and Weiss, 2013).

Nello specifico esso si presenta come una neoplasia maligna embrionale, generata dall'aberrante crescita di cellule indifferenziate del neuroectoderma, progenitrici della cresta neurale da cui origina il Sistema Nervoso Simpatico (SNS), ed in particolare la midollare del surrene, i paragangli ed i gangli simpatici (Bosse and Maris, 2016; Schwab et al., 2003). Tipicamente le cellule si presentano rotonde e piccole, con scarso contenuto citoplasmatico, a differenza del ganglioneuroblastoma dove alcune cellule sono differenziate, con nuclei e citoplasma più abbondanti (Edsjö et al., 2007).

Il neuroblastoma è un tumore enigmatico ed imprevedibile a causa del suo contrastante comportamento clinico che spazia dalla progressione della malattia, senza speranze per la vita, alla maturazione a ganglioneuroblastoma o ganglioneuroma, ed anche alla regressione spontanea della patologia, con un'incidenza tra dieci e cento volte più grande di qualsiasi altro cancro umano (Mullassery and Losty, 2016; Pritchard and Hickman, 1994).

Come accennato in precedenza, esso costituisce più del 20% dei tumori infantili nel primo anno di vita (SEER, 2015), considerando però che l'età media alla diagnosi è di 17 mesi, ed ha un'incidenza di 9-12 casi su un milione di individui sotto i 15 anni di età (Mullassery and Losty, 2016).

Il neuroblastoma può insorgere in qualunque punto del SNS, che si estende dalla base del cranio fino alle pelvi (Hallett and Traunecker, 2012). Il sito primario più comune del tumore è l'addome, che nel 35% dei casi si presenta come una massa che ha

origine dalla cellule che secernono gli ormoni adrenergici della midollare del surrene (Hallett and Traunecker, 2012). Frequenti anche i neuroblastomi paraspinali, che possono espandersi attraverso gli spazi intraforaminali e causare paralisi per compressione del midollo spinale (Maris, 2010). Un 20% di questo tumore si presenta nel mediastino posteriore ed un 5% nel collo e nelle pelvi (Hallett and Traunecker, 2012). In particolare i neuroblastomi primari nel collo e nel torace possono causare la sindrome di Horner o sindrome oculopupillare, caratterizzata da restringimenti delle palpebre e della pupilla (ptosi e miosi) e da assenza di sudorazione (anidrosi) sul volto (Mullassery and Losty, 2016; Maris, 2010). Il neuroblastoma può rimanere incapsulato nel sito primario o invadere gli organi locali vicini e circondare nervi critici e vasi sanguigni vitali come il tronco celiaco (Mullassery and Losty, 2016; Maris, 2010) o diffondersi nell'organismo generando metastasi, più frequentemente nei linfonodi, nel midollo osseo, da cui si infiltrano nella corteccia ossea, nel fegato e nella pelle (Maris, 2010; Schell and Bergeron, 2003). In alcuni rari casi si possono riscontrare metastasi nella cavità oculare, evidenziate da ecchimosi periorbitali, note come “occhi da procione”, e proptosi (Mullassery and Losty, 2016; Maris, 2010). Nella figura 1 sono rappresentate le descrizioni cliniche del neuroblastoma appena citate.

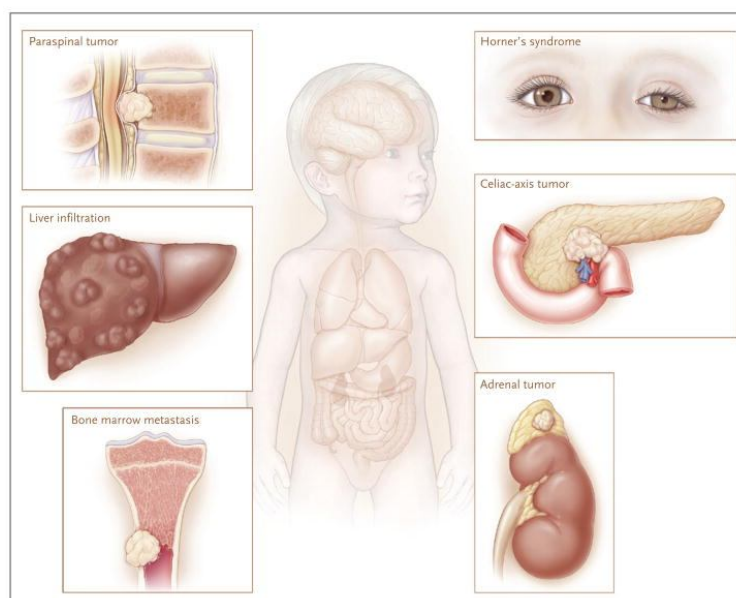


Figura 1. Quadro clinico del neuroblastoma.
(fonte: Maris, 2010)

Nei bambini di 18 mesi o poco più grandi il neuroblastoma è di solito molto difficile, se non impossibile, da rimuovere chirurgicamente o presenta metastasi. Pertanto è necessario trattarlo con più tipi di terapie intensive, considerando un tasso di sopravvivenza del 40-50% (Kreissman et al., 2013). Tuttavia nei pazienti con meno di 18 mesi il tumore è più facilmente curabile con un trattamento chemioterapico, in parte moderato (Brodeur and Bagatell, 2014). Infine in bambini di età inferiore all'anno al momento della diagnosi e con un quadro clinico spesso caratterizzato da piccoli tumori primari nell'addome o nella cavità toracica, accompagnati da metastasi al fegato ed alla pelle, con un minimo coinvolgimento del midollo osseo, si osserva in modo sorprendente la regressione di più del 10% dei neuroblastomi ed in alcuni casi la loro totale scomparsa, senza o con un trascurabile intervento terapeutico (Brodeur and Bagatell, 2014; Schwab et al., 2003).

Da metà degli anni '90 il Sistema Internazionale di stadiazione del neuroblastoma (INSS o International Neuroblastoma Staging System) classifica questa neoplasia in cinque stadi, dall'uno al quattro (1, 2A, 2B, 3 e 4) che raffigurano i vari livelli della sua diffusione nell'organismo e la probabilità di essere rimosso chirurgicamente; pertanto lo stadio 1 rappresenta un tumore localizzato che si può asportare radicalmente e lo stadio 4 un tumore ormai ampiamente disseminato in tutto il corpo, da trattare solo con avanzati trattamenti radio e chemioterapici (Edsjö et al., 2007; Brodeur et al., 1993). Il più recente sistema di stadiazione, chiamato INRGSS (International Neuroblastoma Risk Group Staging System) non tiene più in considerazione i dati derivanti dai risultati chirurgici, ma si basa soprattutto su criteri clinici e sui "fattori di rischio definiti dalle immagini" o IDRFs, collocando così il neuroblastoma in tre gruppi principali, detti L1, L2 ed M, dove L sta per tumore localizzato ed M sta per tumore metastatico (Monclair et al., 2009). Sia l'INSS sia l' INRGSS hanno introdotto un altro intrigante stadio, detto rispettivamente 4S ed MS, dove S significa speciale, nel quale infatti sono racchiusi tutti i casi "speciali" di neuroblastoma con regressione spontanea (Monclair et al., 2009).

1.2 Basi genetiche del neuroblastoma

La comprensione di una parte considerevole degli eventi genetici causa delle anomalie biologiche che contribuiscono ai fenomeni di tumorigenesi del neuroblastoma è una grossa conquista della scienza, che risale a non più di un decennio passato (Bosse and Maris, 2016; Oldridge et al., 2015).

Il neuroblastoma è per lo più un cancro che insorge in modo del tutto casuale, anche se circa l'1-2% dei piccoli pazienti mostra una storia familiare di questa neoplasia (Schell and Bergeron, 2003; Mossé et al, 2008). In questi rari casi il tumore, che generalmente si manifesta in bambini molto piccoli con diversi focolai primari, mostra quasi sempre un'eredità autosomica dominante (Knudson and Strong, 1972) ed è abbastanza recente la scoperta dei due geni principalmente coinvolti, le cui mutazioni predispongono alla patologia (Mossé et al, 2008; Raabe et al., 2008).

Il primo gene, responsabile di circa il 75% dei neuroblastomi ereditati, codifica per un recettore tirosin-chinasico transmembrana, il cui ligando è sconosciuto, noto con il nome *ALK*, acronimo dell'inglese *Anaplastic lymphoma kinase* ed in italiano conosciuto come chinasi del linfoma anaplastico (Mossé et al, 2008). La regolazione di *ALK* gioca anche un ruolo molto importante nel normale sviluppo del sistema nervoso centrale, pertanto le sue mutazioni nelle cellule della linea germinale non solo possono comportare la probabile comparsa di un neuroblastoma congenito, ma anche importanti difetti neurocognitivi e di crescita in generale (de Pontual et al., 2011). Solitamente *ALK* agisce come uno dei principali oncogeni di due gravi neoplasie ovvero il linfoma a grandi cellule anaplastico (ALCL) ed il tumore dei polmoni a cellule non piccole (NSLC), dove, in seguito ad un evento di traslocazione, è espresso in modo anomalo in un trascritto di fusione che contribuisce alla trasformazione cellulare ed al progredire del tumore (Carpenter and Mossé, 2012). L'attivazione costitutiva di questo gene avviene in modo differente nel neuroblastoma familiare, infatti essa è la conseguenza di mutazioni che hanno effetto sul dominio chinasico della proteina, un fenomeno che spesso è stato anche riscontrato in pazienti con neuroblastomi non ereditari (Bresler et al., 2014).

Il secondo gene, conosciuto con il nome *PHOX2B*, acronimo di *paired-like homeobox 2B*, localizzato nella banda 12 sul braccio corto (p) del cromosoma 4 (in breve 4p12), codifica per un fattore di trascrizione espresso esclusivamente a livello del sistema nervoso e fondamentale per il corretto sviluppo della cresta neurale (Raabe et al., 2008; Stafman and Beierle, 2016). La perdita della sua funzione, causata da mutazioni, è responsabile di un 10% circa di neuroblastomi familiari prevalentemente in bambini già affetti dalla sindrome di Ondine o da ipoventilazione centrale congenita e raramente in bambini che presentano la malattia di Hirschsprung, una patologia congenita della motilità intestinale (Raabe et al., 2008).

Comunque, come accennato prima, il neuroblastoma è principalmente una complessa patologia genetica la cui comparsa è solitamente imprevedibile e occasionale, senza nessuna predisposizione familiare. Notevoli studi di associazione “genome wide” (GWAS), che si basano su campioni ottenuti dalla collaborazione del *Children’s Oncology Group* (COG), hanno permesso di cominciare a delineare il vastissimo panorama genetico di questo tumore, identificando diversi polimorfismi di numerosi geni associati in modo significativo allo sviluppo del neuroblastoma (Bosse and Maris, 2016). Tra questi geni i più interessanti da ricordare sono *BARD1* e *LMO1*, in quanto i loro alleli mutati sono tra i più pericolosi perché possibili responsabili della comparsa di un neuroblastoma che va incontro a metastasi, con il peggiore decorso clinico immaginabile (Bosse and Maris, 2016).

Nello specifico *BARD1*, acronimo di *BRCA1-associated RING domain-1*, localizzato nella banda 35 sul braccio lungo (q) del cromosoma 2 (2q35), codifica per una proteina che solitamente forma un eterodimero con la proteina BRCA1, grazie all’interazione dei loro rispettivi domini o motivi RING, e tipicamente svolge una funzione di soppressore del tumore (Bosse and Maris, 2016; Capasso et al., 2009). Variazioni nel suo gene sono correlate con l’espressione di una sua isoforma, detta *BARD1β*, la quale collabora con le chinasi della famiglia Aurora nel promuovere la crescita cellulare. Le Aurora chinasi A e B sono delle chinasi della serina e treonina essenziali per la duplicazione delle cellule, infatti, ad esempio, l’Aurora chinasi B gioca un ruolo importante nell’attacco del fuso mitotico ai centromeri del cromosoma durante la mitosi (Stafman and Beierle, 2016).

LMO1, acronimo di *LIM domain only 1*, è un gene che codifica per una proteina coinvolta nella regolazione trascrizionale, del quale è stato identificato un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP), dato dalla transversione G>T. In tal caso l'allele con la guanina (G) è l'allele rischioso, che induce l'aumentata espressione dell'oncogene *LMO1*, associato con la formazione del tumore. Diversamente l'allele con la timina (T), risulta protettivo perché permette la drastica riduzione dell'espressione del succitato oncogene (Oldridge et al., 2015).

1.2.1 Ruolo di N-MYC nel neuroblastoma

Il gene *N-MYC*, identificato per la prima volta nelle cellule di neuroblastoma nel 1983, mostra notevoli omologie di sequenza con il gene *MYC*, in quanto codifica per una fosfoproteina che appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione MYC (Kohl et al. 1983; Kohl et al., 1986). La proteina N-MYC, come MYC, a livello del nucleo forma un dimero con la proteina MAX (Myc-associated factor X) ed in questa combinazione riconosce e si lega alle sequenze *Enhancer Box* o *E-box* (CANNTG), regolando l'espressione di geni coinvolti in molteplici risposte cellulari (Meyer and Penn 2008; Stafman and Beierle, 2016). Però mentre MYC è espressa in maniera quasi ubiquitaria nell'organismo sia giovane sia adulto, N-MYC presenta un'espressione tessuto specifica e preferibilmente nei reni e a livello delle strutture del sistema nervoso, quasi esclusivamente in cellule coinvolte negli stadi precoci dello sviluppo, come le cellule staminali neurali (Huang and Weiss, 2013). Tale fenomeno è in accordo con la consistente riduzione di N-MYC nelle cellule di neuroblastoma che vanno incontro a differenziazione (Reddy et al., 2006).

Risale sempre agli anni '80 la scoperta di alti livelli di amplificazione del gene *N-MYC* sul cromosoma 2p24 nelle cellule di neuroblastoma, un'aberrazione genetica che in almeno il 20% dei neuroblastomi primari genera una neoplasia aggressiva, difficilmente curabile e quindi con scarse possibilità di sopravvivenza (Seeger et al., 1985). L'amplificazione genica è un importante cambiamento genomico che esita nell'incremento del dosaggio del gene interessato, inoltre essa è una delle principali vie molecolari attraverso la quale è attivato il potenziale oncogenico di un possibile proto-oncogene come *N-MYC* (Schwab et al., 2003). Analisi sulla sequenza del DNA

di *N-MYC* non hanno evidenziato mutazioni a livello delle amplificazioni dello stesso, suggerendo che è proprio la sproporzionata espressione della proteina wild-type a contribuire allo scatenarsi dei fenomeni di tumorigenesi nel neuroblastoma (Ibson and Rabbitts, 1988; Schwab et al., 2003).

L'amplificazione solitamente può accadere nel sito del cromosoma in cui risiede il gene colpito, ma talvolta, come nel caso di *N-MYC*, essa avviene in una regione anche molto distante da quella in cui si trova la singola copia del gene (Schwab et al., 2003). La regione di DNA amplificata che circonda *N-MYC* oscilla dalle 100Kb a più di 1Mb, solitamente presentandosi tra le 100 e le 200Kb, nella quale si trovano quasi esclusivamente solo numerose copie dello stesso gene *N-MYC* ed in alcuni casi qualche altro gene che si amplifica contestualmente (Schwab et al., 2003; Amler et al., 1996). Molto spesso le copie amplificate di *N-MYC*, che possono arrivare fino a più di 100, si distaccano dal cromosoma stesso, sotto forma di "double minutes", letteralmente "duplicati ma non divisi", ovvero frammenti di DNA amplificato che assumono la forma di cromosomi soprannumerari di minuscole dimensioni (Schwab et al., 2003). Meno comunemente le zone di DNA amplificato si presentano associati al cromosoma come HSR, cioè *Homogenously Staining Regions* (Schwab et al., 2003), dette così perché se sufficientemente estese, diventano visibili in metafase, dopo colorazione differenziale del cromosoma, senza il tipico bandeggio.

Analisi citogenetiche ulteriori hanno messo in evidenza che la mancanza in alcune cellule di neuroblastoma dell'amplificazione di *N-MYC* non si traduce necessariamente nella presenza in esse di una singola copia del suddetto gene (Schwab et al., 2003). Infatti sono stati rivelate altre vie alternative all'amplificazione che potrebbero agire sul potenziale oncogenico di *N-MYC* e, tra queste, si annoverano la duplicazione del suo locus genico, la formazione di isocromosomi del braccio corto del cromosoma 2 ed eventi di traslocazione non bilanciata che risultano in un guadagno da 1 a 3 copie per cellula del gene imputato (Corvi et al., 1995; Valent et al., 2002).

L'alterata espressione del fattore di trascrizione *N-MYC* è, insieme alle altre mutazioni genetiche, una delle cause principali dell'insorgenza del neuroblastoma ed è importante sottolineare che tale proteina svolge molteplici ruoli che inducono la tumorigenesi (Huang and Weiss, 2013).

L'azione principale di N-MYC con il maggior effetto oncogenico è la sua capacità di promuovere una continua proliferazione delle cellule (Huang and Weiss, 2013).

Esso agisce attraverso differenti vie; da un lato aumenta l'espressione di proteine coinvolte nella regolazione della crescita cellulare come i canali di calcio e magnesio della superfamiglia dei "*Transient Receptor Potential*" o TRP, e nello specifico TRPM6 e TRPM7, della proteina ad alta mobilità di gruppo A, tipo 1, o HMGA1 ed anche della serina idrossimetiltransferasi 2 o SHMT2, che grazie alla sua reazione genera la glicina, sorgente di gruppi metilici utilizzati nella biosintesi, stimolando così l'aumento della proliferazione cellulare (Giannini et al., 2005; Jain et al., 2012; Zhang et al., 2014).

Dall'altro lato N-MYC promuove l'avanzamento del ciclo cellulare delle cellule di neuroblastoma in vari modi (Huang and Weiss, 2013).

Nello specifico N-MYC impedisce l'arresto del ciclo cellulare in fase G₁, il primo intervallo o *gap* tra la mitosi (fase M) e la sintesi o replicazione del DNA (fase S), in risposta a molteplici stress, quali irradiazioni o danni di varia natura del DNA stesso. Ciò avviene sia tramite la riduzione dell'espressione della proteina soppressore tumorale TP53INP1 (*TP53 inducible nuclear protein-1*), che modula la risposta di p53 allo stress, sia tramite la sovra-espressione della chinasi ciclina dipendente 4 o Cdk4, che legandosi ad una delle cicline G₁ o cicline D, forma un complesso indispensabile per il passaggio alla fase S. Infatti quest'ultimo rende inattiva la proteina del retinoblastoma o Rb fosforilandola, cosicché essa non possa più bloccare il fattore di trascrizione E2F2, il quale libero avvia la trascrizione dei geni della ciclina G₁/S o E e della ciclina S o A, che, espresse, si uniscono alla chinasi ciclina dipendente 2 o Cdk2, facendo avanzare la cellula in fase S (De Gregori et al. 1997; Tweddle et al. 2001; Bell et al. 2007; Gogolin et al. 2013). Inoltre N-MYC aumenta l'espressione della proteina chinasi 2 associata alla fase S o SKP2, che formando un complesso stabile con la ciclina A legata a Cdk2, promuove la degradazione degli inibitori di questa stessa ciclina chinasi, tra cui p21 (Muth et al., 2010). Interessante è anche ricordare che un altro bersaglio di N-MYC è la proteina ID2 (*Inhibitor DNA-binding protein 2 HLH*), antagonista della proteina Rb; la presenza di ID2 rende sempre inattivo l'inibitore Rb, permettendo una progressione senza fine del ciclo cellulare (Lasorella et al, 2002).

Nell'aumento dei complessi ciclina D-Cdk4 e ciclina E-Cdk2, che tramite un circuito a feedback positivo, agiscono sulla fosforilazione di Rb e sull'attività dei fattori E2F, N-MYC non agisce da solo ma collabora con la proteina RAS (Farrell and Sears, 2014), coinvolta in molte vie di trasduzione del segnale tra le quali è sicuramente da menzionare la via mTOR/AKT/PI3K, che conduce a diverse risposte cellulari che hanno impatto anche sulla proliferazione e la tumorigenesi. Nello specifico RAS, attivando la sequenza delle proteine PI3K/AKT, blocca, tramite fosforilazione, l'attività della glicogeno sintasi chinasi 3-beta (GSK-3 β) coinvolta nella degradazione delle proteine della famiglia MYC. Ciò induce la stabilizzazione di queste ultime e quindi anche di N-MYC, favorendo la sua continua azione sul ciclo cellulare e non solo (Yaari et al., 2005; Huang and Weiss, 2013; Farrell and Sears, 2014).

Tra le proteine maggiormente espresse da N-MYC, coinvolte nella proliferazione del neuroblastoma, vi sono infine da ricordare la proteina B della famiglia dei fattori di trascrizione MYB detta MYBL2, che collabora con le proteine E2F ed è anche richiesta per la divisione cellulare (Gualdrini et al., 2010), ed il complesso delle proteine di mantenimento del minicromosoma (MCM), che sono necessarie per l'inizio della replicazione del DNA nelle ciclo cellulare (Koppen et al., 2007).

Per di più le cellule di neuroblastoma con N-MYC amplificato oltre a proliferare senza sosta, mantengono sempre un aspetto ed uno stato di cellule staminali pluripotenti, capaci di rigenerarsi di continuo (Chappell and Dalton, 2013). Ciò perché N-MYC reprime alcuni geni che codificano per proteine maggiormente espresse durante il differenziamento cellulare e contemporaneamente aumenta la trascrizione di geni coinvolti nella pluripotenza e nell'auto-rigenerazione cellulare. Tra i primi è da citare il gene per una chinasi ciclina dipendente denominata CDKL5 (*Cyclin-Dependent Kinase-like 5*), che causa un arresto della cellula in fase G₀/G₁ inducendo la differenziazione cellulare (Valli et al., 2012), ed è anche importante ricordare la riduzione di espressione della Transglutaminasi tissutale o 2 (TG2) dipendente da N-MYC, la quale ha pure un ruolo accertato nella differenziazione delle cellule di neuroblastoma (Liu et al., 2007). Tra i secondi ricordiamo i geni per le principali proteine coinvolte nel mantenere lo stato di cellula staminale pluripotente, ovvero la citochina LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), i fattori di trascrizione KLF4 e KLF2

(*Krüppel like Factor-2 e 4*) e la proteina LIN28B (*Lin-28 homolog B*) (Cotterman and Knoepfler, 2009) e la proteina BMI1, che fa parte del complesso di proteine Polycomb, essenziale per l'autorigenerazione illimitata delle cellule (Huang et al., 2011).

Le capacità di N-MYC si estendono anche alla possibilità di regolare lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni ovvero l'angiogenesi nel neuroblastoma, prerequisito indispensabile per la diffusione del tumore e quindi la sua capacità di creare metastasi. N-MYC agisce su due fronti; il primo è la riduzione di espressione di alcune citochine, quali LIF e l'interleuchina-6, e proteine, tra cui l'omodimero dell'inibina β A, detta anche activina A, facente parte della superfamiglia delle proteine del fattore di crescita trasformante beta, coinvolte nella modulazione ed inibizione della crescita endoteliale (Breit et al., 2000; Hatzi et al; 2002a; Hatzi et al, 2002b). Il secondo è la sovraespressione di fattori pro-angiogenici come l'angiogenina (Dungwa et al., 2012) ed il fondamentale fattore di crescita endoteliale vascolare o VEGF attivando la via del posfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K)/AKT/mTOR (Kang et al., 2008).

Quindi, come appena anticipato, elevati livelli di N-MYC sono correlati con neuroblastomi estremamente invasivi o metastatici (Goodman et al., 1997). N-MYC contribuisce a tutti gli aspetti della metastasi, tra cui l'adesione, la degradazione della matrice extracellulare o ECM e l'invasione di organi distanti dal sito primario del tumore (Huang and Weiss, 2013). Nello specifico N-MYC regola in negativo l'espressione delle integrine α 1 e β 1 ed in positivo quella di alcune proteine situate nelle placche di adesione focale, ed in particolare la chinasi di adesione focale o FAK, creando un sottile gioco che promuove un rimodellamento della matrice extracellulare tale da permettere la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali (Tanaka and Fukuzawa, 2008; Megison et al., 2012). Infatti le sopracitate placche sono delle strutture subcellulari altamente specializzate, che oltre al ruolo di adesione hanno quello principale di trasmettere i segnali, avviati dalle integrine e regolati dalle chinasi come FAK, che informano la cellula sulla condizione della ECM.

Inoltre N-MYC, quando presente insieme con la proteina anti-apoptotica Bcl-2, aumenta l'espressione e la secrezione di una delle metalloproteasi, la MMP2, che in qualità di endopeptidasi agisce degradando un ampio numero di componenti della

membrana basale dell'ECM, favorendo l'invasività del neuroblastoma. Sembra anche che N-MYC e Bcl-2 agiscano pure sulla repressione di un probabile antagonista di MMP-2, detto TIMP-2 (Noujaim et al., 2002). Ancora un altro bersaglio attivato da N-MYC è un microRNA o miR-9, che agisce riducendo la trascrizione dell'E-Caderina o caderina epiteliale, contribuendo al fenomeno della Transizione Epitelio-Mesenchimale del tumore o EMT (Ma et al., 2010).

Infine è interessante menzionare il ruolo paradossale della caspasi-8, una proteasi pro-apoptotica, che agisce sia inibendo sia promuovendo la metastasi del neuroblastoma, in base al contesto cellulare in cui si trova (Huang and Weiss, 2013). Infatti in molti tumori, in cui l'attività apoptotica è compromessa per mancanza della caspasi-3, la caspasi-8 favorisce la migrazione ovvero l'invasione delle cellule tumorali interagendo con un complesso multi proteico che include la chinasi FAK e l'enzima proteolitico calpaina-2 (CPL-2), aumentando la disgregazione di molte componenti delle placche di adesione focale (Barbero et al., 2009).

Il ruolo del sistema immunitario nel controllo del tumore è complesso; è stato dimostrato che i linfociti T Natural Killer (NKT) sono possibilmente coinvolti nell'immunità antitumorale, agendo non direttamente ma tramite la secrezione di citochine pro-infiammatorie che reclutano altre cellule del sistema immunitario, stimolano la maturazione delle cellule dendritiche e permettono la formazione di antigeni specifici, necessari affinché le cellule tumorali diventino il bersaglio diretto dei linfociti T (Huang and Weiss, 2013; Song et al., 2007). In questo contesto N-MYC reprime l'espressione di alcuni antigeni presenti sulle cellule di neuroblastoma e, nello specifico, una chemiochina chiave nella regolazione della migrazione ed infiltrazione dei monociti/macrofagi, detta proteina-1 che chemioattrae i monociti/chemiochina ligando 2 (MCP-1/CCL2), richiesta per indurre una risposta chemiotattica delle cellule NKT; così facendo salvaguarda il tumore dalla sorveglianza immunitaria (Song et al., 2007).

Quanto detto finora mette in luce il ruolo di N-MYC nell'aumento della proliferazione, invasività ed aggressività del neuroblastoma, ma paradossalmente tale fattore di trascrizione induce l'aumento di espressione della proteina p53 (Chen et al., 2010), coinvolta nella risposta cellulare ad un danneggiamento del DNA, che se grave e non

riparato, esita in un “suicidio” della cellula stessa tramite l’attivazione di meccanismi di morte cellulare programmata o apoptosi (Alberts et al., 2004). Inoltre, a differenza della maggior parte dei tumori umani, le mutazioni di p53 nel neuroblastoma sono rare e, se presenti, principalmente limitate a tumori recidivanti (Diskin et al., 2014). Ma è importante sottolineare che la p53 presente nelle cellule tumorali di neuroblastoma è spesso poco funzionale e sequestrata a livello citoplasmatico, così che sia impedita la sua funzione di fattore di trascrizione (Moll et al., 1995). Per di più N-MYC ha pure come suo bersaglio trascrizionale la proteina MDM2, un enzima E3 ovvero ubiquitina ligasi, responsabile dell’ubiquitinazione e distruzione di p53 nei proteasomi (Slack et al., 2005). L’aumento di MDM2 regola negativamente la funzione di p53 nel neuroblastoma ed anche promuove la stabilità dello stesso mRNA di N-MYC legandosi a sequenze ricche di Adenina ed Uracile nelle sue regioni UTR in direzione 3' (Gu et al., 2012). La figura 2 riassume in modo schematico tutti i possibili ruoli descritti di N-MYC nel neuroblastoma.

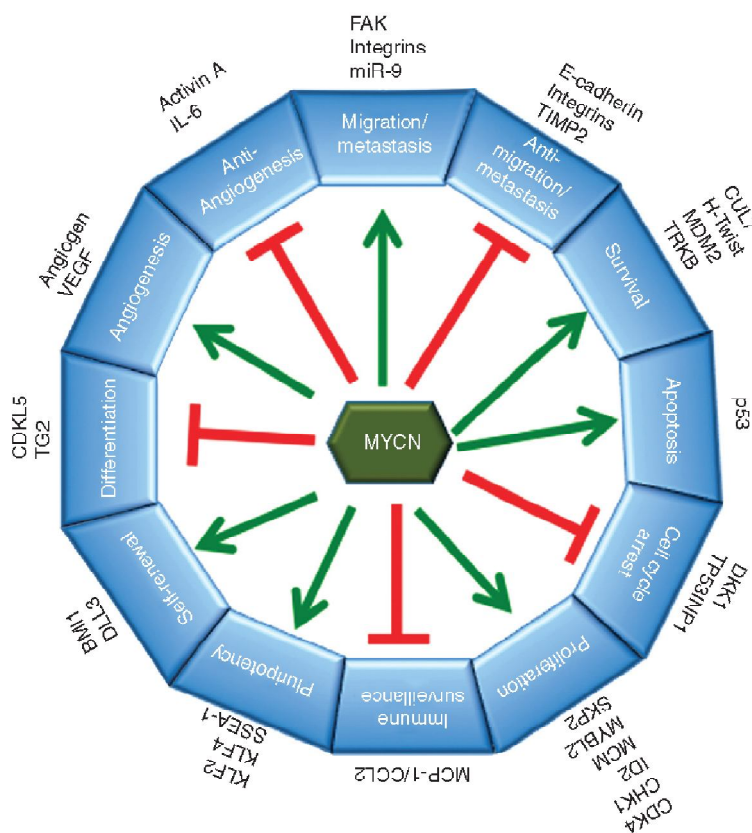


Figura 2. Ruolo di N-MYC nel neuroblastoma.
(fonte: Huang and Weiss, 2013)

1.2.2 Altre anomalie genetiche del neuroblastoma

Molte altre sono le aberrazioni genetiche presenti nel neuroblastoma, e di seguito si menzionano le più significative.

In primis è da considerare la ploidia delle cellule tumorali dei neuroblastomi primari, valutata dal parametro noto col nome di DNA index. Esso rappresenta uno dei caratteri clinici più indicativi del sistema di stadiazione e classificazione del rischio INRG, per la sua qualità di marcatore prognostico predittivo in bambini di età inferiore ai 18 mesi (Cohn et al., 2009). Solitamente i tumori nei quali le cellule presentano un aumento totale del numero dei cromosomi o iperdiploidia hanno un carattere favorevole, rappresentato da un elevato tasso di sopravvivenza; contrariamente i neuroblastomi diploidi o tetraploidi sono più aggressivi ed associati ad una prognosi spesso infausta (Look et al., 1991; George et al., 2005).

Studi citogenetici hanno evidenziato che un altro cambiamento genomico ricorrente nelle cellule di neuroblastoma è la traslocazione dei bracci p (lungo) e q (corto) rispettivamente dei cromosomi 1 e 17 (1p e 17q) (Savelyeva et al., 1994). Tale fenomeno, che accade in almeno il 50% dei tumori primari, esita in un guadagno della porzione distale del cromosoma 17, una regione di circa 20 Mb, che potrebbe tradurre più di 200 geni, ed è frequentemente indice di un tumore sfavorevole (Schwab et al., 2003; Brinkschmidt et al., 2001). Inoltre nel 23-35% di tumori primari si osserva la perdita di eterozigosi del cromosoma 1p36, un altro possibile biomarker di tumore avverso, e diverse delezioni in differenti loci nei cromosomi 2p, 3p, 4p, 9p, 14q, 16p e 19q (Maris et al., 2000; Schwab et al., 2003). In quasi un terzo dei neuroblastomi si ritrova la perdita del cromosoma 11q, indice di cattiva prognosi di un sottotipo di tumori che non presentano l'amplificazione di N-MYC (Attiyeh et al., 2005).

La biologia del neuroblastoma è anche fortemente influenzata dalla secrezione da parte delle stesse cellule tumorali dei fattori neurotrofici o neurotrofine (il fattore di crescita nervoso o NGF, il fattore neurotrofico cerebrale o BDNF, la neurotrofina 4/5 e la neurotrofina 3) e dei rispettivi recettori con attività tirosin chinasi ovvero TRKA, TRKB e TRKC (Nakagawara, 2001).

Sulla base delle anomalie genetiche descritte e della differente espressione dei sopracitati recettori, si possono distinguere tre principali sottotipi di neuroblastoma,

detti 1, 2A e 2B, ognuno caratterizzato da un distinto profilo citogenetico (Brodeur and Bagatell, 2014).

Il neuroblastoma di sottotipo 1 presenta solitamente un'alterazione del numero dei cromosomi risultante in iperdiploidia o quasi triploidia, scarse o assenti alterazioni genetiche date da amplificazioni o delezioni, ed alti livelli di espressione del recettore TRKA. Una limitata quantità della sua neurotrofina ovvero NGF, secreta nel microambiente che circonda le cellule tumorali, può indurre esse stesse a differenziarsi o giustificare i fenomeni di regressione spontanea del neuroblastoma. Pertanto la presenza del recettore TRKA è indice di un tumore con caratteristiche ed esito positivo (Brodeur and Bagatell, 2014; Brodeur, 2003).

Anche il recettore TRKC si trova in modo variabile nei neuroblastomi con prognosi favorevole, ma il suo principale ligando ovvero la neurotrofina 3, non è quasi mai rilevata nel tumore primario (Yamashiro et al., 1997).

Contrariamente il neuroblastoma di sottotipo 2 è quasi diploide o tetraploide, mostra comunemente un guadagno del cromosoma 17 ed un'eccessiva espressione rispettivamente del recettore TRKB e dei suoi ligandi, rappresentati da BDNF e dalla neurotrofina 4/5, che provvedono alla crescita ed alla sopravvivenza delle cellule tumorali.

Più specificamente il sottotipo 2A presenta diverse delezioni a livello cromosomico delle regioni 3p, 4p ed 11q ed anche il guadagno di materiale genetico del cromosoma 7; il sottotipo 2B è caratterizzato dalla delezione del cromosoma 1p e usualmente dall'amplificazione del gene *N-MYC*.

Entrambi i sottotipi 2 sono associati con un tumore dalla prognosi avversa ed in particolare il sottotipo 2B rappresenta un neuroblastoma più aggressivo (Brodeur and Bagatell, 2014; Brodeur, 2003).

La successiva figura 3 raffigura in modo schematico la suddivisione in sottotipi del neuroblastoma.

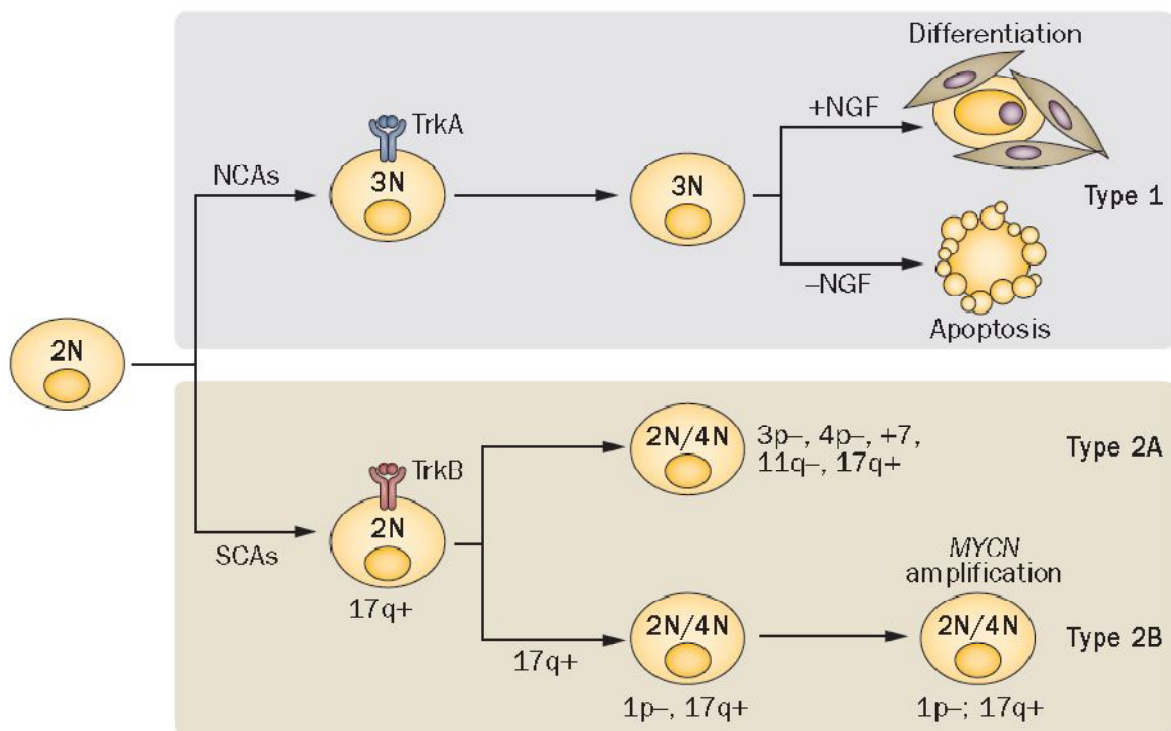


Figura 3. I tre principali sottotipi di neuroblastoma.
 (fonte: Brodeur and Bagatell, 2014)

In conclusione di quanto detto finora è importante sottolineare che i parametri genetici, quali il numero di copie del gene *N-MYC*, la delezione del cromosoma 11q, lo stato di ploidia del DNA delle cellule tumorali, unitamente a fattori significativi rivelati alla diagnosi quali l'età del paziente, le caratteristiche istologiche, il grado di differenziazione del tumore e lo stadio definito dall'INRG, hanno permesso sempre all'International Neuroblastoma Risk Group di definire quattro ampie categorie cliniche del neuroblastoma. Queste più dettagliatamente sono così identificate: neuroblastoma a rischio molto basso; neuroblastoma a basso rischio; neuroblastoma a rischio intermedio; neuroblastoma ad alto rischio.

Tali differenze sono correlate con tassi di sopravvivenza fino a 5 anni, senza eventi infausti, che sono rispettivamente > 85% per il rischio molto basso, in un range tra ≥ 75% a ≤ 85% per il basso rischio, tra ≥ 50% a ≤ 75% per il rischio intermedio e ≤ 50% per l'alto rischio (Cohn et al., 2009).

A loro volta nelle categorie a basso e molto basso rischio rientrano i neuroblastomi cosiddetti "benigni" ovvero propensi ad una regressione spontanea o alla

differenziazione, mentre nella categoria ad alto rischio sono compresi tutti i tipi di neuroblastoma con caratteristiche più aggressive per la vita. Purtroppo rimangono ancora scarsamente definiti i neuroblastomi a rischio intermedio (Maris, 2010).

Nella figura 4 sono descritte, in modo generico, le categorie di rischio del neuroblastoma e le sue caratteristiche.

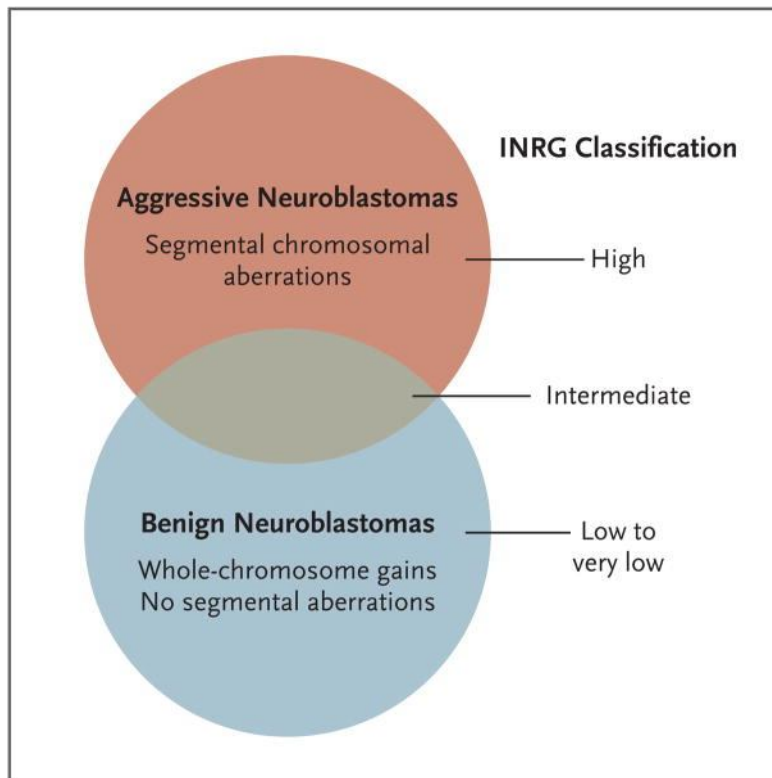


Figura 4. Le quattro categorie di rischio clinico del neuroblastoma.
(fonte:Maris, 2010)

1.3 Uno sguardo al Ciclo Cellulare nel Neuroblastoma ad alto rischio

I tumori umani sono genericamente considerati fenomeni in cui le cellule mostrano anomalità o deregolazione del ciclo cellulare, ovvero quella sequenza altamente ordinata di eventi in cui una cellula duplica i suoi contenuti, ed in primis il suo materiale genetico, e si divide generando due cellule figlie (Alberts et al., 2004; Park and Lee, 2003).

Prima di analizzare qualche caratteristica che contraddistingue il ciclo delle cellule nel neuroblastoma ad alto rischio, è opportuno comprendere sommariamente i meccanismi principali del ciclo cellulare di una cellula somatica umana.

Le due fasi principali ed essenziali di ciascun ciclo cellulare sono rappresentate dalla sintesi o duplicazione fedele del patrimonio genetico, il DNA, detta pertanto *fase S*, e dalla corretta ed identica ripartizione dello stesso nelle due cellule figlie durante la mitosi (*fase M*). Queste ultime quindi si separano fisicamente in seguito alla divisione citoplasmatica o *citochinesi*. La maggior parte della sintesi proteica e degli organelli, con conseguente aumento della massa cellulare, avvengono in due fasi extra di intervallo o *fasi gap (G)*, di durata variabile, che nello specifico sono la *fase G₁* tra la mitosi e la fase S e la *fase G₂* tra la fase S e quella M. L'insieme delle fasi G₁, S e G₂ costituiscono l'*interfase*.

Le due fasi gap però sono più che semplici ritardi per permettere la crescita cellulare. Infatti esse forniscono anche il tempo necessario alla cellula di controllare l'ambiente esterno ed interno per assicurarsi che sia adatto e totalmente pronto per progredire negli importanti eventi della sintesi del DNA e della mitosi. In quei particolari casi in cui le condizioni extracellulari sono sfavorevoli, le cellule rallentano il progresso attraverso la fase G₁ e talvolta entrano in uno stato di riposo specializzato, chiamato *G zero* o *G₀*, in cui possono rimanere per giorni, settimane o addirittura anni prima di riprendere la proliferazione (Alberts et al., 2004). E' importante ricordare però che alcune cellule dell'organismo umano, quali i neuroni e le cellule muscolari, raggiunto uno stadio finale del loro sviluppo non si dividono più, stazionando per il resto della loro vita in fase G₀.

La figura 5 è una rappresentazione semplificata del ciclo cellulare appena descritto.

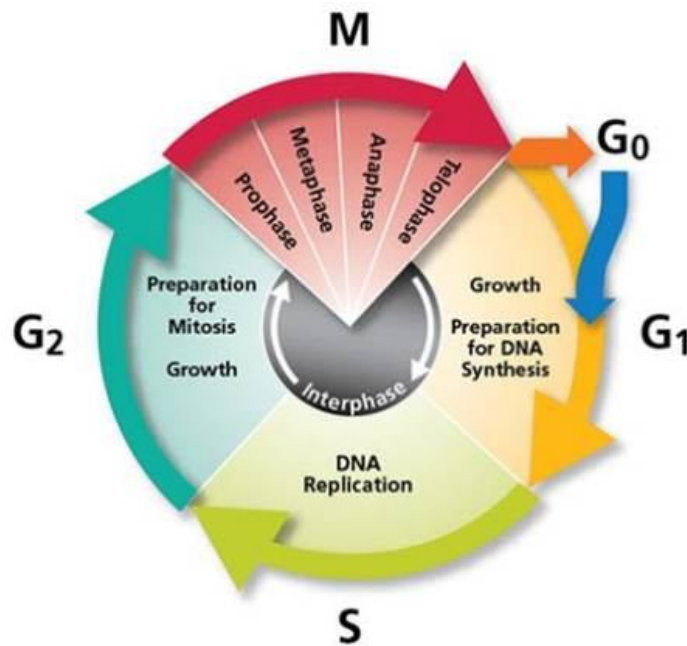


Figura 5. Le fasi del ciclo cellulare.

Il cuore del sistema di controllo del ciclo cellulare è rappresentato da una famiglia di proteine note come *chinasi dipendenti da ciclina* o Cdk, i cui cambiamenti ciclici di attività, osservati durante la progressione attraverso il ciclo cellulare, dipendono da una serie complessa di enzimi e proteine, tra cui le più importanti sono proprio le *ciclinae*. I complessi ciclina-Cdk corrispondente scatenano i diversi eventi del ciclo cellulare. Nel dettaglio esistono quattro classi di ciclinae: le ciclinae D (D1, D2 e D3) dette anche ciclinae G₁, che si complessano con le chinasi Cdk4 e Cdk6; la ciclina E o ciclina G₁/S che si lega alla chinasi Cdk2 alla fine della fase G₁ e impegna la cellula alla replicazione del DNA; la ciclina A o ciclina S, che si complessa sempre con la chinasi Cdk2, indispensabile per la fase S ed infine la ciclina B o ciclina M, che insieme alla chinasi Cdk1 promuove la mitosi (Alberts et al., 2004).

L'attivazione completa di questi complessi è resa possibile dalla fosforilazione di un amminoacido vicino all'ingresso del sito attivo della Cdk ad opera della *chinasi che attiva Cdk* o CAK, una serina/treonina chinasi coinvolta anche nella trascrizione e riparazione del DNA (Nigg, 1996). La quantità delle ciclinae varia a seconda delle fasi del ciclo cellulare ed i complessi ciclina-Cdk sono principalmente regolati dall'attacco

di *proteine inibitrici delle Cdk* o CKIs (Alberts et al., 2004). Esistono due tipi di CKIs: i quattro membri della famiglia INK ovvero INK4A (p16), INK4B (p15), INK4C (p18) ed INK4D (p19), che esercitano la loro attività inibitrice legandosi alle chinasi Cdk4 e Cdk6, prevenendone l'associazione con le cicline D; i tre membri della famiglia CIP/KIP, cioè CIP1 (p21), KIP1 (p27) e KIP2 (p57), che formano dei complessi inattivi con le cicline E o A (cicline G₁/S o S) legate rispettivamente a Cdk2 (Park and Lee, 2003).

Quando una cellula si trova in un ambiente esterno dal quale riceve segnali favorevoli alla crescita ed alla divisione le chinasi Cdk4 e Cdk6, libere dai loro regolatori negativi, possono legarsi alle cicline D e permettere il passaggio attraverso il primo punto di controllo critico del ciclo cellulare, il cosiddetto *punto di restrizione*, superato il quale la cellula è irreversibilmente impegnata nella replicazione del suo DNA, anche se dovessero essere rimossi i segnali di crescita. Ciò accade perché il complesso ciclina D o G₁-Cdk4/6 fosforila inattivandolo l'inibitore rappresentato dalla proteina del retinoblastoma (Rb), la quale in tal modo libera un fondamentale fattore di trascrizione, noto come E2F, che permette la trascrizione di geni codificanti proteine richieste per la successiva fase S, tra cui le stesse cicline E (G₁/S) ed A (S). Queste ultime, inoltre, insieme alla loro chinasi Cdk2, scatenano un feedback positivo aumentando la fosforilazione di Rb e l'ulteriore rilascio di E2F (Alberts et al., 2004; Park and Lee, 2003). Ma se il DNA dei cromosomi risulta danneggiato, come può accadere dopo esposizioni a radiazioni o certi agenti chimici, il *primo punto di controllo del danno al DNA*, alla fine della fase G₁, blocca la progressione in fase S impedendo l'opera dei complessi ciclina E o A-Cdk2, grazie all'azione della proteina regolatrice p53. Quest'ultima normalmente è altamente instabile ed interagisce con l'ubiquitina ligasi MDM2, che la indirizza per la degradazione nei proteasomi. Il danno al DNA attiva una proteina chinasi che fosforila p53, così da impedire il suo legame con MDM2 e permettere la sua attività di fattore di trascrizione di geni, tra cui l'inibitore p21, che blocca i complessi ciclina E o A-Cdk2. La fase S, a questo punto, può riprendere solo dopo un'accurata riparazione del DNA. Contrariamente, nel caso di un danneggiamento molto grave del DNA, tale da non poter essere riparato e risultare così una minaccia per la vita dell'organismo, la cellula predispone il suo

“suicidio” tramite la trascrizione da parte di p53 di geni coinvolti nella morte cellulare programmata o apoptosi (Alberts et al., 2004).

In fase G₂ la cellula si prepara alla mitosi cominciando ad accumulare la ciclina B o M, aumentando la trascrizione del suo gene. Quest'ultima si lega alla sua chinasi corrispondente ovvero Cdk1 ed il complesso è fosforilato al sito attivatore dall'enzima CAK. A livello del *punto di controllo della replicazione del DNA* è impedito un precoce ingresso della cellula in fase M, che potrebbe risultare nel passaggio di serie incomplete di cromosomi alle cellule figlie. Ciò è reso possibile mantenendo il complesso ciclina B-Cdk1 in uno stato inattivo tramite l'azione di una chinasi inibitrice, detta Wee1, che fosforila due residui di treonina e tirosina, adiacenti al sito attivo. Nel momento in cui la cellula raggiunge la fine della fase G₂ ed è pronta per cominciare la mitosi, la fosfatasi Cdc25, a sua volta attivata dalla fosforilazione da parte di una chinasi detta Polo, rimuove i fosfati inibitori che trattengono B-Cdk1. Quest'ultimo avvia un feedback positivo innescando ulteriormente Cdc25, tramite fosforilazione in siti diversi della chinasi Polo, ed inibendo la chinasi Wee1 (Alberts et al., 2004; Park and Lee, 2003). Ma può accadere che il DNA dei cromosomi subisca dei danni poco prima dell'ingresso in mitosi, pertanto il *secondo punto di controllo del danno al DNA* attiva una serie di proteine chinasi che fosforilano ed inattivano Cdc25, bloccando così il complesso ciclina B o M-Cdk1. Compiuta la riparazione del DNA danneggiato, il segnale inibitore si spegne e riprende la progressione del ciclo cellulare (Alberts et al., 2004).

Durante la mitosi l'evento più critico è la separazione dei cromatidi fratelli nell'anafase. Per tale motivo quest'ultima è strettamente seguita dal *punto di controllo dell'attacco del fuso*, che opera appunto per assicurarsi che tutti i cromosomi siano attaccati in modo appropriato al fuso mitotico prima che avvenga la segregazione dei cromatidi fratelli. Questo punto di controllo dipende da un complesso meccanismo che monitora lo stato del cinetocore, ovvero la regione specializzata del cromosoma che si attacca ai microtubuli del fuso. Molte sono le proteine coinvolte, reclutate dai cinetocori, che hanno la funzione di inviare segnali negativi, qualora essi non siano correttamente attaccati al fuso, ed agendo principalmente bloccando l'azione del complesso che promuove l'anafase (APC) con la sua proteina attivatrice Cdc20 sulle

proteine mitotiche che innescano la separazione dei cromatidi fratelli. Lo stesso complesso APC-Cdc20 è poi responsabile dell'inattivazione della ciclina B-Cdk1, evento che conduce ad una serie di altri fenomeni che portano la cellula fuori dalla mitosi (Alberts et al., 2004).

Come detto in precedenza, la perdita di regolazione del ciclo cellulare è un segno caratteristico dei processi neoplastici; infatti difetti nei punti di controllo del danno al DNA e dell'attacco corretto dei cromosomi al fuso mitotico sono causa di accumulo di mutazioni nel patrimonio genetico cellulare, di aberrazioni nel numero di copie dei cromosomi e della loro instabilità. Tutti questi sono fenomeni che facilitano ancora di più lo sviluppo tumorale (Capasso et al., 2015).

Le cellule del neuroblastoma ad alto rischio mostrano sia un'anomala espressione dei geni che esprimono le proteine coinvolte nel ciclo cellulare sia un'aumentata attività dell'enzima telomerasi, tale da renderle praticamente immortali (Capasso et al., 2015).

In particolare si osserva un'espressione molto aumentata della ciclina D1, che regola la fase G₁, rispetto anche ad altri tipi di tumore, come quello al seno e al colon-retto, dove la sua maggiore espressione è una frequente caratteristica (Weinstein and Zhou, 1997; Molenaar et al., 2008). Sembra che la ciclina D1 sia principalmente coinvolta nel mantenere lo stato indifferenziato delle cellule tumorali di neuroblastoma, dato che prove sperimentali mirate alla riduzione di tale ciclina o della sua chinasi Cdk4 risultano nel ripristino del punto di controllo in fase G₁ ed anche nella differenziazione delle cellule verso un fenotipo neuronale (Molenaar et al., 2008).

Inoltre nei neuroblastomi a prognosi infausta si osserva frequentemente una mancanza di espressione di una delle proteina inibitrice delle Cdk che si complessano con le ciclina D, ovvero la proteina p16, che è mappata nella regione 21 del braccio corto (p) del cromosoma 9. Le cellule di neuroblastoma presentano spesso una perdita di eterozigosi per la regione 9p21, ma evidenze sperimentali mettono in luce che la mancata o ridotta espressione del gene codificante per p16, nominato *CDKN2A*, non dipende dalla sua delezione o da altri eventi di mutazione. Piuttosto è stato osservato che la sua espressione è, con maggiore probabilità, controllata a livello trascrizionale da fenomeni di ipermetilazione al livello di isole 5' CpG del suo DNA (Takita et al., 1997). Sembra inoltre che anche l'espressione del gene *CDKN2B*, codificante la

proteina inibitrice p15 e situato in una posizione adiacente al gene *CDKN2A*, svolga un ruolo nella deregolazione del ciclo cellulare nel neuroblastoma ad alto rischio (Iolascon et al., 1998).

Ancora tra le proteine che sono molto espresse nei neuroblastomi aggressivi, che spesso presentano l'amplificazione di N-MYC, si annoverano la chinasi Cdk2, fondamentale durante la fase S del ciclo cellulare, e la serina/treonina chinasi Chk1 o checkpoint chinasi 1, codificata dal gene *CHEK1* e coinvolta nei punti di controllo del danno al DNA (Capasso et al., 2015). Interessante è pure la scoperta, sempre in neuroblastomi con esito avverso, di elevati livelli di espressione della Polo chinasi, la cui azione è significativa per gli eventi che scatenano la mitosi. (Ackermann et al., 2011).

Infine è importante ricordare anche l'aumentata espressione di alcuni geni, le cui proteine giocano un ruolo attivo nella formazione del fuso mitotico e nel punto di controllo dell'attacco dei cromatidi a questo stesso. Tra queste si citano le Aurora chinasi A e B, che giocano un ruolo critico nella divisione cellulare, controllando la segregazione cromatidica.

L'Aurora chinasi A, codificata dal gene *AURKA*, è una serina/treonina chinasi mitotica necessaria per il corretto funzionamento del centrosoma, ovvero la regione che circonda i centrioli adibita principalmente alla formazione, demolizione e organizzazione dei microtubuli durante l'assemblaggio del fuso mitotico. Studi dimostrano un significativo aumento di espressione dell'Aurora chinasi A in cellule di neuroblastoma ad alto rischio, con N-MYC amplificato e prognosi spesso infausta (Capasso et al., 2015). E' stato messo in evidenza che la stessa Aurora chinasi A è indispensabile per la crescita delle cellule di neuroblastoma con N-MYC amplificato, in quanto gioca un ruolo critico nel regolare il turnover di N-MYC stesso; infatti l'Aurora chinasi A si lega ad N-MYC stabilizzandolo ed inibendo la sua degradazione durante la mitosi, contribuendo così alla progressione del tumore (Otto et al., 2009).

Interessante è anche la rilevazione di alti livelli di espressione dell'Aurora chinasi B, codificata dal gene *AURKB*, in neuroblastomi ad alto rischio con esito sfavorevole (Bogen et al., 2015). L'Aurora chinasi B è indispensabile per l'attacco dei microtubuli del fuso mitotico al centromero dei singoli cromosomi e, contrariamente all'Aurora

chinasi A, non regola N-MYC ma è essa stessa un bersaglio trascrizionale di quest'ultimo (Stafman and Beierle, 2016).

Inoltre si riscontra in neuroblastomi ad alto rischio con N-MYC amplificato la sovrapproduzione di proteine coinvolte nel corretto funzionamento del punto di controllo dell'attacco al fuso mitotico e tra queste vi sono MAD2 e CENPE.

L'aberrante espressione di MAD2, una proteina codificata dal gene *MAD2L1* e reclutata a livello del cinetocore di ogni cromosoma, quando non è attaccato in modo appropriato ai microtubuli del fuso, è regolata dal fattore di trascrizione E2F nelle cellule di neuroblastoma con difetti nella via controllata dalla proteina del Retinoblastoma (Rb) (Hernando et al., 2004). Per concludere è degno di nota che l'aumentata espressione di CENPE o proteina E associata al centromero, una chinesina mitotica del cinetocore che media il corretto allineamento dei cromosomi in metafase, è strettamente correlata con la progressione del neuroblastoma (Balamuth et al., 2010). La figura 6 è uno schema dei geni coinvolti nel ciclo cellulare del neuroblastoma ad alto rischio appena descritti.

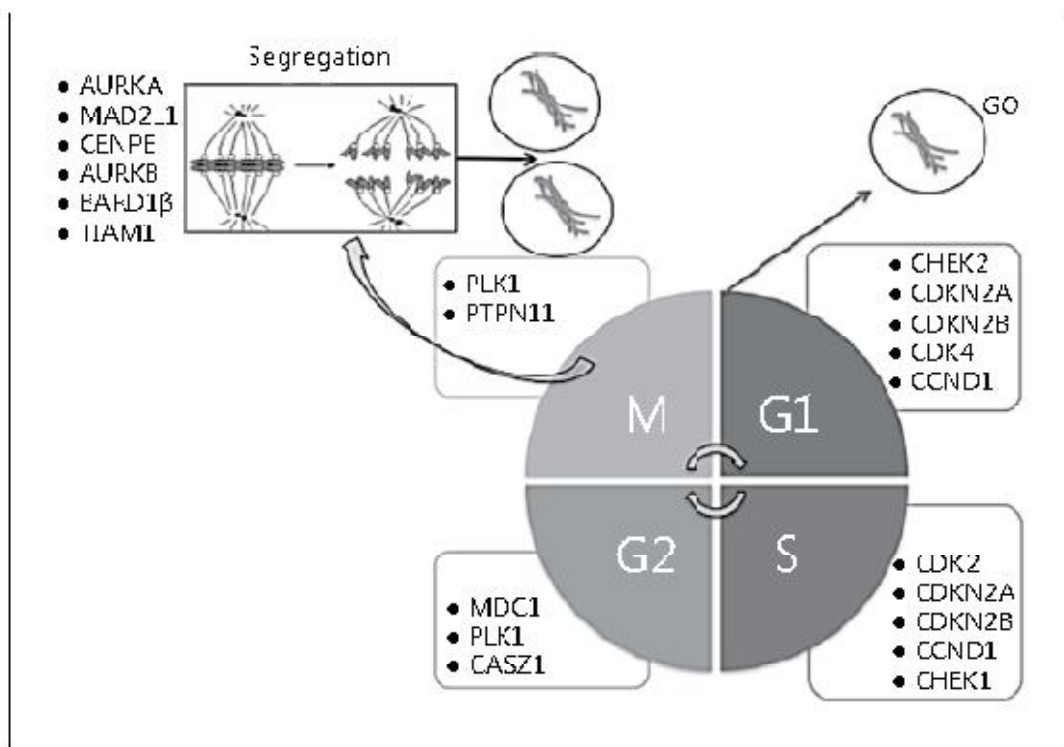


Figura 6. Schema dei geni coinvolti nelle diverse fasi del ciclo cellulare del neuroblastoma ad alto rischio.
(fonte: Capasso, 2015)

2. L'IPOSSIA

2.1 Caratteristiche generali

Il corpo umano è un organismo aerobico per il quale l'ossigeno è un elemento essenziale per il metabolismo e la bioenergetica cellulare (Majmundar et al., 2010).

Durante la respirazione cellulare tutta l'energia rilasciata dalla ossidazione dei nutrienti, quali carboidrati e lipidi, è conservata sotto forma di elettroni trasportati dalle molecole NAD^+ e FAD che si convertono in NADH e FADH_2 .

L'ultimo passaggio della respirazione si svolge lungo la catena respiratoria, immersa nella membrana mitocondriale interna, dove questi elettroni si combinano con l'ossigeno, il loro accettore finale, e contemporaneamente l'energia prodotta è convertita in molecole di ATP in un processo noto come fosforilazione ossidativa. Pertanto l' ATP è il trasportatore universale di energia chimica tra le varie reazioni metaboliche ed è indispensabile per il mantenimento della vitalità cellulare (Alberts et al., 2004; Gilany and Vafakhah, 2010).

Le cellule hanno sviluppato nel corso dell'evoluzione meccanismi tali da garantire l'omeostasi dell'ossigeno nei diversi tessuti dell'organismo, per far fronte alle diverse richieste energetiche. In particolare bisogna considerare che la normale concentrazione fisiologica di ossigeno nei vari tessuti è differente e si discosta notevolmente dalla tensione dello stesso nell'aria. Per esempio i muscoli scheletrici hanno una pressione parziale dell'ossigeno molto bassa (pO_2 del 5%) a differenza delle cellule del sistema nervoso ed in particolare il cervello, che richiedono elevate concentrazioni di questo elemento (Zimna and Kurpysz, 2015).

La riduzione della disponibilità di ossigeno nei tessuti rispetto ai suoi livelli fisiologici prende il nome di ipossia (Semenza, 2014). Tale fenomeno si incontra in diverse condizioni patologiche quali aterosclerosi, ischemia, ictus, malattie cardiache e polmonari e nei tumori; tuttavia gioca anche un ruolo importante in alcuni processi fisiologici e principalmente nel dirigere il corretto sviluppo embrionale (Genbacev et al., 1997; Semenza, 2000).

Non sono ancora chiari i sensori attraverso i quali le cellule percepiscono l'ipossia e quelli ipotizzati includono una proteina eme, i canali ionici sensibili all'ossigeno e soprattutto gli stessi mitocondri (Gilany and Vafakhah, 2010).

Però è certo che le cellule hanno sviluppato dei meccanismi adattativi alla nuova condizione ipossica attivando e stabilizzando come prima cosa il principale regolatore dell'omeostasi dell'ossigeno, un fattore di trascrizione noto come fattore 1 indotto dall'ipossia o *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) (Bárdos and Ashcroft, 2005).

HIF-1 è stato inizialmente scoperto come fattore di trascrizione dell'eritropoietina (EPO), l'ormone che controlla la produzione dei globuli rossi, in risposta a scarsi livelli di ossigeno nel sangue (Semenza and Wang, 1992).

Questo fattore di trascrizione è costituito da due differenti subunità, dette α e β .

Mentre la subunità HIF-1 β , anche conosciuta come ARNT, è espressa nelle cellule in modo costitutivo, l'espressione e l'attività della subunità HIF-1 α dipendono dalla concentrazione dell'ossigeno cellulare (Semenza, 2002; Zimna and Kurpisz, 2015).

Finora sono state identificate altre due isoforme della subunità α , nominate rispettivamente HIF-2 α , nota anche come proteina endoteliale PAS o EPAS, ed HIF-3 α o inibitore PAS (IPAS), un regolatore negativo di HIF-1 che, legando la subunità HIF-1 α , blocca la sua attività trascrizionale (Zimna and Kurpisz, 2015). HIF-2 α è principalmente espressa nelle cellule endoteliali, da cui deriva anche il suo nome EPAS, nei reni, nei polmoni, nell'intestino tenue e nelle cartilagini, e presenta un 48% della sua sequenza aminoacidica identica ad HIF-1 α , che è invece una subunità ubiquitaria (Zimna and Kurpisz, 2015). Tutte e tre le isoforme mostrano nella loro struttura primaria uno o due segnali di localizzazione nucleare (NLS) ed un dominio bHLH/PAS necessario per la dimerizzazione con HIF-1 β e per riconoscere le sequenze consenso G/ACGTG degli elementi di risposta all'ipossia o HREs presenti nei promotori o nelle regioni enhancer di tutti i geni bersaglio che mediano l'adattamento all'ambiente ipossico (Kewley et al., 2004; Wenger et al., 2005). Altre sequenze fondamentali delle subunità α sono il dominio di degradazione ossigeno-dipendente (ODDD) e due domini di transattivazione N- e C- terminali (N-TAD e C-TAD), indispensabili appunto per l'attivazione trascrizionale e l'interazione con le proteine coattivatrici CBP e p300; solo HIF-3 α manca del dominio C-TAD (Srinivas et al.,

1999; Ruas et al., 2002). Nella figura 7 sono rappresentate le strutture delle tre subunità α del fattore indotto dall'ipossia.

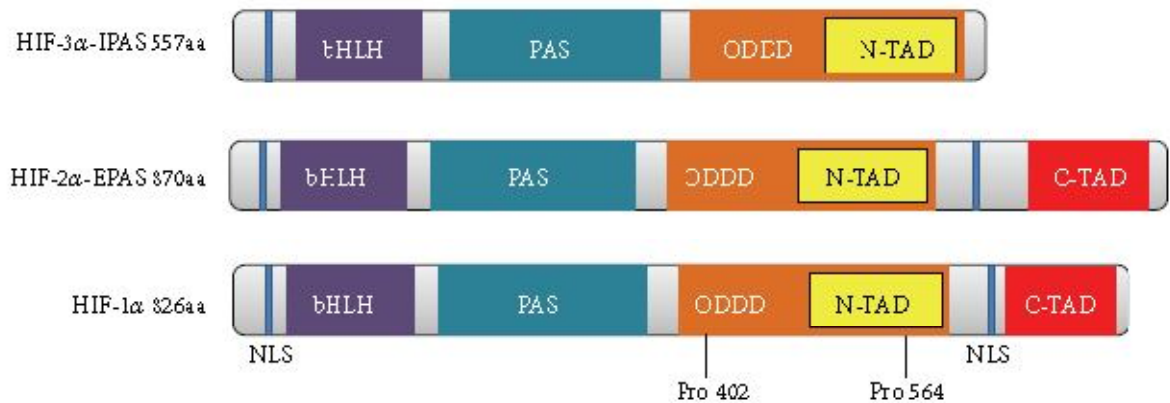


Figura 7. Rappresentazione schematica delle strutture delle subunità HIF- α .
(fonte: Zimna and Kurpisz, 2015)

In condizioni di normossia, cioè quando le scorte di ossigeno nell'ambiente cellulare sono adeguate, la subunità HIF-1 α presente nel citoplasma è idrossilata a livello dei residui di prolina 402 e 564, presenti nel suo dominio di degradazione ossigeno dipendente, ed a livello del residuo di asparagina 803, situato nel dominio C-TAD. Queste reazioni sono svolte da enzimi che utilizzano l'ossigeno e l' α -chetoglutarato come substrato e contengono Fe^{2+} nel loro centro catalitico, le quali nello specifico sono le prolin idrossilasi dominio o PDHs ed il fattore di inibizione di HIF-1 o FIH-1 un asparaginil idrossilasi (Lando et al., 2002; Kaelin Jr, 2005). L'idrossilazione delle proline permette l'interazione di HIF-1 α con il complesso ubiquitina E3 ligasi von Hippel–Lindau (pVHL) che agisce poliubiquitinandola, così da segnalarla per la degradazione da parte del proteasoma. Contestualmente il residuo di asparagina idrossilato da FIH-1 non permette il legame con le proteine coattivatrici CBP e p300 e reprime l'attività trascrizionale di HIF-1, un fenomeno rafforzato anche dalla presenza del complesso pVHL (Gilany and Vafakhah, 2010; Mahon et al., 2001).

Durante l'ipossia sia gli enzimi PDHs sia l'inibitore FIH-1 sono inattivi e di conseguenza la subunità HIF-1 α , non più instabile, può formare un eterodimero con la subunità HIF-1 β , prendere contatti con le proteine CBP e p300 ed infine traslocare nel nucleo dove avvia la trascrizione di tutti i geni che presentano le sequenze HREs

(Gilany and Vafakhah, 2010). E' chiaro che anche le isoforme di HIF-1 α sono soggette alla medesima regolazione, illustrata nella seguente figura 8.

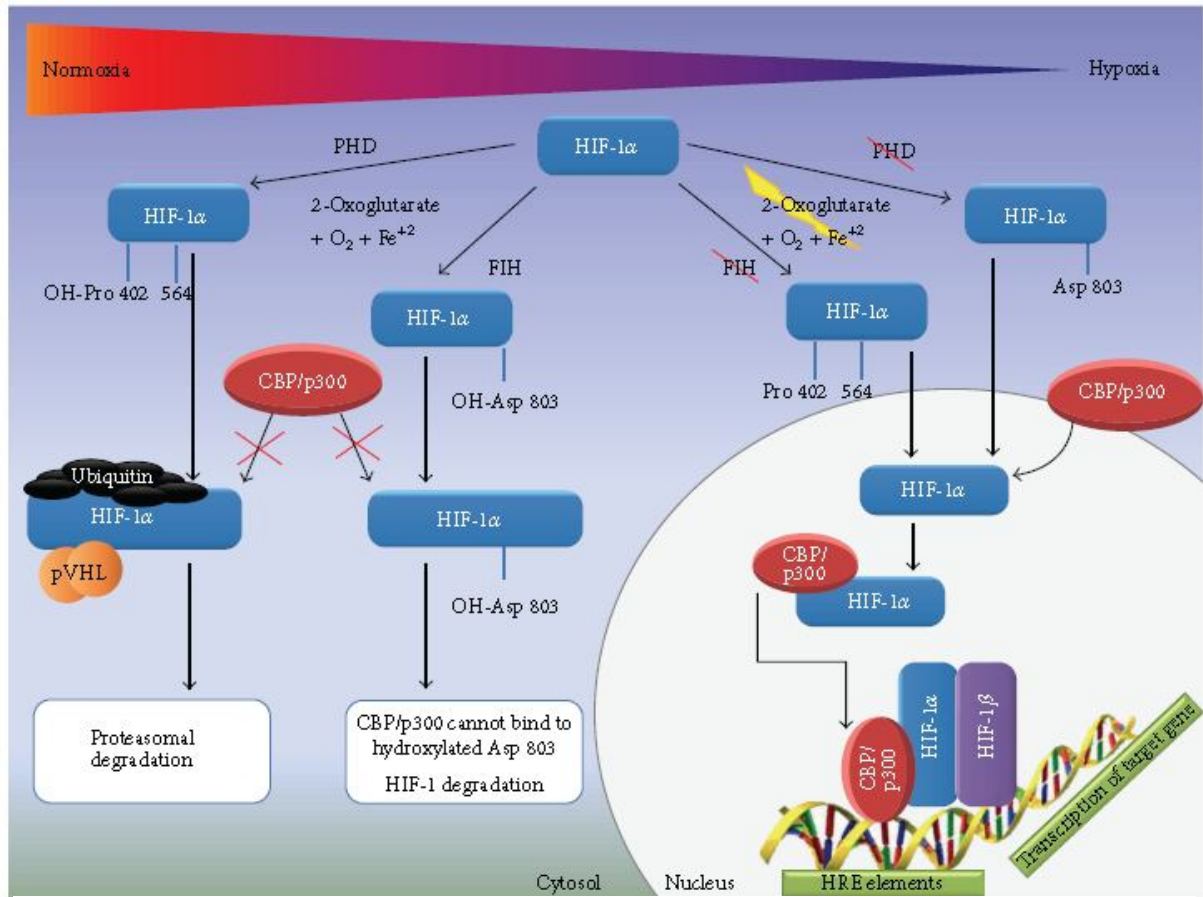


Figura 8. Regolazione di HIF-1 α in condizioni di normossia ed ipossia.
(fonte: Zimna and Kurpisz, 2015)

Moltissimi sono i geni trascritti dal fattore HIF-1, che codificano proteine coinvolte in molteplici vie metaboliche che normalmente giocano un ruolo chiave nei processi fisiologici ed in condizioni di ipossia permettono alla cellula di affrontare al meglio le nuove esigenze energetiche (Semenza, 2002).

Nelle cellule si osserva uno “switch” dal metabolismo ossidativo a quello glicolitico, che è ovviamente anaerobico. L'espressione della piruvato deidrogenasi chinasi 1 inibisce la piruvato deidrogenasi, coinvolta nella conversione del piruvato ad acetyl-CoA, arrestando così l'ingresso nel ciclo di Krebs e di conseguenza la respirazione mitocondriale (Kim et al., 2006). Contemporaneamente il piruvato è ridotto ad acido lattico dalla lattato deidrogenasi.

Quindi per mantenere il bilancio energetico e produrre un adeguato numero di molecole di ATP sono trascritti maggiormente i geni codificanti le proteine che trasportano il glucosio, quelle che inducono la glicogenolisi e gli enzimi della via glicolitica e sono ridotti al minimo tutti i meccanismi non essenziali che consumano energia (Semenza et al., 1994).

Il fattore HIF-1 induce in modo considerevole l'espressione dell'eritropoietina, come accennato sopra, ed anche dei geni del metabolismo del ferro, inclusi quelli della transferrina, dei suoi recettori e della ferrossidasi, in quanto questo elemento rappresenta il principale fattore limitante dell'eritropoiesi. L'aumento dei globuli rossi dovrebbe così garantire un aumento di rifornimento di ossigeno ai tessuti colpiti da ipossia (Farrel and Lee, 2004).

Innegabilmente è ormai chiaro che HIF-1 gioca un ruolo critico nel provocare l'angiogenesi, un processo che comporta la formazione di nuovi vasi sanguigni come germogli di vasi esistenti, stimolando l'espressione di uno dei fattori di crescita chiave di questo fenomeno ovvero il fattore di crescita endoteliale vascolare o VEGF (Zimna and Kurpisz, 2015).

Come è noto la sproorzionata e veloce divisione delle cellule cancerose nei tumori solidi, come il neuroblastoma, genera molte aree ipossiche all'interno della massa tumorale in accrescimento, a causa dello squilibrio tra la riserva di ossigeno ed il suo consumo. Quindi la progressione del tumore e la sua capacità di dare luogo a metastasi è resa possibile soprattutto dal fenomeno noto come "switching angiogenico" HIF-1 dipendente, grazie al quale si formano nuovi capillari, fonte di ulteriori scorte di ossigeno e nutrienti indispensabili per la proliferazione delle cellule tumorali (Rankin and Giaccia, 2008; Zimna and Kurpisz, 2015).

HIF-1 regola l'aumentata espressione di un gran numero di fattori proangiogenici ed in primis, come detto sopra, VEGF, i suoi recettori Flt-1, Flk-1, l'angiopoietina 1 e 2 (Ang-1 e Ang-2) e le metalloproteasi, in particolare MMP2. Così è reso possibile ogni passaggio del fenomeno angiogenico; dalla migrazione delle cellule endoteliali a siti distanti, permessa anche dalla degradazione della matrice extracellulare ad opera delle metalloproteasi, alla proliferazione delle stesse ed alla formazione e stabilizzazione dei nuovi vasi, tramite la sintesi di componenti della membrana basale quali la

fibronectina, per la cui espressione è coinvolta la subunità HIF-2 α (Ben-Yosef et al., 2005; Skuli et al., 2009; Zimna and Kurpisz, 2015). A sua volta VEGF induce l'aumento di altri fattori proangiogenici, quali il fattore di crescita derivato dalle piastrine e dei fibroblasti (PDGF e FGF), e dei loro recettori (Brown and Giaccia, 1998). I capillari tumorali appena formati si distinguono notevolmente da quelli prodotti da un'angiogenesi fisiologica, infatti sono più disorganizzati, tortuosi, con varie anomalie strutturali che li rendono meno impermeabili, ma comunque in grado di assolvere la loro funzione (Zimna and Kurpisz, 2015).

In condizioni di ipossia l'aumento della proliferazione cellulare tumorale è promossa dalla sintesi, guidata da HIF-1, di alcuni fattori di crescita e soprattutto IGF-2 o fattore 2 di crescita insulino simile ed il fattore di crescita trasformante alfa (TGF α), che legandosi ai loro rispettivi recettori attivano vie di trasduzione del segnale, tra cui quella delle MAP chinasi e la via PI3K/AKT/mTOR, coinvolte non solo nella regolazione della crescita e sopravvivenza delle cellule ma anche nell'incentivare rispettivamente la prima la trascrizione dei geni bersaglio di HIF-1, la seconda l'espressione dello stesso HIF-1 (Harris, 2002; Semenza 2002).

E' interessante ricordare che molti lavori di ricerca hanno evidenziato che l'ipossia ed HIF-1 sono importanti nei processi che controllano la differenziazione cellulare (Cejude-Martin and Johnson, 2005). Sembra che HIF-1 α si leghi al dominio intracellulare di Notch promuovendone la stabilità ed influenzandone l'attività nella via di trasduzione del segnale che regola lo stato di differenziazione delle cellule (Gustafsson et al., 2005). Pare inoltre che HIF-2 α sia coinvolta nella regolazione dei fattori di trascrizione OCT4 e MYC, che sostengono i processi di differenziazione cellulare, inducendone l'espressione o interagendo direttamente, come si suppone accada con il complesso MYC/MAX (Dang et al., 2008; Gilany and Vafakhah, 2010). La risposta all'ipossia non coinvolge soltanto meccanismi volti alla sopravvivenza della cellula ma induce talvolta sia in condizioni fisiologiche sia in condizioni patologiche, ed in particolare nei tessuti neoplastici, la morte programmata delle cellule o apoptosi.

Nello specifico sembra soprattutto che questo fenomeno abbia lo scopo di prevenire l'accumulo di cellule con un elevato tasso di mutazioni ed una ridotta capacità di

riparazione delle stesse, dovuti entrambi alla stessa ipossia, o sia il destino di cellule tumorali più distanti dai vasi sanguigni, in assenza di una rete vascolare adeguata (Folkman, 1990; Reynolds et al., 1996). Invece le cellule tumorali resistenti e proliferanti in condizioni di ipossia mostrano probabilmente un fenotipo più aggressivo, che le rende meno sensibili alle terapie oncologiche (Hickman et al., 1994; Harris, 2002).

L'apoptosi guidata dall'ipossia è scatenata all'interno della cellula dal rilascio nel citosol del citocromo C, un componente essenziale della catena di trasporto degli elettroni, a seguito dell'aumentata permeabilità della membrana mitocondriale interna. Tale processo avviene come conseguenza dell'attivazione delle proteine pro-apoptotiche della famiglia Bcl-2, ovvero Bax o Bak (Saikumar et al., 1998; Greijer and van der Wall, 2004).

Quindi il citocromo C si lega alla proteina adattatrice Apaf-1 che scatena l'attività a cascata delle protagoniste dell'apoptosi, cioè un gruppo di proteasi, che presentano una cisteina nel loro sito attivo e tagliano le proteine bersaglio a livello di acidi aspartici specifici, note come caspasi e sintetizzate nella cellula sotto forma di precursori inattivi o procaspasi. Una delle prime caspasi ad entrare in gioco è la caspasi 9, che a sua volta taglia le caspasi 3 e 6 (Li et al., 1998; Alberts et al., 2004).

Un importante regolatore dell'apoptosi è la proteina p53, che ha un ruolo cruciale nel controllo del danno al DNA nel ciclo cellulare; essa è coinvolta nella trascrizione dei geni pro- ed anti-apoptotici della famiglia di proteine Bcl-2 (Wei et al., 2001).

HIF-1 α induce l'apoptosi attraverso due meccanismi; un primo coinvolge la proteina p53 ed un secondo agendo direttamente sulle proteine pro-apoptotiche del gruppo Bcl-2.

E' di recente dimostrazione l'interazione di HIF-1 α con MDM2, l'ubiquitina ligasi di p53, processo che impedisce la degradazione di quest'ultima rendendola stabile (Chen et al., 2003). Comunque è stato anche scoperto che il dominio ODD di HIF-1 α presenta un sito che permette il legame diretto con la stessa p53, la quale, stabilizzata, può regolare l'arresto del ciclo cellulare, mediato da p21, o l'apoptosi tramite induzione di proteine quali Bax o Bak (Hansson et al., 2002; Greijer and van der Wall, 2004).

Il secondo meccanismo, rivelato in alcune linee cellulari di carcinomi umani, quali il tumore al seno, ma anche nelle cellule endoteliali, nei macrofagi e nei fibroblasti, consiste nell'aumentata espressione HIF-1 dipendente di una proteina pro-apoptotica, BNIP3, e del suo omologo NIX, che agiscono legando ed inibendo l'azione di Bcl-2 e Bcl-xl (Boyd, 1994).

La successiva figura 9 riassume le principali vie metaboliche attivate dal HIF-1 nella risposta cellulare all'ipossia.

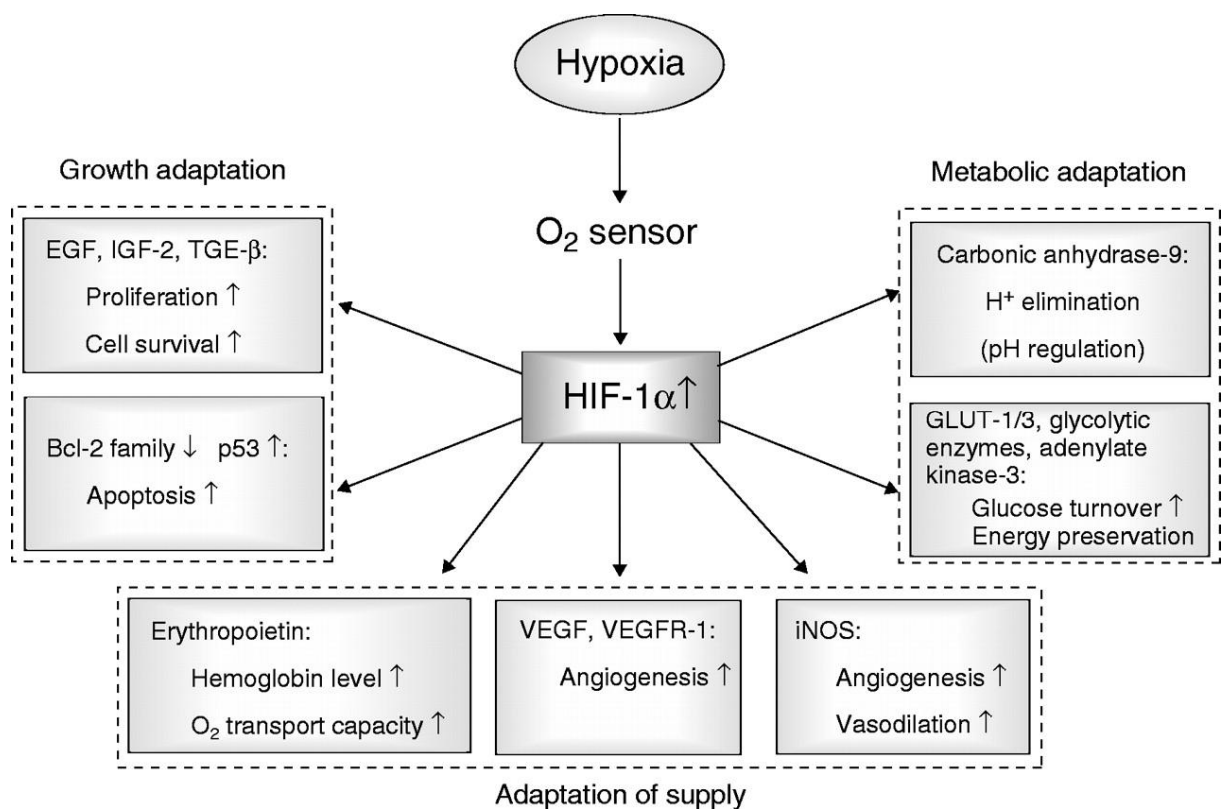


Figura 9. Alcuni tra i geni trascritti da HIF-1 in condizioni di ipossia.

2.2 La Transglutaminasi 2 ed il suo ruolo in condizioni di ipossia

La transglutaminasi 2 (TG2), un enzima identificato per la prima volta nel 1957 e così chiamato per la sua capacità di incorporare ammine primarie di basso peso molecolare alle proteine, appartiene ad una famiglia di enzimi che, nell'uomo, conta altri otto membri ovvero TG1, TG3, TG4, TG5, TG6, TG7 ed il Fattore XIII cataliticamente attivi e la proteina della banda 4.2, una componente della membrana eritrocitaria, che manca della funzione enzimatica (Sarkar et al., 1957; Griffin et al., 2002).

Tra i tutti i componenti di questa famiglia la transglutaminasi 2 umana, conosciuta anche come transglutaminasi tissutale o citosolica (tTG o TGc), è indubbiamente l'enzima più intrigante e studiato per la sua multifunzionalità, oltre ad essere espresso in modo praticamente ubiquitario nella maggior parte dei tessuti (Park et al., 2010).

Sebbene essa sia principalmente presente nel citoplasma, è accertata la sua presenza in molti compartimenti cellulari, nel nucleo, dove si associa anche con le proteina Rb e p53 e con gli istoni (Milakovic et al., 2004), nei mitocondri, nella membrana plasmatica ed è inoltre secreta nell'ambiente extracellulare (Mehta et al., 2010).

Il suo gene *TGM2*, localizzato sul cromosoma 20q11-12 e composto da 13 esoni e 12 introni, codifica per una proteina monomerica di 687 amminoacidi, con una massa molecolare di circa 80 KDa, che rappresenta la transglutaminasi 2 a lunghezza intera o TG2-L, caratterizzata da quattro distinti domini globulari.

In ordine essi sono un β -sandwich ammino (NH_2) terminale, nel quale sono presenti i siti di legame per le integrine e la fibronectina, il core che contiene la triade catalitica composta da Cys277, His335 ed Asp358, ed un triptofano essenziale per la reazione enzimatica e due domini β -barrel carbossi (COOH) terminali, dove il primo presenta un sito per l'idrolisi di GTP e ATP ed il secondo un altro per reclutare ed attivare la fosfolipasi C (Mehta et al., 2010).

La successiva figura 10 illustra i domini della transglutaminasi 2, mettendone in evidenza i ruoli e le probabili funzioni.

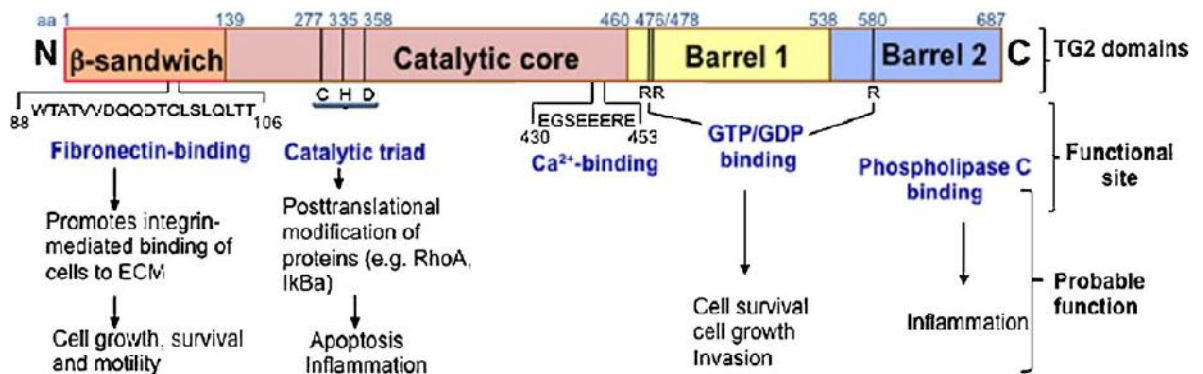


Figura 10. Rappresentazione schematica dei domini strutturali e funzionali della transglutaminasi 2.
(fonte: Mehta et al., 2010)

E' ormai noto che il gene *TGM2* subisce uno splicing alternativo che genera differenti trascritti di TG2, codificanti isoforme della proteina solitamente più corte e con sequenze variabili nella regione COOH-terminale (Eckert et al., 2014).

L'isoforma più conosciuta, isolata da cellule di eritroleucemia umana indotte a differenziare con acido retinoico, prende il nome di TG2-S o TGH, un polipeptide di 548 amminoacidi di circa 62KDa, che strutturalmente condivide con TG2-L la triade catalitica, mentre si differenzia da essa per la regione carbossi terminale. Infatti quest'ultima è costituita da 10 nuovi amminoacidi e manca del residuo Arg580, fondamentale per il legame di GTP (Fraij et al., 1992).

Tra le altre isoforme si ricordano TGH2, una proteina di 349 amminoacidi con una massa molecolare di quasi 38 KDa (Fraij and Gonzales, 1996) ed altre due, dette tTGv1 e tTGv2, individuate e caratterizzate nelle cellule endoteliali umane di vene ombelicali (HUVEC), in cellule muscolari lisce e nei leucociti. Queste sono generate da un evento di splicing dell'RNA messaggero atipico, che genera proteine di grandezza paragonabile a TG2-L, ma distinte ancora una volta da sequenze C-terminali alternative (Lai et al., 2007).

La principale attività enzimatica svolta dalla transglutaminasi 2, condivisa con quasi tutti gli altri componenti della famiglia, è la transamidazione, una reazione calcio (Ca^{2+}) dipendente che ha due esiti principali. Il primo è l'aggiunta di ammine primarie

o di piccole ammine biogene, come le poliammine, alle proteine substrato; il secondo è la formazione di ponti isopeptidici intermolecolari o legami incrociati ϵ -(γ -glutamyl)lisina tra due subunità proteiche. Talvolta il “cross-linking” tra le proteine può essere indiretto perché mediato da una catena di ammine primarie (Gundemir et al., 2012).

Il meccanismo di questa reazione, analizzato nel dettaglio, comprende due passaggi. Dapprima lo zolfo del residuo di cisteina 277 nel sito catalitico esegue un attacco nucleofilo al carbonio in posizione γ di una glutamina presente nella catena laterale di un peptide, che rappresenta il donatore di gruppi acilici, formando un intermedio tioestere, con il rilascio di una molecola di ammoniaca. Quindi la transamidazione si completa quando l’intermedio tioestere è attaccato da un composto accettore di gruppi acilici, sia esso un’ammina primaria o il gruppo ϵ -amminico di una lisina della catena laterale di una proteina; se la molecola accettrice finale è l’acqua, la glutamina è convertita ad acido glutammico ed, in tal caso, la reazione è detta deaminazione (Folk, 1983). La figura 11 rappresenta l’attività enzimatica caratteristica delle transglutaminasi.

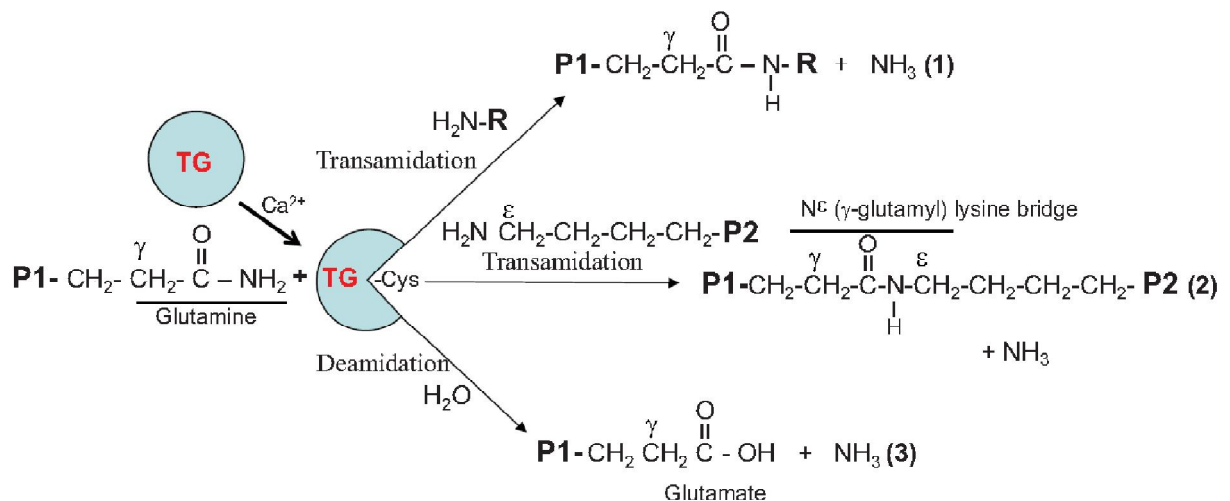


Figura 11. Le principali reazioni enzimatiche catalizzate dalle transglutaminasi.
(fonte: Eckert et al., 2014)

La transamidazione è una vera e propria modificazione post-traduzionale delle proteine dipendente dal calcio, che genera dei cambiamenti significativi nelle proprietà

dei suoi substrati rendendoli soprattutto resistenti a fenomeni distruttivi sia fisici che chimici (Odi and Coussons, 2014).

E' stato ampiamente suggerito che la transglutaminasi 2 svolga questa attività sia per stabilizzare le proteine della matrice extracellulare, che in tal modo diventano resistenti alla degradazione meccanica e proteolitica, sia per impedire il rilascio del contenuto cellulare nell'ambiente esterno da parte di cellule che vanno incontro a morte per apoptosi, prevenendo lo scatenarsi di eventi infiammatori o il danneggiamento dei tessuti circostanti (Nicholas et al., 2003; Belkin, 2011). Inoltre TG2 stessa, in cellule sottoposte a diverse condizioni di stress, scatena, in seguito alla maggiore disponibilità di calcio, un intensivo "cross-linking" delle proteine intracellulari, che a turno avviano il processo apoptotico (Mehta et al., 2006).

La transglutaminasi 2 è un enzima affascinante perché svolge anche moltissime altre attività, sia enzimatiche sia non enzimatiche, indipendenti dalla presenza di calcio all'interno della cellula (Gundemir et al., 2012).

Il calcio è pertanto responsabile della bi-funzionalità di TG2, la quale è strettamente legata alla sua conformazione. Infatti quando una molecola di Ca^{2+} occupa il suo posto nella proteina, i domini amino e carbossi terminale si distanziano gli uni dagli altri, cosicché il sito catalitico è esposto e può svolgere la reazione di aciltrasferasi; basse concentrazioni di calcio intracellulare (10-20 nM) non permettono il realizzarsi di questa conformazione estesa o aperta, e di conseguenza il dominio catalitico interagisce considerevolmente con i due domini β -barrel, generando una struttura chiusa o compatta, che contrariamente rende possibile l'accesso di GTP nel suo unico sito, dove è idrolizzato a GDP (Eckert et al., 2014). In quest'ultimo caso la transglutaminasi 2 si comporta come una proteina G, coinvolta in diverse vie di trasduzione del segnale, tra cui quelle dei recettori $\alpha 1$ adrenergici, dell'ossitocina e dei trombociti, e presenta tra le sue molecole effettrici la fosfolipasi C (Mhaouty-Kodja, 2004). E' interessante ricordare che esiste un ulteriore meccanismo di regolazione di TG2, associato alle condizioni ossidative specialmente dell'ambiente extracellulare; nello specifico l'ossidazione della proteina risulta in una perdita della sua attività enzimatica, ma non della sua conformazione estesa, e tale stato può essere evitato dal trattamento con la tioredossina (Eckert et al., 2014).

La figura 12 illustra le conformazioni dell'enzima TG2 ed i meccanismi di regolazione appena descritti.

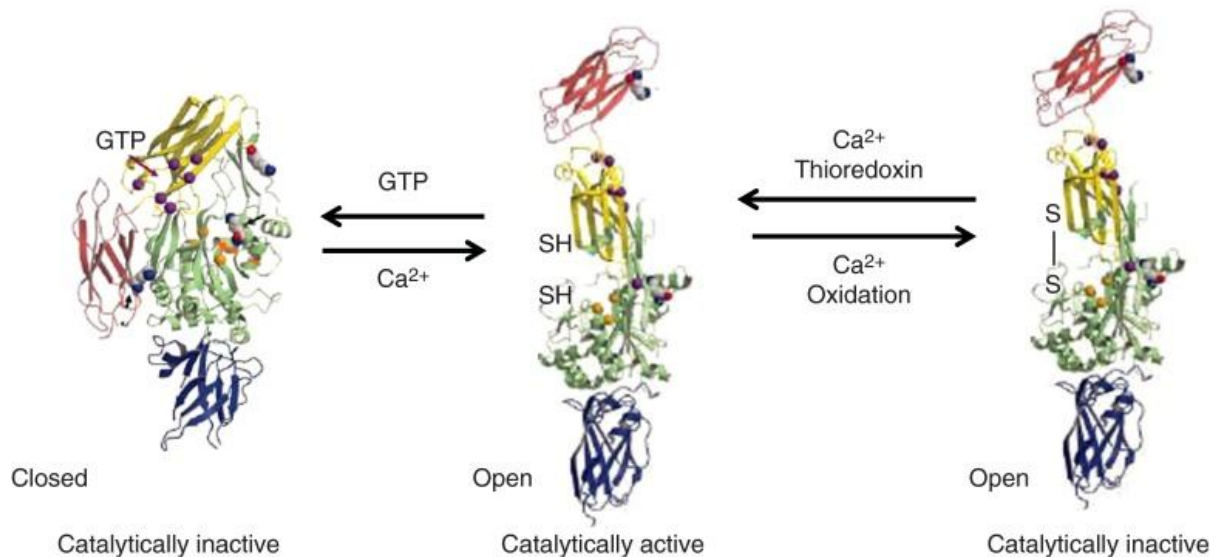


Figura 12. Le tre conformazioni di TG2 ed i suoi meccanismi di regolazione. Il dominio NH₂-terminale è blu, il dominio COOH-terminale è rosso. (fonte: Eckert et al., 2014)

Oltre ad agire come proteina G, la transglutaminasi 2, in assenza di calcio, mostra attività di disolfuro isomerasi, di serina/treonina chinasi ed anche di idrolasi del DNA (Takeuchi et al., 1998; Park et al., 2010).

Indubbiamente è molto interessante il ruolo di TG2 nella membrana plasmatica, dove il suo frammento di 42 KDa NH₂-terminale riconosce e lega con un'alta affinità la fibronectina, ma non le integrine che si associano alla fibronectina stessa, creando delle strutture adesive specializzate tra la cellula e la matrice extracellulare (Akimov and Belkin, 2001; Hang et al., 2005). Comunque è nota anche l'adesione di TG2 ai domini extracellulari di diverse integrine, quali β1 e β3, che rende ancora più forte il legame della cellula con l'ambiente esterno (Akimov et al., 2000). La capacità della transglutaminasi 2 di formare un complesso ternario con le varie isoforme delle integrine e la fibronectina mette in evidenza questa sua funzione, non enzimatica ed indipendente dal calcio, di mediatore o co-recettore tra cellule e matrice extracellulare, che esita non solo in fenomeni di stabilizzazione e assemblaggio della matrice

extracellulare, ma anche nell'attivazione di vie di trasduzione del segnale coinvolte nella sopravvivenza cellulare ed anti-apoptotiche, nella migrazione, nella crescita e nell'invasività cellulare (Akimov and Belkin, 2001; Mehta et al., 2006). Questi fenomeni si riscontrano in diversi tumori metastatici, nei quali sono evidenti alti livelli di espressione di TG2 (Mehlen and Puisieux, 2006; Mangala et al., 2007).

Le funzioni enzimatiche e non enzimatiche calcio indipendenti sopra discusse sono schematizzate nella figura 13.

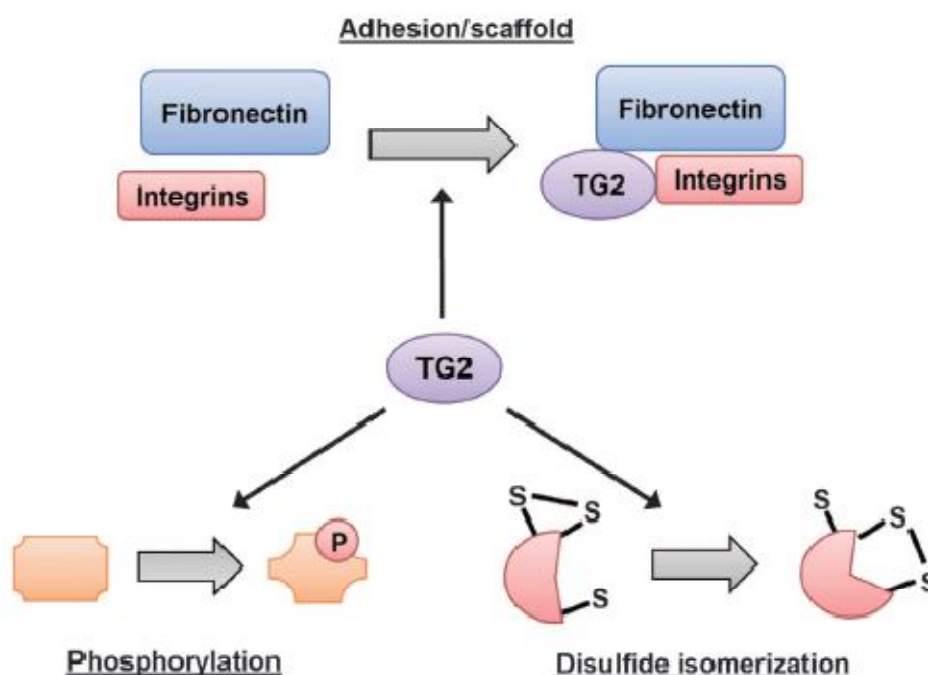


Figura 13. Le funzioni enzimatiche e non enzimatiche Ca^{2+} indipendenti della transglutaminasi 2.
(fonte: Tatsukawa et al., 2016)

In sintesi tutte le svariate attività della transglutaminasi 2, che la rendono unica rispetto alle altre transglutaminasi, giustificano il suo coinvolgimento nella maggior parte dei processi fisiologici critici come la differenziazione, l'apoptosi, la crescita, la sopravvivenza, la migrazione delle cellule e l'assemblaggio della matrice extracellulare, che sono alla base di fenomeni vitali quali l'embriogenesi, la morfogenesi dei tessuti, la guarigione delle ferite e la riparazione dei tessuti (Park et al., 2010).

Tuttavia è ormai evidente che la transglutaminasi 2 presenta un ruolo rilevante nella patogenesi di numerose malattie, tra cui si citano i disordini infiammatori e metabolici, le malattie autoimmuni, le patologie neurodegenerative ed i tumori (Mangala and Mehta, 2005; Kim, 2006; Ruan and Johnson, 2007; Odii and Coussons, 2014).

L'espressione della transglutaminasi 2 è principalmente controllata a livello trascrizionale, dove il suo promotore presenta diverse sequenze nucleotidiche specifiche per la risposta a numerose molecole, coinvolte in varie funzioni biologiche, oltre a quattro siti di legame contenenti i GC box della proteina ubiquitaria Sp1, un fattore che aumenta l'efficienza della trascrizione del gene (Lu et al., 1995).

I più studiati e conosciuti attivatori di TG2 sono gli acidi retinoici, i cui recettori nucleari RAR e RXR si legano ad elementi di risposta RRE-1 ed RRE-2, posizionati 1.7 Kb a monte del sito d'inizio della trascrizione (Nagy et al., 1996).

Gli acidi retinoici sono utilizzati per trattamenti a lungo termine di tumori solidi e nello specifico del neuroblastoma, per indurre la transglutaminasi 2 che è ampiamente coinvolta nei processi di differenziazione delle cellule tumorali (Joshi et al., 2006). Diversi studi però hanno evidenziato che cellule di neuroblastoma, che non presentano amplificazione di N-MYC, quando esposte agli acidi retinoici per tempi brevi, rappresentati al massimo da tre giorni, diventano più aggressive, aumentando la loro capacità d'invadere i tessuti circostanti (Joshi et al., 2006; Lee et al., 2012). In tali casi si è evidenziato che la transglutaminasi 2, indotta dall'acido retinoico, agisce sul fattore di trascrizione NF- κ B, che a sua volta permette l'aumentata trascrizione delle metalloproteasi MMP-2 ed MMP-9 coinvolte nella degradazione della matrice extracellulare, favorendo così il potenziale metastatico delle cellule cancerogene. Inoltre è presumibile che la stessa transglutaminasi 2, interagendo con la fibronectina e le integrine sulla superficie delle cellule tumorali, inneschi fenomeni di migrazione cellulare e quindi permetta la metastasi (Joshi et al., 2006; Lee et al., 2012).

Tra le altre molecole capaci di stimolare e talvolta aumentare l'espressione della transglutaminasi 2 si ricordano il fattore di crescita trasformante β 1 o TGF- β 1 (Ritter and Davies, 1998), lo stesso fattore di trascrizione NF- κ B e le citochine coinvolte nei processi infiammatori, quali l'interleuchina 6 o IL-6 ed il fattore di necrosi tumorale α

o TNF- α (Suto et al., 1993; Mirza et al., 1997; Kuncio et al., 1998) ed ancora le vitamine A e D ed i glucocorticoidi (Lu et al., 1995).

Abbastanza recente è la rivelazione nel promotore di TG2 di sei presunte sequenze (5'-RCGTG-3') riscontrate come elementi di risposta all'ipossia, di cui una in particolare, localizzata 367 paia di base a monte del sito d'inizio di trascrizione, sembra essere riconosciuta dalla subunità HIF-1 α del fattore 1 indotto dall'ipossia (Jang et al., 2010). La figura 14 mostra i principali elementi che regolano il promotore della transglutaminasi 2 discussi nel testo.

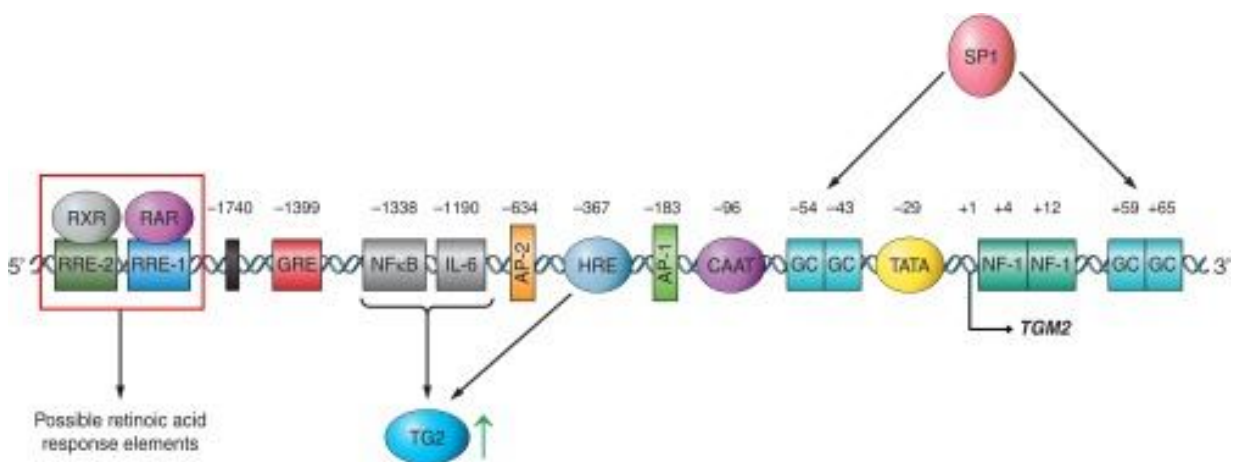


Figura 14. Il promotore di TG2 ed alcune tra le principali sequenze che ne regolano l'espressione.

(fonte: Eckert et al., 2014)

La correlazione tra la transglutaminasi 2 ed i tumori maligni è un campo di ricerca estremamente attivo (Huang et al., 2015). L'aberrante espressione di questo enzima è ampiamente documentata in numerosi tipi di cancro, già secondari e metastatici o in tumori che mostrano resistenza alla chemioterapia, dove svolge un ruolo preminente nella sopravvivenza delle cellule neoplastiche, nella progressione del tumore e nella sua diffusione ulteriore inducendo, ad esempio, la produzione della metalloproteasi 2 (MMP-2), proteina essenziale nei fenomeni di invasività neoplastica (Mangala et al., 2007; Satpathy et al., 2009). Diversamente in molti tumori primari si osserva spesso una scarsa presenza della transglutaminasi 2, il cui gene è silenziato con un

meccanismo epigenetico di metilazione delle isole CpG, rendendo il tumore stesso più sensibile alle terapie farmacologiche (Ai et al., 2008).

Invece nel neuroblastoma con fenotipo aggressivo la transglutaminasi 2 è principalmente implicata nella differenziazione cellulare e la sua repressione ad opera di N-MYC, tramite il reclutamento dell'istone deacetilasi 1 nei siti di legame di Sp1 sul promotore di TG2, contribuisce alla proliferazione e migrazione delle cellule tumorali (Liu et al., 2007). Uno studio più approfondito ha chiarito che le diverse isoforme di TG2, indotte dall'acido retinoico, hanno un effetto opposto sulla differenziazione delle cellule cancerose di neuroblastoma. Nello specifico la transglutaminasi 2 a lunghezza intera o TG2-L blocca la differenziazione cellulare, sostenendo la proliferazione tumorale, grazie alla sua capacità di comportarsi come proteina G, presentando il residuo di arginina critico per il legame del GTP (Arg580), e mantenendo latente l'attività transamidasi; dall'altro lato TG2-S, privo dell'Arg580, non può inibire la sua azione enzimatica, la quale è coinvolta nei processi di differenziazione. La maggiore espressione di TG2-S rispetto alla forma L, indotta dagli acidi retinoici, potrebbe spiegare l'effetto antitumorale di questi composti nel trattamento del neuroblastoma (Tee et al., 2010).

Comunque il ruolo della transglutaminasi 2 sullo sviluppo o progressione del tumore rimane ancora controverso se si considerano gli studi che mostrano l'importanza dell'attività enzimatica di TG2 nel creare delle barriere che ostacolano l'espandersi del cancro, stabilizzando la matrice extracellulare con legami crociati tra le proteine (Mangala et al., 2005).

La conflittualità dell'azione di TG2 nella biologia dei tumori è probabilmente dovuta alla diversità di tipo e stadio delle varie neoplasie e forse, ancora di più, alla diversa localizzazione di questo enzima nella cellula tumorale (Mehta et al., 2010).

Infatti per molti ricercatori è allettante dare una certa valenza al fatto che la transglutaminasi 2 citosolica abbia prevalentemente effetti pro-apoptotici, mentre la presenza di questo enzima a livello nucleare, nella membrana plasmatica ed extracellulare sia collegata alle sue proprietà anti-apoptotiche (Milakovic et al., 2004).

L'ipossia rappresenta una condizione molto comune nei tumori solidi, come il neuroblastoma, ed è capace di promuovere la crescita tumorale ed il potenziale

metastatico (Hockel and Vaupel, 2001), attivando molteplici risposte di adattamento mediate dal fattore di trascrizione 1 indotto dall'ipossia, ovvero HIF-1, descritte ampiamente nel paragrafo precedente.

La scoperta che la transglutaminasi 2 è un bersaglio trascrizionale di HIF-1 apre interessanti orizzonti sul coinvolgimento di questo enzima nei meccanismi che aumentano la sopravvivenza delle cellule tumorali ipossiche e la loro resistenza alle terapie anticancro. Evidenze sperimentali suggeriscono che TG2 agisca come un mediatore anti-apoptotico di HIF-1, rendendo vantaggiosa la crescita tumorale nel microambiente ipossico (Jang et al., 2010). Il meccanismo con cui la transglutaminasi 2 agisce è particolarmente intrigante ed è schematizzato nella figura 15.

Da un lato questo enzima inibisce l'attività della caspasi 3, una delle proteasi chiave della cascata apoptotica, catalizzando, tramite reazione transamidasica, la formazione di aggregati insolubili di questa proteina. Dall'altro lato TG2 stessa attiva il fattore di trascrizione NF- κ B, che reprime l'apoptosi tramite l'espressione degli inibitori specifici IAPs, soprattutto cIAP2, che agiscono legandosi alle caspasi stesse (Jang et al., 2010).

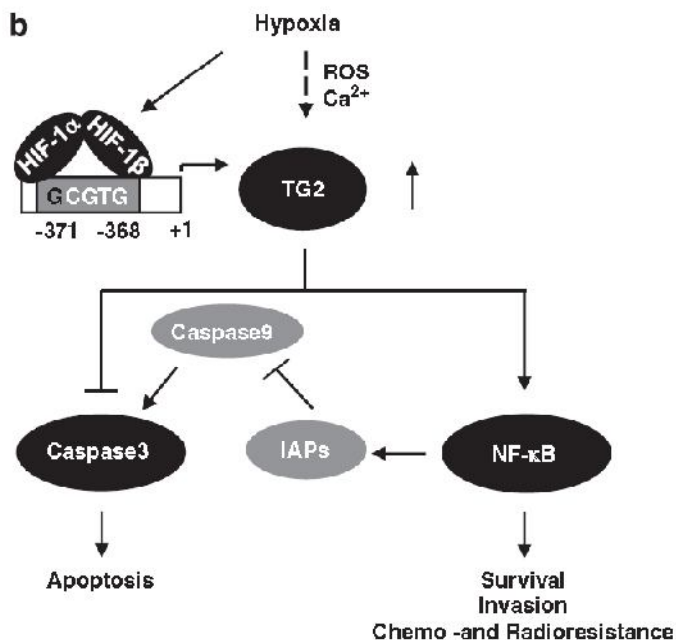


Figura 15. I meccanismi proposti dell'attività anti-apoptotica di TG2 indotta dall'ipossia.

(fonte: Jang et al., 2010)

La rivelazione che l'attività catalitica della transglutaminasi 2 reprime l'apoptosi è un evento particolare e confinato ad alcuni contesti, come quello appena descritto.

Infatti la maggior parte degli studi collega la reazione di “cross-linking” delle proteine intracellulari alla morte cellulare programmata, ed è favorevole nel considerare la forma chiusa di TG2, che lega il GTP, responsabile dell'attivazione di vie di trasduzione del segnale coinvolte nella sopravvivenza delle cellule cancerose (Eckert et al., 2015).

Inoltre è fondamentale considerare che ulteriori studi hanno attribuito le divergenti funzioni della transglutaminasi 2 sulla vita e la morte delle cellule alle sue isoforme, derivate dallo splicing alternativo del gene *TGM2*.

In particolare un lavoro ha dimostrato che TG2-L garantisce una maggiore sopravvivenza cellulare, mentre TG2-S induce morte per apoptosi, in un modo sorprendentemente indipendente dalla sua attività transamidasi. Infatti nelle cellule si osservano degli agglomerati dello stesso enzima, di dimensioni variabili dai 180 ai 220 KDa, che non sembrano derivare da una reazione di “autocross-linking” ma da un inesplorato meccanismo di aberrante aggregazione, che porta alla morte per apoptosi (Antonyak et al., 2006).

La risposta della transglutaminasi 2 allo stimolo ipossico è quindi particolarmente interessante, e lo è ancora di più se si considera che essa è capace di aumentare l'espressione di HIF-1 α stesso e di conseguenza dei suoi geni bersaglio, tra cui quelli coinvolti nella transizione epitelio-mesenchimale o EMT, un processo fisiologicamente legato allo sviluppo embrionale, che nei tumori si riattiva ed è essenziale per avviare lo sviluppo delle metastasi (Thiery et al., 2009; Kumar and Mehta, 2012). Nello specifico l'azione di TG2 sull'espressione di HIF-1 α avviene in modo indiretto ovvero tramite l'attivazione di NF- κ B, un fattore di trascrizione che a sua volta regola la stessa transglutaminasi 2.

Il meccanismo di interazione tra TG2 ed NF- κ B è ormai conosciuto nel dettaglio.

In condizioni normali il fattore NF- κ B, un eterodimero costituito dalle subunità p65 o RelA e p50, è reso inattivo dal legame con la sua proteina inibitrice I κ B α . L'esposizione a stimoli infiammatori induce la fosforilazione di I κ B α da parte della

I κ B chinasi, che in tal modo si separa dal fattore di trascrizione e va incontro ad ubiquitinazione e degradazione nel proteasoma. NF- κ B libero si trasferisce nel nucleo dove esprime i geni di risposta allo stress (Ghosh and Baltimore, 1990).

La transglutaminasi 2 attiva il fattore di trascrizione NF- κ B tramite due vie che non richiedono l'intervento della chinasi I κ B. La prima modalità prevede la polimerizzazione della proteina inibitrice I κ B α , mediata dalla reazione di transamidazione di TG2, che risulta nella sua degradazione proteasomica e conseguente liberazione di NF- κ B (Lee et al., 2004; Mann et al., 2006).

La seconda via propone un'interazione diretta tra TG2 ed I κ B α , che induce una degradazione della proteina inibitrice tramite un meccanismo che non richiede l'intervento del proteasoma. A questo punto NF- κ B trasloca nel nucleo dove si lega alle sequenze promotrici di HIF-1 α , inducendo così la risposta mediata da HIF-1 (Kumar and Mehta, 2012). La sequenza appena descritta è illustrata nella figura 16.

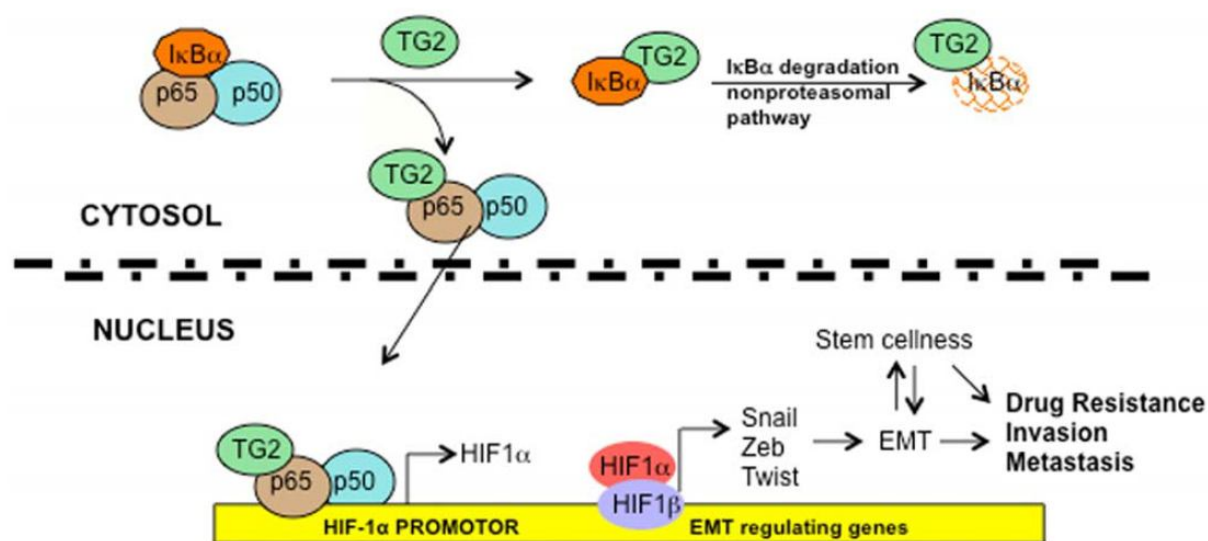


Figura 16. Rappresentazione schematica dell'attivazione di HIF-1 α mediata dall'induzione di NF- κ B dipendente da TG2, tramite una via non canonica.
(fonte: Kumar and Mehta, 2012)

La transglutaminasi 2 quindi è fondamentale per regolare il comportamento delle cellule tumorali e la sua azione sulla transizione epitelio-mesenchimale avviene anche direttamente, grazie alla sua capacità di modificare, tramite l'attività catalitica, diversi substrati proteici sia all'interno che all'esterno delle cellule neoplastiche. Ad esempio

media la deaminazione di varie proteine del citoscheletro, crea legami crociati tra actina e miosina e modula la formazione e ricostruzione della matrice extracellulare (figura 17) (Huang et al., 2015).

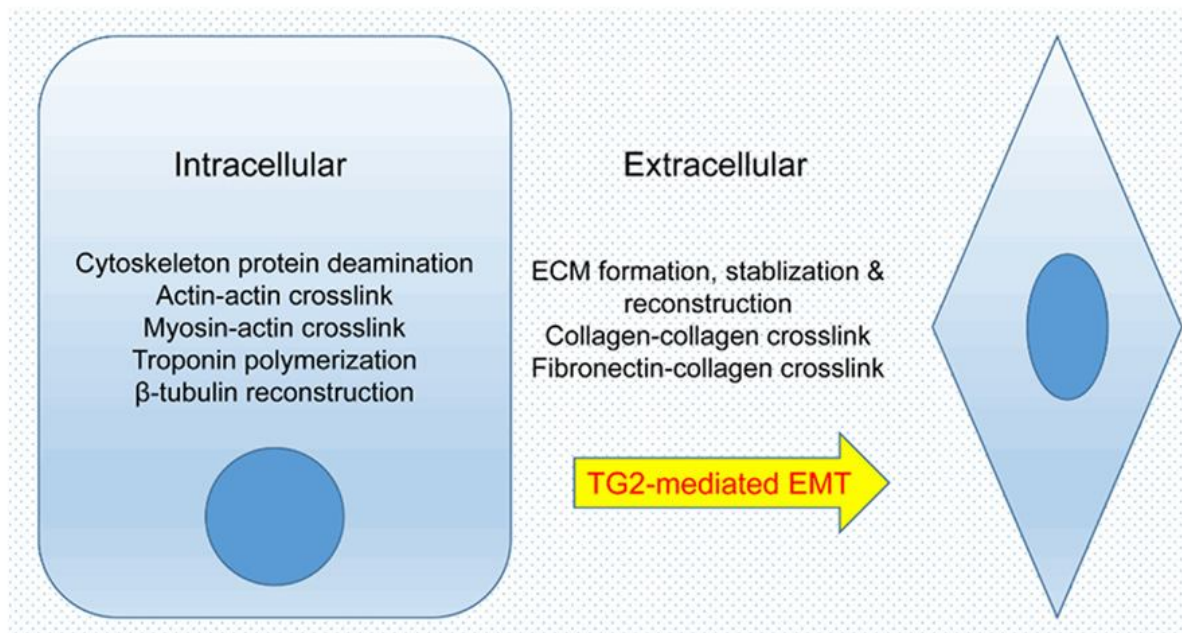


Figura 17. Rappresentazione schematica della regolazione della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) mediata da TG2.
(fonte: Huang et al., 2015)

Il rapporto tra TG2, NF- κ B ed HIF-1 α mette in evidenza lo stretto legame esistente tra una condizione di infiammazione cronica, l'ipossia e l'insorgenza e la progressione del cancro (Kumar and Mehta, 2012). Quest'ultima infatti dipende anche dall'espressione genica HIF-1 dipendente, che rende le cellule tumorali capaci di sopravvivere, proliferare, invadere i tessuti vicini e distanti, superando così l'ostacolo dato dalla ridotta disponibilità di ossigeno e nutrienti e rendendo la neoplasia più aggressiva e resistente ai trattamenti chemioterapici (Eckert et al., 2014).

La successiva figura 18 è uno schema semplice della correlazione sopra citata tra l'enzima ed i due fattori di trascrizione.

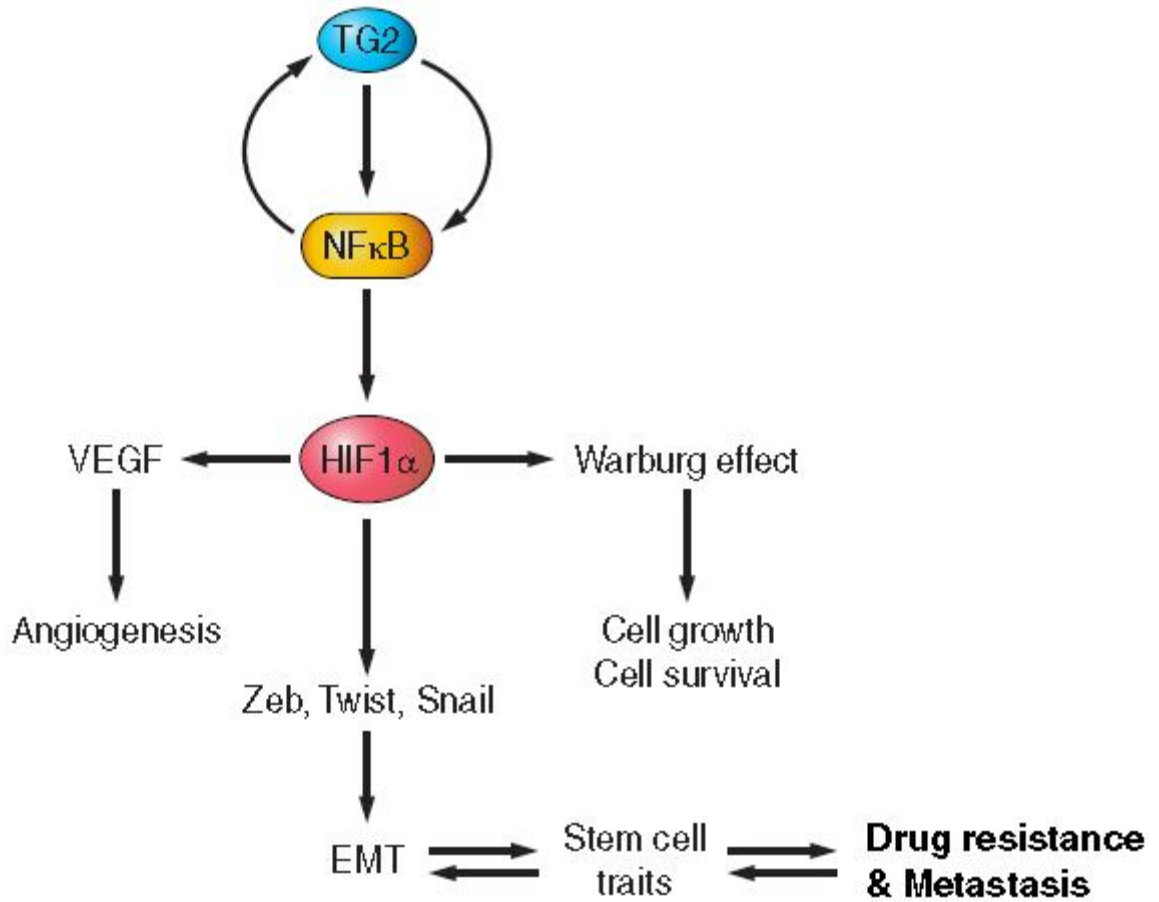


Figura 18. Rappresentazione schematica della relazione tra TG2, NF-κB ed HIF-1α nelle cellule cancerose.
 (fonte: Eckert et al., 2014).

2.3 Effetti dell'ipossia sul neuroblastoma

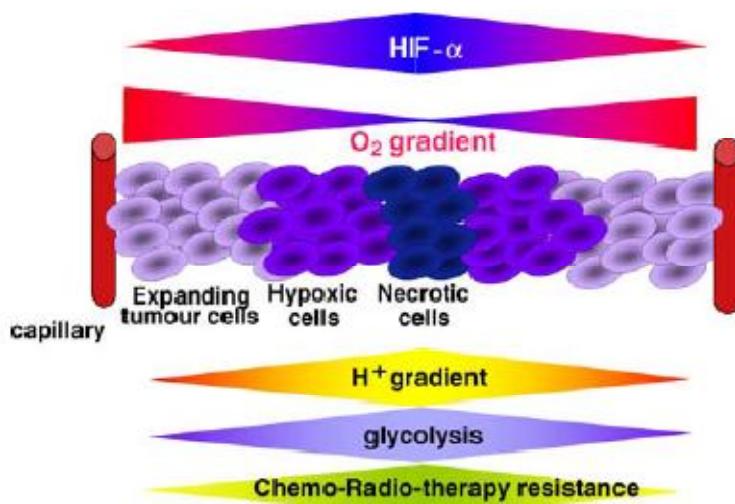
Il neuroblastoma, come la maggior parte dei tumori solidi, è caratterizzato da diverse aree ipossiche, causate principalmente dal fatto che le cellule tumorali crescono così velocemente da generare una massa che si distanzia sempre più dai vasi sanguigni circostanti, il cui di sviluppo è più lento (Brahimi-Horn et al., 2007). Di conseguenza in queste zone del cancro si crea uno squilibrio tra il consumo di ossigeno e dei nutrienti e le possibili riserve di questi stessi elementi; inoltre spesso la circolazione sanguigna presente nel tumore stesso non riesce a colmare questo divario, a causa di una rete vascolare con diverse anomalie strutturali e funzionali, che la rendono talvolta poco efficiente (Vaupel, 2004).

Per di più frequentemente le regioni ipossiche circondano un core di cellule necrotiche, la cui morte è dovuta a condizioni di grave ipossia o quasi anossia (Brahimi-Horn et al., 2007).

In generale i tumori in condizioni di ipossia, rispetto ai tumori ben ossigenati, sono più aggressivi ed hanno una maggiore capacità di dar luogo a metastasi (Rofstad, 2000). L'ipossia è associata anche ad un' aumentata instabilità genetica, soprattutto per effetto negativo sull'espressione dei geni coinvolti nei meccanismi di riparazione del DNA, ed è causa di un' aumentata resistenza alle chemio e radio terapie (Reynolds et al., 1996; Brown, 2002).

La figura 19 rappresenta una massa tumorale con regioni ipossiche ed alcune tra le sue caratteristiche.

Figura 19. Rappresentazione schematica di una massa tumorale con aree ipossiche ed alcune sue caratteristiche.
(fonte: Brahimi-Horn et al., 2007)



L'adattamento delle cellule di neuroblastoma alla scarsa disponibilità di ossigeno è dovuto all'attivazione del fattore di trascrizione indotto dall'ipossia ed in particolare delle sue due subunità HIF-1 α ed HIF-2 α (Axelson et al., 2005). Entrambe le isoforme cooperano nell'espressione di geni codificanti proteine coinvolte nell'angiogenesi e nei processi metastatici, ma ciascuna di esse regola singolarmente altri geni. Ad esempio HIF-1 α attiva quasi tutti i geni coinvolti nel metabolismo glicolitico, mentre HIF-2 α induce soprattutto la trascrizione di proteine quali l'eritropoietina o fattori coinvolti nei processi di differenziazione cellulare quali OCT4 (Hu et al., 2003).

Inoltre è molto intrigante la scoperta che nelle cellule di neuroblastoma l'espressione delle due isoforme HIF-1 α ed HIF-2 α varia in base alla presenza dell'amplificazione del proto-oncogene *N-MYC*. Entrambe le subunità sono presenti nelle cellule che presentano una sola copia del gene *N-MYC*, mentre in quelle dove quest'ultimo è amplificato si riscontra quasi esclusivamente la subunità HIF-1 α e sembra che l'espressione di HIF-2 α sia silenziata a livello trascrizionale tramite fenomeni epigenetici di metilazione del DNA e deacetilazione degli istoni. Interessante è anche considerare la diversa distribuzione delle due isoforme nelle cellule tumorali di neuroblastoma, ovvero HIF-1 α è localizzata prevalentemente nel nucleo, mentre HIF-2 α si trova sia nel nucleo sia nel citoplasma (Qing et al., 2010).

Quindi sommariamente si possono classificare due gruppi di neuroblastoma; uno in cui *N-MYC* amplificato ed HIF-1 α cooperano nel rendere il tumore più aggressivo ed un altro dove *c-MYC* ed HIF-2 α collaborano per rendere più maligno il neuroblastoma con una sola copia del gene *N-MYC* (Qing et al., 2010). Infatti molti studi hanno evidenziato che l'espressione di HIF-2 α è coinvolta nello sviluppo di neuroblastomi con un esito clinico infausto o comunque sfavorevole (Holmquist-Mengelbier et al., 2006; Pietras et al., 2009).

Tra i geni indotti dall'ipossia nel neuroblastoma sono importanti da ricordare, oltre quelli codificanti le proteine che permettono la formazione di una nuova rete vascolare ed in primis il VEGF, tutti quelli implicati nell'assorbimento del glucosio, quali GLUT3, GLUT1 ed i vari enzimi della glicolisi, che in mancanza di ossigeno, diventa la via metabolica primaria dalla quale le cellule tumorali ricavano energia per crescere e proliferare (Jögi et al., 2004; Hsu and Sabatini, 2008).

In particolare è noto che sia HIF-1 α sia N-MYC presentano nei promotori dei geni per l'esochinasi 2 (*HK2*), la piruvato deidrogenasi chinasi 1 (*PK1*) e la lattato deidrogenasi A (*LDHA*) sequenze HRE ed E-box, strettamente vicine le une alle altre, e pertanto contribuiscono insieme alla regolazione dell'espressione di queste proteine (Kim et al., 2007). L'aumento della produzione di acido lattico nelle cellule cancerose causa una diminuzione del pH extracellulare, che però è tenuto sotto controllo grazie alla produzione dell'anidrasi carbonica IX, una delle proteine maggiormente indotte dai fattori HIFs (Ivanov et al., 2001). Contrariamente il pH all'interno delle cellule è relativamente normale o lievemente alcalino per l'azione di un gran numero di proteine di trasporto transmembrana, scambiatori e pompe, coinvolte nell'omeostasi della concentrazione degli ioni H⁺, la cui espressione è sempre mediata dagli HIFs (Brahimi-Horn et al., 2007).

La sopravvivenza e la crescita del neuroblastoma ipossico è garantita dall'espressione soprattutto dei fattori di crescita insulino simili IGF-1 ed IGF-2 e dei rispettivi recettori, che avviano un meccanismo di segnalazione autocrino (Mattsson et al., 1986). Un processo simile è anche sostenuto dal VEGF e dal suo co-recettore, la neuropilina 1 o NRP-1, che inducono l'attivazione della proliferazione e promuovono la migrazione cellulare (Soker et al., 1998). Un'altra proteina indotta dall'ipossia osservata nel neuroblastoma è l'adrenomedullina, un ormone con capacità mitogene che stimola non solo la sopravvivenza cellulare ma anche la formazione di una nuova rete vascolare tumorale (Zudaire et al., 2003).

Infine è interessante ricordare l'espressione in condizioni ipossiche delle metallotioneine, MT2A e MT1H, che sono implicate nella crescita cellulare e nella resistenza ad alcuni farmaci (He et al., 2000; Jin et al., 2002). In particolare queste agiscono sequestrando il platino e agenti alchilanti presenti nei composti usati nelle terapie, contrastandone così l'azione citotossica (Doz et al., 1993).

Molti e considerevoli ricerche dimostrano l'effetto dell'ipossia sullo sviluppo del potenziale invasivo dei tumori, che accade tramite l'aumentata espressione, HIF-dipendente, sia di proteine coinvolte nel rimodellamento e nella degradazione della matrice extracellulare, quali rispettivamente la lisil ossidasi e le metalloproteasi, sia di repressori trascrizionali, come Snail e Zeb1, implicati nella transizione epitelio-

mesenchimale (Petrella et al., 2005; Erler et al., 2006; Sullivan and Graham, 2007). Un passaggio fondamentale di quest'ultimo fenomeno sembra sia la perdita di molecole necessarie all'adesione cellula-cellula, in particolare le caderine e nello specifico della conosciuta E (epiteliale)-caderina, la cui ridotta trascrizione da parte del fattore Snail permette l'attivazione di specifiche vie di trasduzione del segnale coinvolte nell'invasività tumorale e nella formazione di metastasi (Birchmeier and Behrens, 1994; Batlle et al., 2000). La perdita dell'E-caderina è spesso accompagnata dall'espressione *de novo* dell'N-caderina. Tale fenomeno, denominato lo "switch delle caderine", sembra sostenere il passaggio da un fenotipo tumorale benigno ad uno maligno ed invasivo (Cavallaro et al., 2002). L'N-caderina si riscontra principalmente nel tessuto neuronale e nei fibroblasti ed agisce promuovendo un'adesione dinamica nel tumore, che consiste nella dissociazione delle singole cellule dalla massa cancerosa e nella loro interazione con l'endotelio e lo stroma circostante. In tal modo essa facilita il transito e la sopravvivenza delle cellule maligne in organi distanti (Li et al., 2001).

Il neuroblastoma primario, con e senza *N-MYC* amplificato, presenta una ragguardevole espressione dell'N-caderina, che si riduce però in modo considerevole quando il tumore aumenta le sue capacità metastatiche.

Infatti il neuroblastoma ad alto rischio presenta livelli di mRNA e di proteina dell'N-caderina molto più ridotti del neuroblastoma a basso rischio e questa differente espressione è significativamente correlata con l'esito sfavorevole o favorevole della patologia (Lammens et al., 2012).

Questa osservazione potrebbe sembrare paradossale, ma in realtà è conforme al ruolo biologico dell'N-caderina durante lo sviluppo embrionale neuronale, laddove la sua assenza è un pre-requisito essenziale per permettere la migrazione delle cellule della cresta neurale e contribuire alla formazione di una grande varietà di tessuti e cellule del sistema nervoso e non solo, ed il suo aumento indica la fine di questo fenomeno migratorio (Nieto, 2001; Lammens et al., 2012).

Sebbene è abbastanza evidente che l'ipossia stimoli l'invasività tumorale, in molti casi essa può influenzare il ciclo cellulare aumentando la durata della fase G_1 o inducendo l'arresto della proliferazione e l'ingresso della cellula in uno stato quiescente (Bedessem and Stéphanou, 2014).

Quest'ultima condizione permette alle cellule cancerose di fuggire dagli effetti nocivi della chemioterapia, rendendo così il tumore sempre più aggressivo (Alarcon and Jensen, 2011; Powathil et al., 2012).

La subunità HIF-1 α , stabilizzata quando l'ossigeno ha una concentrazione dell'1%, interferisce con il fattore di trascrizione MYC, impedendo la sua azione sul controllo della transizione G₁/S del ciclo cellulare, che si verifica tramite l'espressione dei geni codificanti la ciclina D2 ed E2F1 e la repressione degli inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti p21 e p27 (Dang et al., 2008; Keith et al., 2011). L'azione di HIF-1 α è molteplice; da un lato esso si lega al fattore Sp1, rimuovendo MYC dai suoi geni bersaglio, dall'altro lato interrompe rapidamente l'associazione di MYC con la proteina correlata MAX, promuovendo la degradazione di MYC stesso. Sorprendentemente invece la subunità HIF-2 α , interagendo con l'eterodimero MYC/MAX e per mezzo di meccanismi ancora non pienamente compresi, ne aumenta la funzionalità e di conseguenza la sua attività di trascrizione e repressione, permettendo una più veloce progressione del ciclo delle cellule tumorali (Gordan et al., 2007).

Nella figura 20 è illustrato il duplice comportamento di HIF-1 α ed HIF-2 α nei confronti di MYC, sopra discusso.

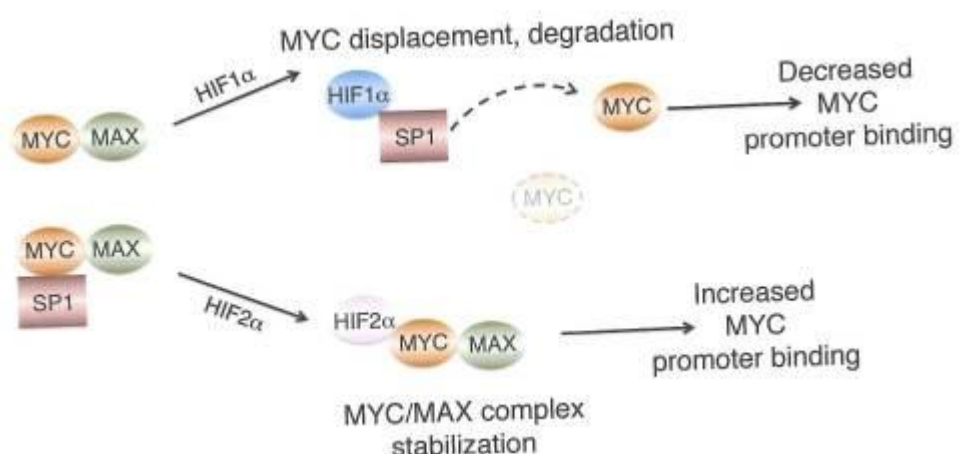


Figura 20. Differente interazione di HIF-1 α ed HIF-2 α con MYC.
(fonte: Keith et al., 2011)

Un semplice modello spiega la sequenzialità degli eventi tramite i quali le cellule tumorali smettono di proliferare ed entrano in quiescenza in condizioni di ipossia. HIF-1 α agisce, come spiegato sopra, riducendo l'espressione e quindi anche la sintesi della ciclina D.

Di conseguenza diminuisce la percentuale di proteina del retinoblastoma fosforilata e del fattore di trascrizione E2F libero. Quindi solo una piccola quantità di ciclina E è trascritta, tale da non raggiungere la concentrazione critica per far avvenire lo "switch" molecolare con il complesso SCF deputato alla sua degradazione, con il quale è in un rapporto inversamente proporzionale. Lo "switch" è un fenomeno necessario alla cellula per superare il punto di restrizione G₁/S e dividersi; pertanto se non avviene la cellula rimane intrappolata in fase G₁ ed entra in uno stato di quiescenza (Bedessem and Stéphanou, 2014).

Nel neuroblastoma ad alto rischio con N-MYC amplificato non si osserva l'arresto della proliferazione cellulare, HIF-1 α dipendente, appena descritto.

Ciò è probabilmente dovuto al fatto che la gran quantità di proteina N-MYC presente, sequestrando e legando strettamente il fattore MAX, annulla l'azione inibitrice di HIF-1 α sulla progressione del ciclo cellulare. Contrariamente, come già detto prima, HIF-1 α ed N-MYC cooperano per favorire il metabolismo glicolitico e la crescita della massa tumorale (Qing et al., 2010).

Infine l'effetto oramai più studiato ed evidenziato dell'ipossia sulle cellule di neuroblastoma è la ridotta espressione di alcuni geni marcatori della linea neuronale e neuroendocrina e l'aumento di quelli associati allo sviluppo della cresta neurale. Questi dati rendono sempre più pregnante l'idea che l'ipossia induce la dedifferenziazione cellulare, contribuendo allo sviluppo di un fenotipo simile a quello di una cellula staminale (Jögi et al., 2002).

Quindi è chiaro il decremento dei livelli di mRNA di proteine specifiche neuronali e neuroendocrine come i neurofilamenti e le cromogranine A e B anche se si osserva, come risposta generale all'ipossia, un'aumentata induzione di alcuni geni tipici del fenotipo differenziato quali, ad esempio, l'enolasi 2 (*ENO2*) e la tirosina idrossilasi (*TH*), coinvolte la prima nel metabolismo glicolitico e la seconda nella sintesi delle catecolamine (Jögi et al., 2004).

Il meccanismo molecolare proposto per il processo di dedifferenziazione delle cellule tumorali di neuroblastoma si basa sulla repressione dell'attività dei fattori di trascrizione bHLH (basic helix-loop-helix), quali HASH-1 e d-HAND che, insieme alle ubiquitarie proteine E, sempre bHLH, tra le quali soprattutto E2-2, formano degli eterodimeri funzionali per l'espressione di geni specifici del fenotipo neuronale (Persson et al., 2000; Jögi et al., 2002). Tale fenomeno è reso possibile tramite l'espressione HIF-1 dipendente della proteina inibitrice ID2, che lega E2-2 allontanandola dai fattori bHLH ed impedendo così la loro azione (Löfstedt et al., 2004).

Contemporaneamente HASH-1 è ostacolato dalla produzione di Notch e dall'attivazione della sua via di trasduzione del segnale, associata con le cellule immature e proliferanti (Axelson et al., 2005). Nello specifico Notch stesso ed i repressori trascrizionali quali HES-1 ed HEY-1, la cui espressione è la risposta alla stimolazione dei ligandi Notch, agiscono riducendo l'azione del fattore di trascrizione HASH-1 (Påhlman et al., 2004). La successiva figura 21 riassume il meccanismo appena spiegato.

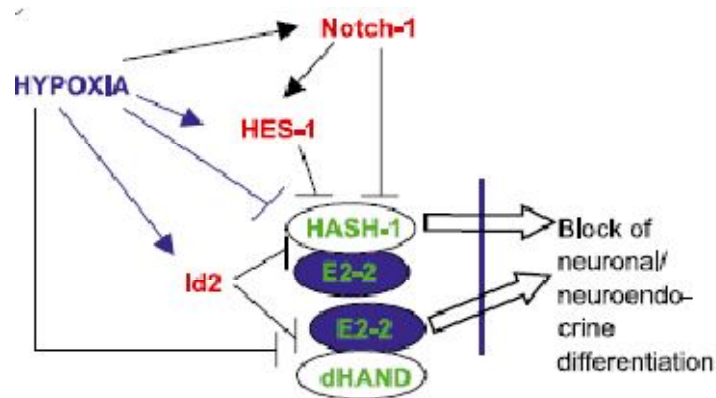


Figura 21. Modello del meccanismo molecolare che induce la dedifferenziazione delle cellule di neuroblastoma in ipossia.
(fonte: Jögi et al., 2004)

Le cellule di neuroblastoma ipossiche che assumono un fenotipo immaturo, simile a quello delle cellule della cresta neurale, sono solitamente più maligne e rappresentano una popolazione tumorale molto aggressiva (Jögi et al., 2004).

Prove sperimentali hanno messo in luce la persistenza di questo “fenotipo ipossico” per almeno 24 ore dopo riossigenazione con concentrazioni di ossigeno sia del 21% sia del 5% . Sembra che questo fenomeno sia principalmente dovuto alla subunità HIF-2 α che, a differenza di HIF-1 α , rimane stabile fino a 72h quando la percentuale dell’ossigeno ambientale arriva al 5% (Holmquist et al., 2005).

Si può così ipotizzare che HIF-2 α , più di HIF-1 α , sia necessario per determinare e mantenere lo stato dedifferenziato più aggressivo delle cellule di neuroblastoma in condizioni di prolungata ipossia. Tuttavia le cellule di neuroblastoma mostrano una notevole plasticità, riuscendo ad adattarsi facilmente alle fluttuazioni dei livelli di ossigeno ed a riassumere il fenotipo che le caratterizzava in condizioni di normossia, anche dopo un lungo periodo di ipossia (Holmquist et al., 2005).

SCOPO DELLA TESI

Sulla base delle conoscenze degli effetti dell'ipossia sul neuroblastoma, questo lavoro di ricerca si pone come obiettivo quello di evidenziare e mettere a confronto il comportamento di due linee cellulari di questo tumore solido infantile, rappresentanti rispettivamente un fenotipo più aggressivo (linea cellulare IMR-32) ed uno meno aggressivo (linea cellulare SHSY5Y) della neoplasia, dopo esposizioni ad un ambiente ipossico in due tempi, quattro ore ed un giorno intero, che mimano delle condizioni acute o prolungate della ridotta concentrazione di ossigeno per le cellule tumorali. Le due colture cellulari successivamente sono sottoposte a riossigenazione per ventiquattro ore.

Il fine è provare a caratterizzare i differenti meccanismi che regolano i processi di proliferazione e differenziazione cellulare guidati da un microambiente ipossico, rivolgendo una particolare attenzione al ciclo cellulare ed al ruolo della transglutaminasi 2 e delle sue isoforme, come risposta all'attivazione dei fattori di trascrizione indotti dall'ipossia nelle cellule tumorali.

Questi dati sperimentali aiutano a comprendere sempre meglio la biologia e la biochimica del neuroblastoma ed aumentano il bagaglio di conoscenze sull'impatto clinico dell'ipossia su tale tumore.

Infatti lavori precedenti, svolti dal nostro gruppo in collaborazione con la UOC di Chirurgia Pediatrica dell'A.O.U. Policlinico G. Martino di Messina, hanno messo in evidenza gli effetti dell'ambiente ipossico creato per esposizione ad una pressione più elevata di anidride carbonica, simulando uno pneumoperitoneo in laparoscopia, su una coltura di cellule di neuroblastoma senza amplificazione di N-MYC (Montalto et al., 2013; Currò et al., 2014). I risultati hanno dato risalto all'attività di HIF-1 α nel promuovere l'apoptosi tramite la via che coinvolge p53, enfatizzando così gli effetti citotossici esercitati dalla CO₂ sulle cellule di neuroblastoma ed indicando la chirurgia mininvasiva (MIS) come una tecnica sicura che non accresce il potenziale maligno del tumore stesso.

Alla luce di tali evidenze è opportuno caratterizzare i meccanismi biochimici osservati nelle linee cellulari più aggressive in condizioni di ipossia.

MATERIALI E METODI

1. Colture Cellulari

La parte sperimentale di questo lavoro di tesi vede come protagoniste due linee cellulari di neuroblastoma umano, le SH-SY5Y e le IMR-32, fornite da American Type Culture Collections-ATCC-Rockville, MD, USA, che si differenziano le prime per la mancanza e le seconde per la presenza del proto-oncogene *N-MYC* amplificato.

Le cellule SH-SY5Y sono un sub-clone della linea di neuroblastoma SK-N-SH, isolata nel 1970 da un sito metastatico del tumore a livello del midollo osseo (Biedler et al., 1973). Presentano una morfologia neuro-epiteliale e crescono soprattutto aderenti, formando piccoli aggregati, ed in parte minore in sospensione.

La linea delle IMR-32, costituita nel 1967 da cellule di neuroblastoma prelevate dalla massa addominale di un bimbo di 13 mesi (Tumilowicz et al., 1970), è rappresentata da due tipi cellule aderenti; la popolazione predominante sono piccole cellule di aspetto simile ai neuroblasti, la popolazione più ristretta è rappresentata da cellule somiglianti a grandi fibroblasti ialini. Durante la divisione le IMR-32 tendono a raggrupparsi o impilarsi.

Entrambe le linee cellulari, coltivate in fiaschette con un area di crescita di 25cm² nel terreno RPMI-1640, con l'aggiunta di L-glutamina (2mM), 100 unità/ml di penicillina, 100mg/ml di streptomicina e supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS), precedentemente deplementato al calore, sono mantenute a 37 °C in un incubatore umidificato con il 5% di CO₂ ed il 95% di aria.

Il terreno, gli antibiotici e la glutamina sono della ditta Sigma-Aldrich (Milano, Italia), mentre il siero fetale bovino è fornito dalla Invitrogen Life Technologies (Milano, Italia).

Il terreno RPMI modificato è rinnovato ogni due giorni e le cellule sono divise in nuove fiaschette una volta raggiunta la confluenza.

2. Esposizione delle SHSY5Y e delle IMR-32 ad ipossia

Per i trattamenti in ipossia le cellule sono seminate con una densità di 2.5×10^5 cell/ml nelle fiaschette e di 2.5×10^4 cell/pozzetto in piastre da 96 pozzetti, per gli esperimenti successivi.

Le due linee cellulari, raggiunta la sub-confluenza, sono incubate in una camera nella quale è insufflata in modo continuo dell'aria composta da 1% di O₂, 5% di CO₂ e 94% di N₂ alla pressione costante di 15mmHg (100%), per 4h in un primo trattamento e per 24h in un secondo trattamento, provando a simulare il microambiente tumorale ipossico. La camera è quindi posta in un incubatore a 37 °C, la temperatura di crescita delle cellule.

Trascorsi i tempi di esposizione all'atmosfera ipossica, una parte delle cellule sono raccolte per le analisi sperimentali, un'altra parte è incubata per altre 24 h, così da osservare il comportamento delle due linee di neuroblastoma dopo riossigenazione, e raccolta alla fine di questo tempo.

Parallelamente colture cellulari che fungono da controllo, presenti in fiaschette e piastre, sono mantenute in un termostato umidificato a 37 °C, in condizioni standard (95% di aria/5% di CO₂) ed in tempi coincidenti ai trattamenti ed alla riossigenazione.

3. Saggio di vitalità cellulare con MTT

L'effetto dell'ipossia sulla proliferazione delle SHSY5Y e delle IMR-32 è valutato innanzitutto mediante un saggio biochimico colorimetrico di vitalità cellulare.

Questo si basa sulla capacità delle cellule sane di ridurre l'anello tetrazolico di un composto, l'MTT o bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, in cristalli di formazano, un sale insolubile in acqua di colore blu-violaceo.

Tale reazione è catalizzata principalmente dalla succinato deidrogenasi mitocondriale, attiva solo nelle cellule vive.

Le cellule coltivate in piastre da 96 pozzetti sono incubate a 37 °C per 4 h con terreno fresco senza rosso fenolo contenente 0.5 mg/ml di MTT (Sigma, Milano, Italia).

Quindi i cristalli di formazano presenti sono dissolti a 37 °C per 1 h in 100 µl di una soluzione di isopropanolo acido (0.04 M HCl in isopropanolo assoluto).

La vitalità cellulare è determinata dalla variazione delle misure spettrofotometriche alla lunghezza d'onda di 570 nm, tramite un lettore di piastre (Tecan Italia, Cologno Monzese, Italia).

I risultati sono espressi come percentuale di cellule vitali, ottenuta dal rapporto tra l'assorbanza delle cellule esposte ad ipossia e quella delle cellule controllo. Tutti gli esperimenti sono compiuti in triplicato.

4. Analisi di espressione genica

4.1 Estrazione e quantificazione dell'RNA totale

Le colture cellulari seminate nelle fiaschette, terminata l'esposizione all'atmosfera ipossica e la riossigenazione, ed i rispettivi controlli, sono raccolte e, dopo un lavaggio con PBS (Sigma, Milano, Italia), pellettate a 10,000xg per 30 s in eppendorf sterili da 1,5 ml.

L'omogeneizzazione dei pellet cellulari si realizza in un adeguato volume di TRIzol, una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato fornita dalla Invitrogen Life Technologies (Milano, Italia). Questa soluzione lisa le cellule e dissolve la loro struttura, mantenendo allo stesso tempo integro l'RNA.

Segue un passaggio di purificazione dell'RNA dalle proteine tramite l'aggiunta di 0.2 ml di cloroformio per ml di TRIzol e centrifugazione a 12,000xg per 15 min a 4 °C.

Si formano così due fasi, una superiore acquosa dove si trova l'RNA, una fase organica in cui sono presenti le restanti componenti cellulari ed una interfase in cui si trova il DNA.

La precipitazione dell'RNA è ottenuta con 0.5 ml di alcool isopropilico per ml di TRIzol, miscelazione per inversione, incubazione a temperatura ambiente per 15' e centrifugazione a 12,000xg per 10 min a 4 °C. Quindi il pellet di RNA è lavato con 1 ml di alcool etilico al 70% per ml di TRIzol e concentrato a 7,500xg per 5 min a 4 °C. L'RNA, dopo rimozione del surnatante, è asciugato all'aria e risospeso in una soluzione acquosa allo 0,01% di dietil-pirocarbonato o DEPC, una sostanza che inibisce le ribonucleasi. Segue la sua dissoluzione al calore a 60°C per 10 minuti.

L'RNA di cellule trattate e controlli, dopo opportuna diluizione, è quantificato tramite lettura spettrofotometrica della sua assorbanza alla lunghezza d'onda tipica degli acidi nucleici ovvero 260 nm. Il suo grado di purezza, ottenuto dal rapporto tra i valori di assorbanza del campione a 260 nm ed a 280 nm, la lunghezza d'onda alla quale assorbono le proteine, è buono quando si mantiene nel range tra 1,8 e 2,0. Considerando che 40 µg di RNA hanno un'assorbanza a 260 nm (A_{260}) pari a 1, lo spettrofotometro calcola la relativa concentrazione di RNA di ogni campione, espressa in µg/ml, utilizzando la seguente formula: $[RNA] = A_{260} \times 40 \times \text{fattore di diluizione}$.

4.2 Retrotrascrizione

Per valutare la risposta di espressione di alcuni geni dopo un periodo di ipossia di 4 h e 24 h in Real Time PCR, l'RNA messaggero di trattati e controlli è retrotrascritto a cDNA.

Nello specifico si prelevano 2 µg di RNA da quello totale precedentemente estratto e si esegue la retrotrascrizione utilizzando l'High-Capacity cDNA Archive Kit dell'Applied Biosystems (Milano, Italia).

Per ciascun campione la miscela di reazione prevede RT buffer (1x), dNTP (1x), Random Primers (1x), RNasi OUT (0,5 U/ml) per inattivare le ribonucleasi, la trascrittasi inversa MultiScribe (2,5 U/µl) ed una soluzione acquosa di DEPC allo 0,01% aggiunta fino ad ottenere un volume finale di 20 µl.

La sintesi del cDNA avviene in un termociclatore HYBAID PCR sprint (Celbio, Milano, Italia) utilizzando un programma con il seguente profilo termico: 25°C per 10 min e 37°C per 2 ore.

4.3 Real Time PCR

La tecnica della Real Time PCR consente di misurare in tempo reale in modo accurato, sensibile e riproducibile la presenza di specifiche sequenze geniche, senza aver bisogno di fermare la reazione ed analizzare gli amplificati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio, così come accade per la PCR classica (Dale and von Schantz, 2004).

Questo è reso possibile tramite diverse procedure e le più utilizzate prevedono l'impiego di agenti intercalanti e/o di particolari sonde di ibridizzazione.

Le molecole intercalanti, come il SYBR green, si legano al DNA a doppio filamento ed emettono fluorescenza ad elevata intensità, quando opportunamente irradiate. Bisogna però tenere in considerazione che tali sostanze possono anche interporsi tra eventuali prodotti aspecifici, che potrebbero formarsi durante la reazione.

Molto più specifici sono i metodi che impiegano le sonde, come il metodo TaqMan o dell'idrolisi della sonda e quello dei molecular beacons. Nel dettaglio la sonda TaqMan è marcata all'estremità 5' con un fluoroforo, detto reporter, ed all'estremità 3' con una molecola oscurante, detta quencher. Quando la sonda ibridizza con lo stampo di DNA, la Taq polimerasi, durante ciascun ciclo di PCR, la degrada grazie alla sua attività nucleasica 5'→3'.

Ciò comporta l'allontanamento del reporter dal quencher, con conseguente aumento dell'emissione fluorescente in tutte le direzioni, captata da un appropriato sistema di rivelazione. La fluorescenza emessa è direttamente proporzionale alla quantità degli ampliconi prodotti ad ogni ciclo di PCR.

Nelle fasi iniziali della reazione a catena della polimerasi il livello di fluorescenza emessa dagli ampliconi è ancora al di sotto del "valore soglia" o "limite di rivelazione" dello strumento.

Quando l'amplificazione giunge in fase esponenziale la quantità di amplificato è sufficiente perché la sua fluorescenza sia misurabile dallo strumento, cioè ha raggiunto e superato il valore soglia. Il numero di cicli necessari per la formazione di una quantità misurabile di prodotto è detto C_T o "Threshold Cycle" (Ciclo soglia). Esso è strettamente correlato alla quantità iniziale di stampo ed è usato per calcolare i risultati sperimentali. Come è facile intuire, quantità maggiori dello stampo iniziale danno origine a valori di C_T più bassi (Dale and von Schantz, 2004).

La Real Time PCR di questo lavoro prevede l'uso dell'intercalante SYBR green per l'analisi dei livelli di mRNA del gene costitutivo della β -actina, il controllo endogeno della reazione, dei geni per le subunità alfa dei fattori indotti dall'ipossia (HIF-1 α , HIF-2 α), per il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), per le cicline (A1, B1, D1, E1) e per una delle proteina inibitrice delle Cdk che legano le cicline D (p16), per

la E-caderina e la N-caderina (CDH1, CDH2), per le molecole coinvolte nell'adesione cellulare (ICAM, VCAM), per le metalloproteasi (MMP-2, MMP-9), per le proteine della famiglia Bcl-2 (Bax, Bcl-2) e per le isoforme della transglutaminasi 2 (TG2-L, TG2-S). Per l'analisi di espressione della transglutaminasi 2 totale (TG2) è utilizzata la sonda TaqMan specifica.

Le reazioni di Real Time sono allestite in doppio per ogni campione, trattato e controllo, in piastre da 96 pozzetti in un volume di reazione di 10 µl contenenti, rispettivamente, 1x SYBR green PCR Mastermix (Invitrogen Life Technologies, Milano, Italia), 0.2 µM dei primers specifici (Sigma, Milano, Italia) e 25 ng di cDNA e, per l'analisi di TG2, 1x TaqMan Gene Expression Mastermix (Invitrogen Life Technologies, Milano, Italia), 1x sonda TaqMan di TG2 (Invitrogen Life Technologies, Milano, Italia, Hs00190278_m1) e sempre 25 ng di cDNA.

Le sequenze dei primers usati per la Real Time PCR con SYBR green sono mostrati nella successiva tabella 1.

Gene target	Primer (5'→3')	
	Forward	Reverse
β-actina	TTGTTACAGGAAGTCCCTTGCC	ATGCTATCACCTCCCCTGTGTG
HIF-1α	CGTTCCTTCGATCAGTTGTC	TCAGTGGTGGCAGTGGTAGT
HIF-2α	GCGCTAGACTCCGAGAACAT	TGGCCACTTACTACCTGACCCTT
VEGF	AGGAGGAGGGCAGAATCATCA	CTCGATTGGATGGCAGTAGCT
Ciclina A1	GCACCCTGCTCGTCACTTG	CAGCCCCCAATAAAAAGATCCA
Ciclina B1	CTGCTGCCTGGTGAAGAG	CGCCTGCCATGTTGATCT
Ciclina D1	TATTGCGCTGCTACCGTTGA	CCAATAGCAGCAAACAATGTGAAA
Ciclina E1	GGAAGAGGAAGGCAAACGTGA	TCGATTTTGGCCATTTCTTCAT
p16	ACCAGAGGCAGTAACCAT	GTAGGACCTTCGGTGACT
CDH1	TGAGTGTCCCCGGTATCTTC	CAGTATCAGCCGCTTTCAGATTTT
CDH2	AGAATCAGTGGCGGAGAT	GCAGCAACAGTAAGGACAA
ICAM	CCCATGAAACCGAACACAC	ACTCTGTTCAGTGTGGCACC
VCAM	CCGGATTGCTGCTCAGATTGGA	AGCGTGAATTGGTCCCCTCA

MMP-2	TGATCTTGACCAGAATACCATCGA	GGCTTGCGAGGGAAGAAGTT
MMP-9	CTTCCAGTACCGAGAGAAAGCC	ATGTCATAGGTCACGTAGCCCA
Bax	GGACGAACTGGACAGTAACATGG	GCAAAGTAGAAAAGGGCGACAAC
Bcl-2	ATCGCCCTGTGGATGACTGAG	CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG
TG2-S	ACCGCTGAGGAGTACGTCTG	TCAACAAATGCTCCAGGAA
TG2-L	CCTTACGGAGTCCAACCTCA	CCGTCTTCTGCTCCTCAGTC

Tabella 1. Sequenze dei primers dei geni amplificati mediante Real Time PCR con SYBR green.

L'amplificazione è condotta nello strumento 7900HT Fast Real-Time PCR con il seguente profilo termico: un ciclo a 95 °C per 10 min seguito da 50 cicli a 95 °C per 15 s e 60 °C per 1 min. Una fase di dissociazione standard (Melting Curve) è aggiunta per valutare la specificità dei primer.

I dati ottenuti sono analizzati con il software SDS 2.3 e RQ manager 1.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) tramite il metodo di quantificazione relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$. I valori dei livelli di mRNA dei trattati sono espressi come numero di volte rispetto ai controlli.

5. Analisi di espressione ed attività di specifiche proteine

5.1 Isolamento di proteine nucleari e citoplasmatiche

Per estrarre separatamente le proteine citoplasmatiche e nucleari dai pellet cellulari dei controlli e dei trattati si esegue un protocollo che prevede l'utilizzo di due tamponi di lisi.

Il primo, detto ipotonico, composto da 10 mM di HEPES a pH 7.9, 0,1 mM di EGTA, 0,1 mM di EDTA, 0,1 mM di DTT, 50 mM di sodio fluoruro, 1 mM di sodio ortovanadato, 30 mM di b-glicerofosfato, 20 mM di p-nitrofenil fosfato, 0,5 mM di fenil metil sulfonil fluoruro e 10 µg/ml di un cocktail di inibitori di proteasi, lisa le cellule rompendo le membrane citoplasmatiche. Questa azione è favorita dall'aggiunta del detergente non denaturante Nonidet P-40 (1%) ed incubazione in ghiaccio per 20 min. Le membrane citoplasmatiche sono fatte precipitare tramite centrifugazione a

2000 rpm per 2 min a 4 °C. Quindi il surnatante è sottoposto ad ulteriore centrifugata a 10000 rpm per 3 min, sempre a 4 °C, che consente di recuperare le proteine citoplasmatiche nel surnatante e far precipitare sul fondo della provetta i nuclei.

A questo punto il pellet nucleare è risospeso nel secondo tampone, detto ipertonico, composto da 20 mM di HEPES a pH 7.9, 420 mM di NaCl, 1 mM di EDTA, 1 mM di DTT, 50 mM di sodio fluoruro, 1 mM di sodio ortovanadato, 30 mM di β -glicerofosfato, 20 mM di p-nitrofenil fosfato, 0,5 mM di fenil metil sulfonil fluoruro e 10 μ g/ml di aprotinina, leupeptina e pepstatina, e capace di rompere le membrane dei nuclei. Dopo un'incubazione di 30 min in ghiaccio ed una centrifugazione a 10000 rpm per 10 minuti a 4 °C, si possono raccogliere nel surnatante le proteine nucleari.

La concentrazione sia delle proteine citoplasmatiche sia di quelle nucleari è determinata con il metodo di Bradford.

5.2 Saggio di cambiamento della mobilità elettroforetica (EMSA)

Il saggio in questione, più conosciuto col suo nome originale cioè electrophoretic mobility shift assay o EMSA, è una delle tecniche più applicate allo studio dei meccanismi di regolazione genica ed all'identificazione di eventuali interazioni tra proteine, quali i fattori di trascrizione, e DNA e tra proteine ed RNA.

L'EMSA, noto anche con i termini di gel shift, bandshift o gel di ritardo elettroforetico, si basa sul principio della minore mobilità elettroforetica dei complessi DNA-proteina rispetto al DNA libero in un gel non-denaturante di poliacrilammide.

Pertanto questo saggio è scelto soprattutto per mettere in evidenza l'attività di specifiche proteine ed in particolare i fattori di trascrizione, che riconoscono le sequenze promotrici di geni di cui permettono l'espressione.

Nel dettaglio una sequenza consenso riconosciuta dalla proteina da studiare, detta sonda, è opportunamente marcata così da evidenziare, dopo corsa elettroforetica, la probabile interazione con il fattore di trascrizione in esame.

In questo lavoro si desidera analizzare l'attivazione del fattore indotto dall'ipossia HIF-1 dopo esposizione al microambiente ipossico, rispettivamente per 4 h e per 24 h, rispetto alle cellule tumorali in condizioni di normossia.

5.2.1 Marcatura della sonda

Le sonde di HIF-1 α sono oligonucleotidi a singolo filamento privi di marcatura in direzione, rispettivamente, forward e reverse.

Quindi 300 pmoli di ciascuna filamento è marcato all'estremità 3' con la biotina tramite incubazione a 37 °C per 30 min con 0,2 U/ μ l dell'enzima Transferasi desossinucleotidil Terminale o TdT, il suo tampone di reazione 1x e la Biotina dCTP 0,5 μ M, in un volume di reazione finale di 50 μ l. Tutti i reagenti sono forniti dal kit PierceTM Biotin 3'End DNA Labeling (Thermo Fisher Scientific, USA).

La reazione è bloccata con EDTA 0,2 M ed i filamenti estratti con 50 μ l di una miscela di cloroformio:alcol isoamilico (24:1). Dopo centrifugazione ad alta velocità si recuperano nella fase superiore acquosa i filamenti biotinilati, si riuniscono nella stessa eppendorf e si favorisce l'annealing tramite incubazione a 37 °C per un'ora, consentendo la formazione della sonda di HIF-1 α marcata a doppio filamento.

5.2.2 EMSA, lavaggi e sviluppo della membrana

Volumi di proteine nucleari estratte, tali da contenerne una quantità pari a 2 μ g, sono incubati dapprima con una miscela di reazione contenente 2 μ l di Binding Buffer, 1 μ l di glicerolo, 1 μ l di MgCl₂, 1 μ l di NP-40, 1 μ l di poli (dI-dC), 1 μ l di BSA 1 μ g/ μ l per 10 min a temperatura ambiente e, successivamente, è aggiunta 1 pmole di sonda di HIF-1 α marcata per altri 30 min, sempre a temperatura ambiente. Con gli stessi reagenti si prepara il controllo interno del saggio, rappresentato dall'antigene nucleare del virus Epstein-Barr o EBNA, che è incubato con 2 μ l di una specifica sequenza di DNA biotinilata detta appunto EBNA-biotin DNA.

Una volta avvenuta la probabile formazione dei complessi DNA-proteina, le reazioni sono bloccate tramite l'aggiunta di 5 μ l di Loading Buffer.

La separazione elettroforetica dei campioni, trattati e controlli, e dell'EBNA si compie in gel di poliacrilammide al 6%, in condizioni non denaturanti, usando tampone Tris-Borato-EDTA o TBE 0,5x a 4 °C, dapprima a 70 V per 15 min e poi a 120 V per circa 2 h.

Si prosegue con il trasferimento dei complessi, campioni e controllo interno, su membrana di Nylon, applicando un voltaggio pari a 100 V per 45 min in TBE 0,5x freddo. La successiva reazione di cross-link nell'apposito strumento permette di legare stabilmente la sonda alla membrana.

Il lavaggio e lo sviluppo della membrana si eseguono utilizzando i reagenti del kit fornito dalla Thermo Fisher Scientific (USA).

Innanzitutto la membrana è bloccata versando un tampone detto blocking buffer ed agitandola lentamente per 15 min. Quindi si aggiunge la soluzione del coniugato, dato dalla streptavidina-perossidasi, diluita 1:300 con il blocking buffer stesso e si pone nuovamente in una lenta agitazione per altri 15 minuti. Seguono i lavaggi con wash buffer 1x, nello specifico uno veloce e altri quattro per 5 minuti in lieve agitazione. Infine la membrana è incubata per 5 min, sempre agitando lentamente, in substrate equilibration buffer e per 5 minuti al buio con una soluzione di luminolo, composta da 50% di luminolo e 50% di H₂O₂.

Quindi la membrana è esposta ad una lastra fotografica del tipo Kodak X-ray film, che è impressionata dal segnale luminoso emesso dai complessi DNA-proteina presenti e dal controllo interno, frutto della reazione catalizzata dalla perossidasi avendo come substrato il luminolo e l'acqua ossigenata.

Segue lo sviluppo della lastra nell'apposito liquido, Man-x Developer Fujifilm, fino alla comparsa delle bande, il fissaggio per un minuto nella sostanza M-fix Fixer Fujifilm, ed il lavaggio finale in acqua.

Le bande sono acquisite e quantificate tramite analisi densitometrica, usando ImageJ 1.47, un software open-source direttamente scaricabile dal sito internet del National Institute of Health (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

5.3 SDS-PAGE e Western Blot

L'SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) è un metodo che consiste nella separazione delle proteine tramite elettroforesi in gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato, un agente denaturante anionico che conferisce alle proteine una carica netta negativa costante per unità di massa,

consentendo così la separazione solo in base ai differenti pesi molecolari.

Segue il trasferimento delle proteine separate su una membrana di nitrocellulosa e la loro identificazione mediante incubazione con anticorpi primari, diretti verso epitopi antigenici specifici di una determinata proteina da riconoscere, ed anticorpi secondari opportunamente marcati, rivolti verso gli anticorpi primari stessi, per la rivelazione. Questa tecnica biochimica prende il nome di Western Blot o immunofissazione o immunoblot.

In questo lavoro si è valutata la presenza della transglutaminasi 2 nei campioni trattati e nei controlli, confrontandone le quantità rispetto alla β -actina, una proteina del citoscheletro molto abbondante in tutte le cellule.

Volumi di proteine citoplasmatiche precedentemente estratte, tali da contenerne una quantità tra i 40-50 μ g, sono bolliti per poco più di un minuto in un tampone, detto sample buffer, composto da 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2.5% SDS, 5% 2-mercaptoetanololo, 5% glicerolo e 0.025 mg/ml blu di bromofenolo, per permettere la denaturazione delle proteine.

La separazione elettroforetica si esegue in SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 10%, composto dallo *stacking gel* o gel di impaccamento, la parte superiore che concentra i campioni proteici caricati nei pozzetti, così che comincino la migrazione dallo stesso punto di partenza, e dal *running gel* o gel di separazione, la parte inferiore nella quale avviene l'effettiva migrazione delle proteine in base al peso molecolare, immerso nel running buffer, composto da 0.025 M Tris, 0.192 M glicina, 0.1% SDS, pH 8.3.

Il successivo trasferimento su membrane di nitrocellulosa avviene in transfer buffer, costituito da 0.05% SDS, 25 mM Tris, 192 mM glicina, e 20% v/v metanolo, pH 8.2-8.4. Tutti i siti aspecifici sono bloccati con il 5% di latte in tampone salino Tris, supplementato con Tween 20 o TBS-T, tenendo le membrane in agitazione per un'ora.

Segue l'incubazione overnight a 4°C, in agitazione, con anticorpi monoclonali di topo rivolti verso TG2 e β -actina, diluiti rispettivamente 1:1000 ed 1:5000 in latte al 5% in TBS-T.

Si procede con tre lavaggi da 5 min delle membrane in TBS-T ed incubazione per 2 h

a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari anti-IgG di TG2 e β -actina di topo, coniugati con perossidasi di rafano (HRP), diluiti rispettivamente 1:2500 e 1:15000 in TBS-T. Tutti gli anticorpi primari e secondari sono forniti dalla Sigma (Milano, Italia). La reazione di riconoscimento tra l'anticorpo primario ed il secondario è rivelata mediante chemiluminescenza, aggiungendo acqua ossigenata e luminolo forniti dal kit ECL Plus (GE Healthcare Life Sciences, Milano, Italia) ed i segnali emessi hanno impressionato lastre fotografiche Kodak.

Le bande proteiche visibili di TG2 e β -actina sono acquisite e poi quantificate tramite analisi densitometrica con il sistema AlphaImager 1200 (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA).

6. Analisi del ciclo cellulare tramite citofluorimetria a flusso

La citofluorimetria a flusso consente l'analisi automatica di sospensioni cellulari monodisperse, misurandone le caratteristiche fisiche e/o biochimiche all'interno di un flusso laminare che interseca una sorgente di eccitazione.

Tramite questa tecnica, dopo opportuna marcatura con fluorocromi del DNA delle cellule tumorali, si può risalire sia alla distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare sia all'eventuale presenza di anomalie del contenuto di DNA.

Le colture cellulari di entrambe le linee, seminate nelle fiaschette alla densità di 2.5×10^5 cell/ml, prima dell'esposizione ad un ambiente ipossico per 24 h sono incubate con RPMI contenente lo 0,5% di FBS per un giorno intero e poi fatte riprendere, aggiungendo siero fino al 10%, poco prima del trattamento. Tale condizione, detta "starvation", permette di assicurarsi che tutte le cellule in coltura siano nella stessa fase del ciclo cellulare, che coincide con quella G_0/G_1 a causa della voluta carenza dei fattori di crescita.

Quindi un milione di cellule, sia trattati sia controlli, sono fissate in 2 ml di etanolo freddo al 70% e conservate a 4°C fino al momento dell'analisi in citofluorimetria.

Prima della colorazione dei nuclei e quindi del DNA delle cellule, si allontana l'etanolo con una centrifugazione a 300xg per 5 min e si lavano i pellet cellulari con 10 ml di PBS. Contemporaneamente si prepara una sospensione cellulare controllo,

costituita da un milione di cellule mononucleari del sangue periferico o PBMCs.

Si procede con vari passaggi che mirano a dissolvere i lipidi delle membrane cellulari, le proteine del citoscheletro e nucleari, degradare l'RNA e stabilizzare il DNA.

Innanzitutto si incubano i pellet cellulari di trattati, controlli e PBMCs per 10 min a temperatura ambiente con 250 µl di una soluzione contenente tripsina in un tampone costituito da spermina tetraidrocloruro, al fine di digerire le membrane ed il citoscheletro delle cellule. Quindi si aggiungono 200 µl di una seconda soluzione, composta da un inibitore della tripsina e dalla ribonucleasi A, per digerire l'RNA, in un tampone stabilizzato dal citrato sempre con spermina tetraidrocloruro, la quale ha la funzione di rendere stabile la cromatina nucleare. L'incubazione con questa soluzione è pure di 10 min a temperatura ambiente.

Segue la colorazione dei nuclei, contenenti il DNA, ormai isolati, con il Propidio ioduro (PI) usando 200 µl di una soluzione di colorazione fredda, costituita da PI e spermina tetraidrocloruro in un tampone stabilizzato dal citrato, ed incubando al buio per 10 min a 4°C.

Tutti i campioni sono poi depurati attraverso il passaggio in un filtro di nylon da 30 µm (Filcon Cup-type, BD Biosciences, CA, USA), lasciati riposare per 30 min ed incubati a 4°C al buio, prima dell'analisi citofluorimetrica.

I reagenti usati sono del BD Cycletest™ Plus DNA Kit (BD Biosciences, CA, USA).

L'analisi in citofluorimetria è eseguita con lo strumento BD FACSCanto II (BD Biosciences, CA, USA).

Si acquisiscono almeno 30000 eventi, pari allo stesso numero di nuclei, ad una velocità bassa per non alterarne la forma e consentire una lettura più precisa.

I nuclei marcati con Propidio ioduro emettono una luce fluorescente ad una lunghezza d'onda compresa tra 580 e 650 nm e si visualizzano in un citogramma, che ne evidenzia l'area e la larghezza.

Contemporaneamente nel citogramma si notano e si escludono, rispettivamente, in alto le cosiddette doppiette e triplete, ovvero doppi o tripli nuclei aggregati rivelati lungo il passaggio del flusso, ed in basso gli scarti cellulari o debris, rappresentati da frammenti di membrana citoplasmatica e parti di contenuto cellulare.

In un altro grafico, detto istogramma, si evidenzia il contenuto del DNA dei campioni,

che permette di distinguere la distribuzione delle cellule tumorali nelle fasi G_0/G_1 , S e G_2 più M del ciclo cellulare.

Dall'analisi degli istogrammi si ricavano la misura del DNA index ovvero della ploidia, data dal rapporto tra il contenuto medio di DNA G_0/G_1 della popolazione tumorale e quello dello standard delle cellule PBMCs diploidi, e le percentuali delle diverse fasi del ciclo cellulare.

Quando il DNA index è pari a uno la cellula è diploide, quando invece il suo valore è diverso da uno il corredo cromosomico cellulare si definisce aneuploide.

Durante la nostra analisi è risultato che sia le SHSY5Y sia le IMR-32 sono aneuploidi e, nello specifico, tetraploidi.

Le figure 22 (A e B) e 23 (A e B) mostrano i citogrammi e gli istogrammi delle linee cellulari SHSY5Y ed IMR-32 mantenute in termostato a 37 °C per 24 h in normossia.

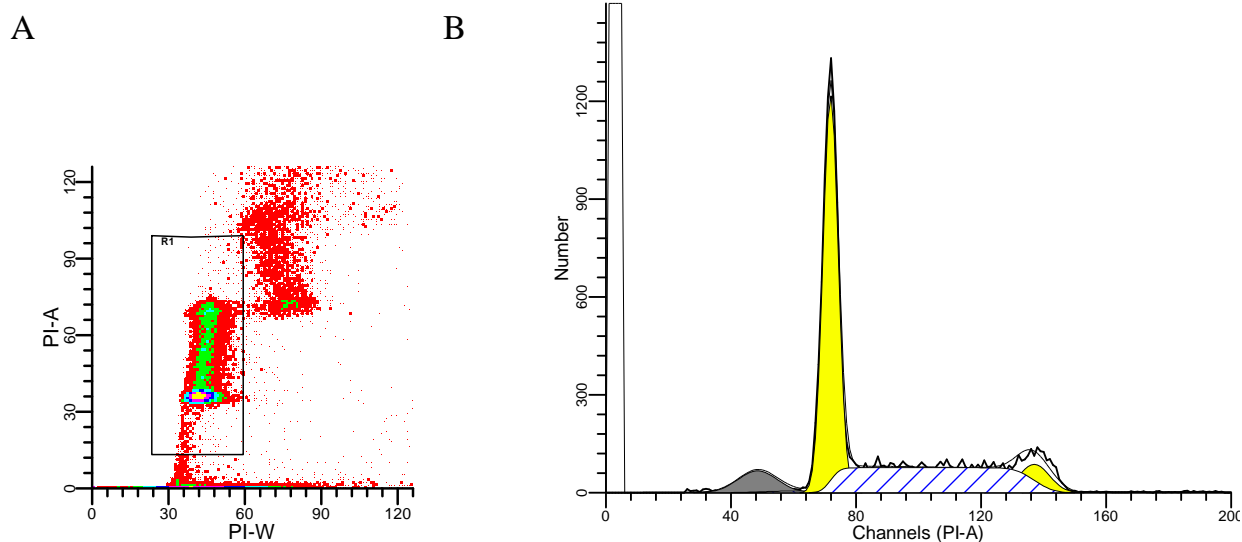


Figura 22. A) Citogramma ctrl 24 h SHSY5Y, nel rettangolo sono evidenziati i nuclei delle cellule; B) Istogramma ctrl 24 SHSY5Y, dove i picchi rappresentano la distribuzione del contenuto di DNA nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Il picco più alto e stretto è la fase G_0/G_1 ; la regione più lunga e stretta è la fase S, dove il DNA raddoppia; il picco più estremo e basso è la fase $G_2 + M$.

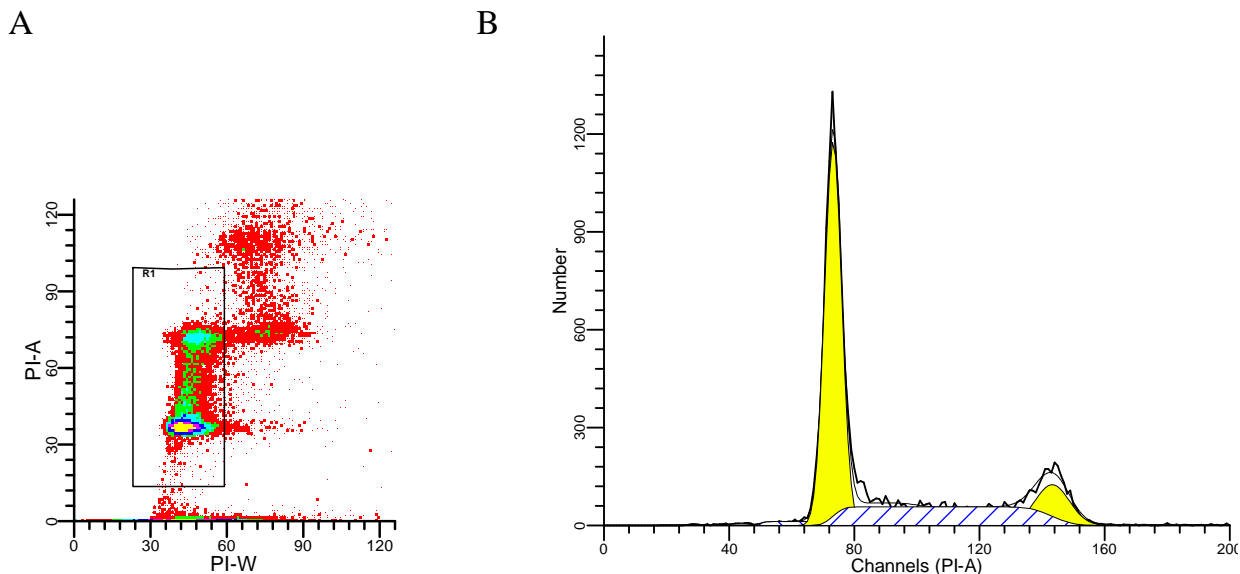


Figura 23. A) Citogramma ctrl 24 h IMR-32, B) Istogramma ctrl 24 IMR-32, dove i picchi rappresentano la distribuzione del contenuto di DNA nelle diverse fasi del ciclo cellulare.

L'analisi del ciclo cellulare tramite citofluorimetria a flusso è svolta nel laboratorio del Dipartimento di Patologia umana dell'adulto e dell'età evolutiva "Gaetano Barresi", grazie alla preziosa collaborazione del Prof. Gregorio Costa.

7. Elettroforesi su gel a singola cellula (SCGE) o Comet assay

Il saggio della cometa, noto anche come elettroforesi su gel a singola cellula, è un test che permette di valutare l'entità dei danni al DNA in cellule immerse in un gel d'agarosio, spottate in un vetrino da microscopio, trattate con detergenti per lisare le membrane cellulari e sottoposte ad elettroforesi (Di Pietro et al., 2008).

La visualizzazione del DNA avviene dopo colorazione con una sostanza intercalante fluorescente, solitamente il bromuro d'etidio, e l'analisi dei nuclei si effettua al microscopio a fluorescenza.

I nuclei che non presentano danni sono rotondi ed omogenei. Invece i frammenti di DNA danneggiato migrano verso l'anodo formando una struttura allungata e disomogenea, come la coda di una cometa, la cui lunghezza ed intensità di fluorescenza sono direttamente proporzionali al danno subito dalla cellula.

Dopo esposizione per 24 h ad un microambiente ipossico e riossigenazione, si

raccogliono e si contano circa 60000 cellule di neuroblastoma di entrambe le linee cellulari, sia controlli sia trattati, e si immergono in 150 μ l di agarosio a basso punto di fusione o low melting agar (0,7%). Quindi si versano 50 μ l di questa soluzione in un vetrino da microscopio e per ogni campione si prevedono tre spot, così da rendere l'analisi statisticamente più significativa. Dopo un'incubazione a 4 °C per 10 min, si aggiungono altri 50 μ l di agarosio su ciascun spot, in modo da incastonare le cellule fra due strati di gel.

La lisi delle cellule si compie immergendo i vetrini a 4 °C per alcune ore in una soluzione detta lysis buffer, composta da 2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA , 10 mM Tris, 1% Triton X-100 e 10% DMSO. Quindi si procede con la denaturazione del DNA tramite due bagni dei vetrini, da 10 min ciascuno, in una soluzione alcalina costituita da 300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13, detta running buffer.

Segue l'elettroforesi dei vetrini per 30 minuti in condizioni alcaline a 300 mA e 25 V (~ 0,86 V/cm) ed un successivo lavaggio con 0,4 M Tris a pH 7,5 o neutralization buffer.

La colorazione si realizza con 20 μ g/ml di bromuro di etidio e l'esame dei vetrini si esegue con un microscopio a fluorescenza ad un ingrandimento di 400x (Leica Microsystem, Heidelberg, Mannheim, Germania), dotato di una fotocamera digitale (Canon Power Shot S50, Milano, Italia).

Si acquisiscono una media di 50 cellule a vetrino, per un totale di circa 150 cellule a campione. Le immagini ottenute sono analizzate tramite il software CASP (Comet Assay Software Project).

I parametri valutati per ogni cometa sono la percentuale di DNA nella testa (% H-DNA) e nella coda (% T-DNA) e la lunghezza delle comete ovvero delle cellule (comet length).

8. Analisi statistica

Tutti gli esperimenti si eseguono in doppio e si ripetono almeno tre volte.

I dati ottenuti si esprimono come media \pm errore standard della media (SEM) e si analizzano statisticamente con il test t di Student, per il confronto fra due gruppi, e tramite il test della varianza one-way ANOVA, seguito dal test Bonferroni di comparazione multipla, utilizzando il software GraphPad Prism 5.00 (San Diego, CA, USA). Le differenze si considerano significative per valori di p inferiori a 0,05.

I risultati del Comet assay, non presentando una distribuzione normale, si descrivono utilizzando i valori delle mediane e del 25th e 75th percentile e l'analisi delle variabili indipendenti è svolta con il test non parametrico di Mann-Whitney.

RISULTATI E DISCUSSIONE

1. VALUTAZIONE E CONFRONTO DELLA RISPOSTA DELLE SHSY5Y ALL'ESPOSIZIONE AD UN MICROAMBIENTE IPOSSICO IN DUE TEMPI DIVERSI

L'ipossia, che colpisce i tumori solidi come il neuroblastoma con una frequenza intermittente e talvolta costante, risulta essere solitamente un fattore in grado di stimolare la crescita delle cellule tumorali e la loro capacità metastatica (Hockel and Vaupel, 2001; Greijer and van der Wall, 2004).

Pertanto in questo lavoro di ricerca il primo effetto osservato è la vitalità delle linee cellulari SHSY5Y ed IMR-32, esaminate come modelli di neuroblastoma meno aggressivo e più aggressivo, dopo trattamento in condizioni ipossiche.

La coltura cellulare di neuroblastoma SHSY5Y, che rappresenta il fenotipo più docile del tumore a causa della mancata amplificazione del proto-oncogene *N-MYC*, è esposta ad un'atmosfera ipossica, caratterizzata da una concentrazione dell'1% di O₂, dapprima per 4 ore ed, in un secondo esperimento, per 24 ore.

Un periodo di riossigenazione di ulteriori 24 ore in termostato umidificato a 37 °C, con il 5% di CO₂ ed il 95% di aria, segue entrambi i trattamenti.

La risposta proliferativa delle SHSY5Y in questi due diversi tempi di ipossia è differente.

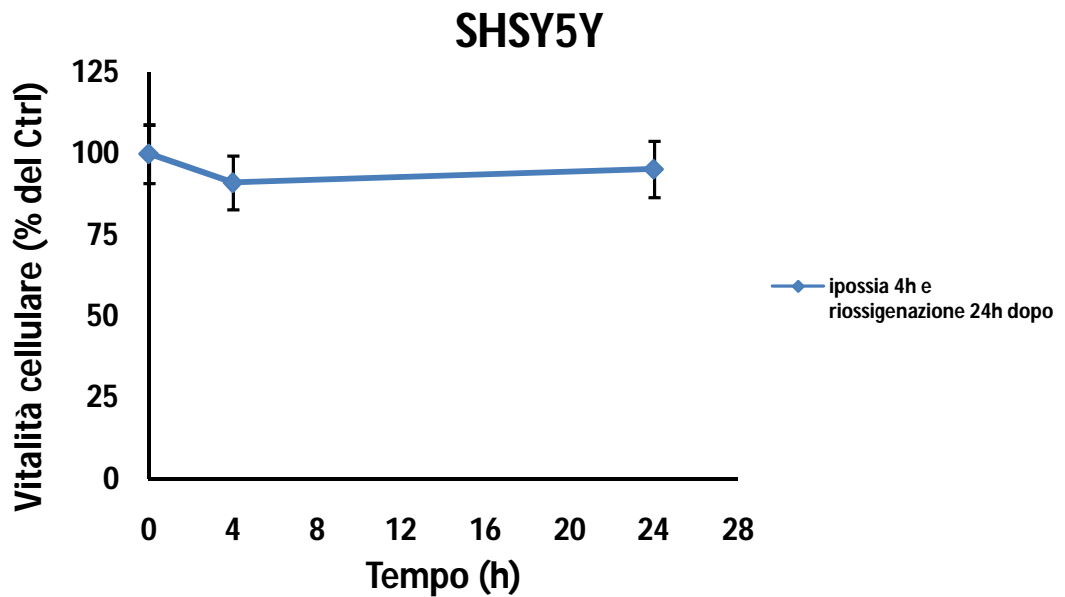
Dopo uno stimolo ipossico acuto, corrispondente a 4 h, le cellule presentano una vitalità del 91,2%, che arriva al 95,3% durante la riossigenazione, così da sembrare quasi invariata rispetto alle stesse cellule tumorali usate come controllo.

Invece alla fine del trattamento ipossico per 24 h si nota una riduzione significativa della vitalità cellulare (69,5%), se paragonate al controllo, ed una ripresa più lenta delle SHSY5Y (77,1%), una volta ristabilito un microambiente con una pressione atmosferica dell'ossigeno normale.

I risultati appena descritti dei test MTT sulle cellule SHSY5Y si mostrano nei grafici

della figura 24 (A e B).

A



B

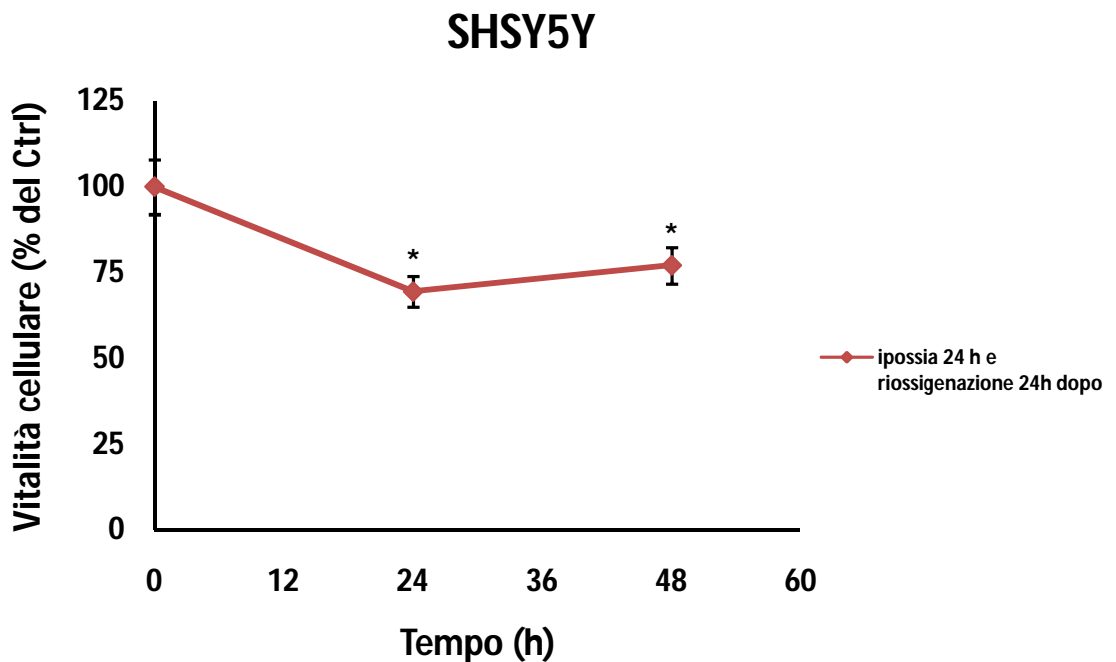


Figura 24. A) Vitalità cellule SHSY5Y dopo 4 h di esposizione ad un microambiente ipossico. B) Vitalità cellule SHSY5Y dopo un trattamento di 24 h in ipossia. * $p < 0.05$ differenza significativa rispetto alle cellule controllo. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.

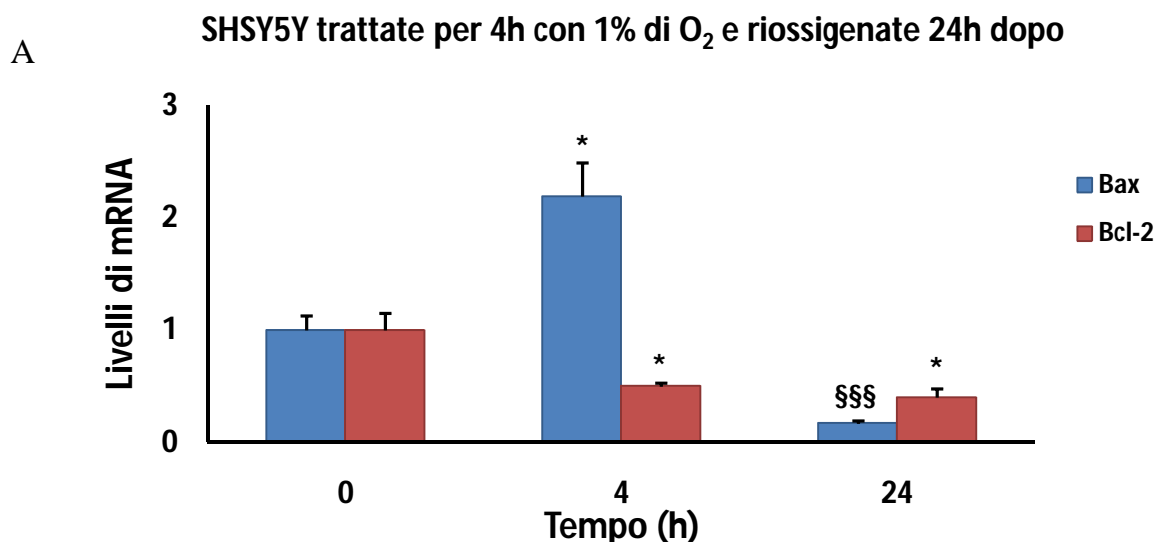
E' noto che l'ipossia può indurre la morte cellulare comunemente tramite apoptosi. Infatti la carenza di ossigeno causa l'inibizione del trasporto di protoni ed elettroni

lungo la catena respiratoria della membrana mitocondriale interna, causando un decremento del potenziale transmembrana e la riduzione della produzione di ATP. Questi fenomeni attivano le proteine pro-apoptotiche Bax o Bak che, grazie all'aumentata permeabilità delle membrane mitocondriali, permettono il rilascio del citocromo C nel citosol ed innescano così la cascata apoptotica (Saikumar et al., 1998; Wei et al., 2001; Greijer and van der Wall, 2004). Inoltre la generazione delle specie reattive dell'ossigeno o ROS contribuisce ad aumentare l'apoptosi scatenata dall'ipossia (Greijer and van der Wall, 2004).

Quindi si ritiene indispensabile valutare la risposta delle proteine pro- ed anti-apoptotiche Bax e Bcl2 nella linea cellulare delle SHSY5Y, dopo i due diversi tempi di ipossia.

Sorprendentemente il livello di espressione dell'RNA messaggero di Bax aumenta di due volte rispetto al controllo dopo 4 h di trattamento e diminuisce vertiginosamente dopo riossigenazione, se paragonato alle cellule in condizioni di scarso apporto di ossigeno. Invece al termine dello stimolo ipossico giornaliero l'mRNA di Bax si riduce in confronto al suo controllo e la sua quantità si affievolisce sempre più dopo ulteriori 24 ore di normossia. In entrambi i tempi la trascrizione del fattore anti-apoptotico Bcl2 è ridotta in modo rilevante se paragonata ai controlli ed abbastanza invariata tra cellule trattate e riossigenate.

Nella figura 25 (A e B) si mostrano i grafici dei livelli di espressione degli mRNA di Bax e Bcl2 delle SHSY5Y, dopo esposizione all'1% di ossigeno per 4 h e 24 h.



B

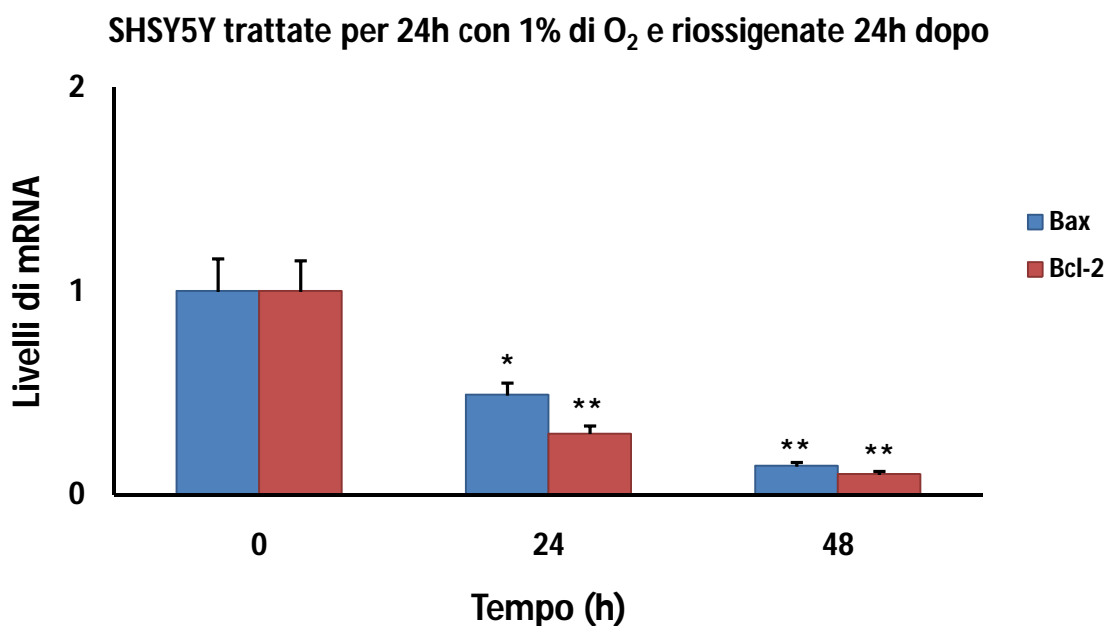


Figura 25. A) Livelli di mRNA di Bax e Bcl2 delle SHSY5Y dopo 4 h di stimolo ipossico. B) Livelli di mRNA di Bax e Bcl2 delle SHSY5Y dopo 24 h di ipossia.* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ differenze significative rispetto alle cellule controllo; $^{*}p < 0.001$ differenza significativa rispetto alle cellule trattate. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.**

L'inatteso aumento di espressione dell'RNA messaggero di Bax non si accorda apparentemente con la buona vitalità delle SHSY5Y dopo esposizione per 4 h al microambiente ipossico. Tuttavia questa risposta cellulare, anche se non ha un riscontro formale visibile, riflette l'avvio di cambiamenti del proteoma solitamente indotti da stimoli ipossici acuti, che possono favorire l'arresto del ciclo cellulare, la differenziazione delle cellule, l'apoptosi e la necrosi. Tali fenomeni motivano la ritardata proliferazione cellulare in grandi masse tumorali (Vaupel and Mayer, 2007). Questa spiegazione è anche avvalorata dai risultati ottenuti da lavori del nostro gruppo di ricerca in cui le SHSY5Y sono esposte per 4 h a CO₂ e poi incubate in condizioni normali per altre 24 h. Il microambiente ipossico causato dall'insufflazione dell'anidride carbonica induce un'alterazione dello stato redox delle cellule, come conseguenza dell'aumento di produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), che persistono nelle 24 h successive al trattamento.

Si osserva contemporaneamente l'attivazione della subunità HIF-1 α del fattore 1 indotto dall'ipossia e la sovraespressione della proteina p53, stabilizzata dallo stesso

HIF-1 α , il cui accumulo nel compartimento nucleare riflette la presenza di un danno considerevole al DNA, causato anche dalle stesse ROS. Quindi la proteina p53 rapidamente induce l'espressione di geni pro-apoptotici come Bax, che promuovono il rilascio del citocromo C dai mitocondri, scatenando la morte cellulare per apoptosi (Alberts et al., 2004; Tian et al., 2012; Montalto et al., 2013; Currò et al., 2014).

Contrariamente la riduzione dell'mRNA di Bax dopo 24 h di ipossia e la mortalità cellulare osservata possono essere dovute all'innescamento di una via apoptotica alternativa a quella classica mitocondriale, scatenata dalla formazione delle ROS e già studiata nel neuroblastoma (Morishima et al., 2002).

In tal caso l'inziatore della cascata delle proteasi, la caspasi 9, è convertito alla forma attiva dalle caspasi 3 e 12 senza il coinvolgimento del citocromo C, ed è solo dopo questo fenomeno che aumenta la permeabilità delle membrane mitocondriali che induce l'attivazione del fattore Apaf-1 (Morishima et al., 2002; Kim and Park, 2003).

Tramite il saggio della cometa o comet assay si conferma la presenza di un accumulo di danno al DNA dopo 24 h di ipossia, rispetto alle cellule di neuroblastoma SHSY5Y in condizioni standard. La genotossicità da carenza di ossigeno è causata non solo dalla formazione delle ROS ma anche dalla scarsa abilità che le cellule ipossiche presentano nel recuperare il DNA danneggiato, spiegata dalla trascurabile attività dei meccanismi di riparazione di questo acido nucleico (Bindra et al., 2008).

La figura 26 (A e B) mostra l'analisi fotografica al microscopio a fluorescenza delle cellule SHSY5Y controllo e dopo 24 h di ipossia. La figura 27 (A, B e C) rappresenta i grafici delle percentuali di DNA nella testa e nella coda delle "comete", ovvero delle cellule, e della loro lunghezza.

Il danno del DNA si presenta come una scia frammentata che, migrando durante la corsa elettroforetica, rende la cellula somigliante ad una stella cometa, la cui lunghezza è correlata all'estensione del danneggiamento del DNA stesso.

Di conseguenza le percentuali di DNA nella testa e nella coda delle comete sono rispettivamente le prime inversamente proporzionali e le seconde direttamente proporzionali al deterioramento di questo acido nucleico.

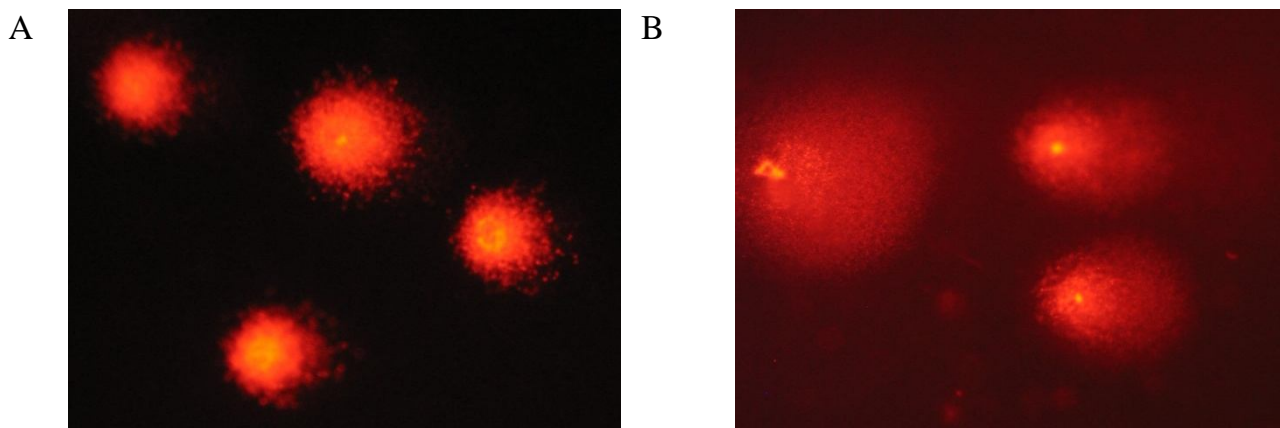


Figura 26. A) Fotografia a microscopio a fluorescenza del comet assay di cellule SHSY5Y dopo 24 h in termostato a 37 °C in normossia. B) Fotografia a microscopio a fluorescenza del comet assay di cellule SHSY5Y trattate per 24 h con l' 1% di ossigeno.

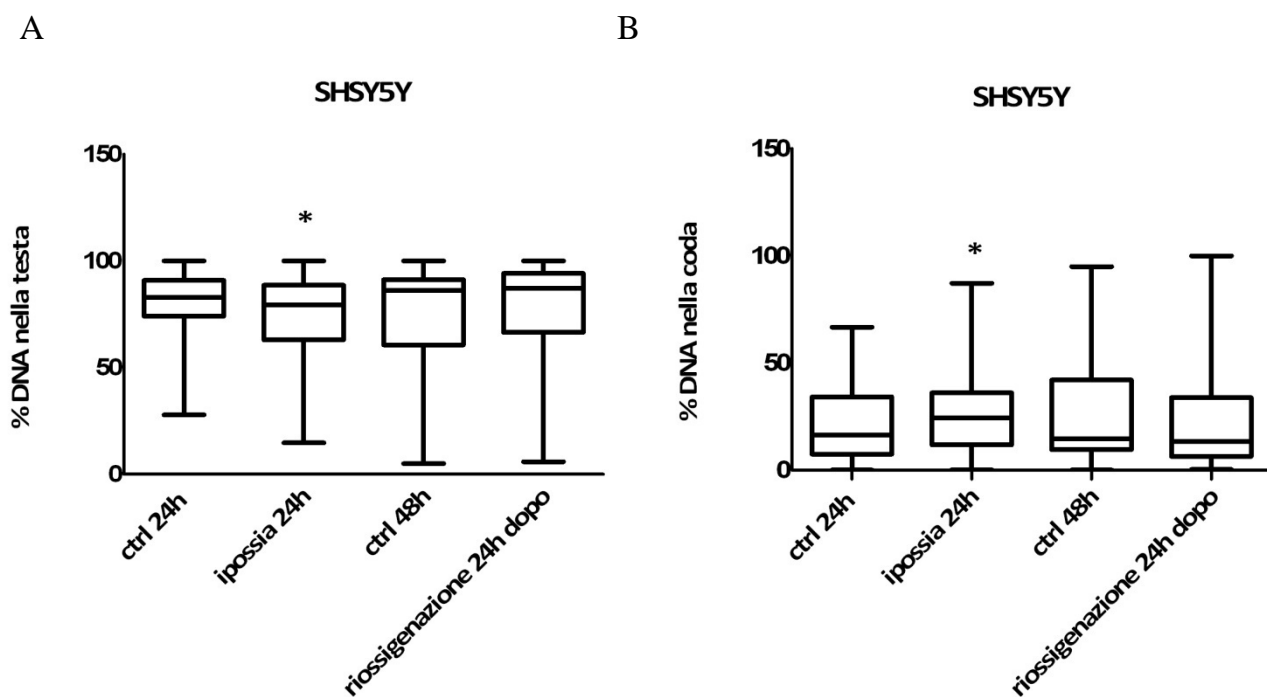


Figura 27. A) Analisi comet assay della percentuale di DNA nella testa delle cellule SHSY5Y controllo, esposte per 24 ad ipossia e riossigenate per altre 24 h.

B) Analisi comet assay della percentuale di DNA nella coda delle cellule SHSY5Y controllo, esposte per 24 ad ipossia e riossigenate per altre 24 h. * $p < 0.05$ differenza significativa rispetto alle cellule controllo. Le analisi dei parametri di percentuale di DNA della testa e della coda delle cellule sono state svolte con il software CASP. Le analisi statistiche sono state eseguite mediante il test non parametrico di Mann-Whitney.

C

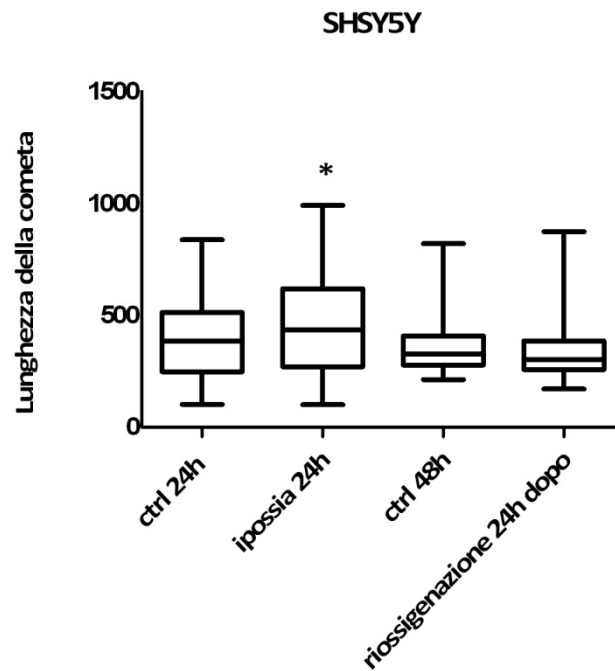


Figura 27. C) Analisi comet assay della lunghezza delle comete ovvero delle cellule SHSY5Y controllo, esposte per 24 ad ipossia e riossigenate per altre 24 h. * $p < 0.05$ differenza significativa rispetto alle cellule controllo. L'analisi del parametro lunghezza delle comete è stata svolta con il software CASP. L'analisi statistica è stata eseguita mediante il test non parametrico di Mann-Whitney.

L'adattamento delle cellule tumorali alle condizioni ipossiche è reso possibile dalla stabilizzazione ed attività dei fattori di trascrizione indotti dall'ipossia HIFs, responsabili dell'espressione di geni coinvolti in funzioni necessarie per la sopravvivenza cellulare e che possono anche aumentare le capacità metastatiche del cancro (Rankin and Giaccia, 2008).

Le subunità HIF-1 α ed HIF-2 α , con attività non sempre sovrapponibili, si distribuiscono variamente nei tessuti. In particolare HIF-2 α si trova preferenzialmente nei tumori di origine neuronale soprattutto rappresentati da cellule con caratteristiche di cellule staminali (Seidel et al., 2010).

Pertanto si esamina la risposta di entrambe le subunità, dopo i due differenti trattamenti ipossici a 4h ed a 24 h e, in contemporanea, si osserva il comportamento di uno dei primi geni coinvolti nella risposta all'ipossia ovvero il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), essenziale nell'angiogenesi.

Nella linea di neuroblastoma SHSY5Y, tramite saggio EMSA, si osserva un aumento progressivo della stabilità e dell'attivazione della subunità HIF-1 α nei due tempi di ipossia. Infatti la sua densità proteica, mostrata nell'immagine della figura 28, è tre volte e quattro volte maggiore di quella presente nelle stesse cellule in normossia o controllo, rispettivamente dopo 4 h e 24 h di ipossia.

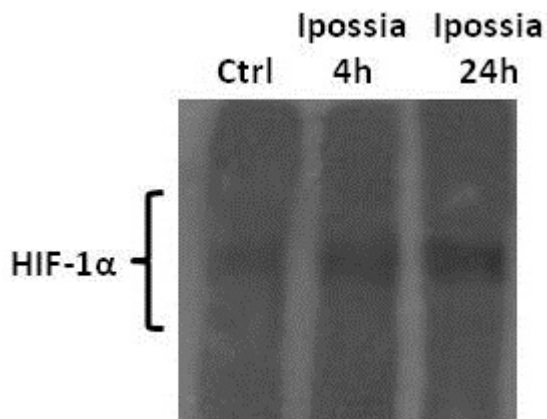


Figura 28. Saggio EMSA per evidenziare l'attivazione di HIF-1 α nella linea cellulare SHSY5Y controllo e trattata in ipossia per 4h e 24 h.

Questo andamento è perfettamente in accordo con il controllo post-traduzionale di HIF-1 α , così come di tutte le subunità alfa dei fattori indotti dall'ipossia, ad opera degli enzimi prolil-idrossilasi (PDHs) che ne inducono la degradazione per mezzo del complesso proteico di von Hippel Lindau (Ivan et al., 2001).

Si prosegue studiando la regolazione trascrizionale delle subunità HIF-1 α ed HIF-2 α , valutando l'espressione degli RNA messaggeri.

La trascrizione di HIF-1 α ed HIF-2 α delle SHSY5Y, dopo i due tempi di esposizione al microambiente ipossico, aumenta considerevolmente rispetto alle stesse cellule tumorali controllo in normossia, ma il loro comportamento è differente.

Infatti mentre il livello dell'mRNA di HIF-1 α rimane praticamente invariato tra le 4 h e le 24 h o al massimo presenta un impercettibile decremento (4,56 volte versus 3,76), l'mRNA di HIF-2 α aumenta di circa cinque volte dopo 24 h in confronto alle 4 h di ipossia (5,03 versus 3,48).

Inoltre la trascrizione del VEGF cresce in modo considerevole durante il trattamento giornaliero con l'1% di ossigeno rispetto a quello acuto di quattro ore (18,38 versus

3,22). In tutti i casi le cellule di neuroblastoma SHSY5Y riossigenate per altre 24 h mostrano una significativa riduzione di entrambe le subunità HIF- α e del VEGF, se messe a confronto con le cellule in condizioni ipossiche. I risultati si mostrano nei grafici della figura 29 (A e B).

A

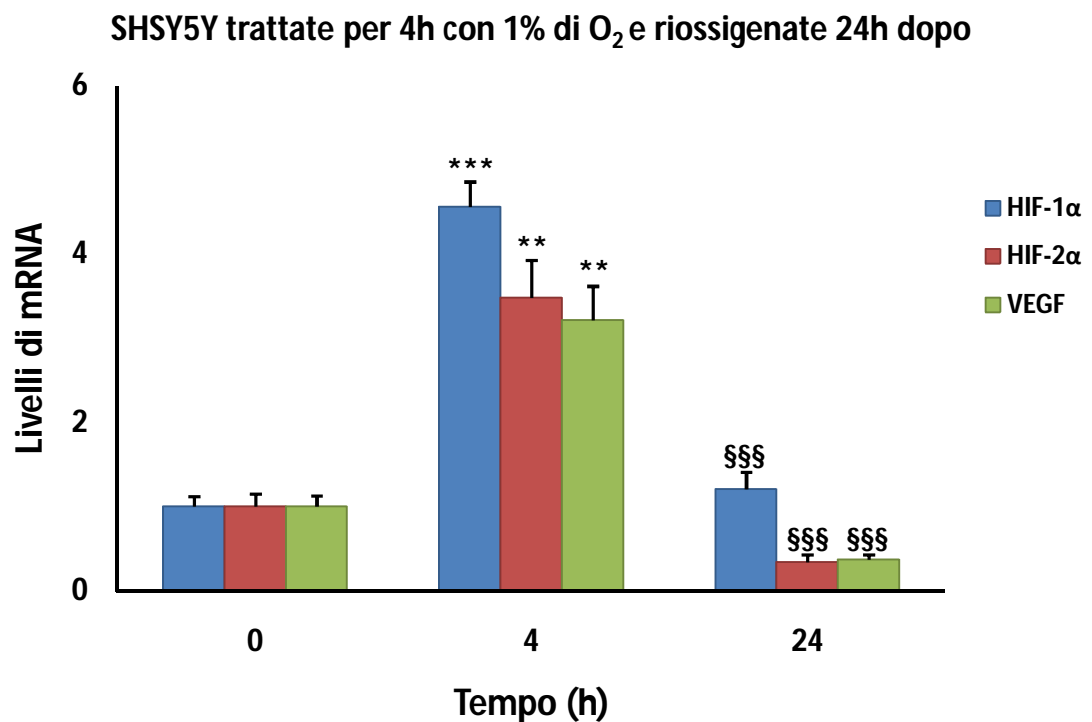


Figura 29. A) Livelli di mRNA di HIF-1 α , HIF-2 α e VEGF delle SHSY5Y dopo 4 h di ipossia. ** p <0.01, * p <0.001 differenze significative dei trattati rispetto alle cellule controllo; §§§ p <0.001 differenza significativa delle cellule riossigenate in confronto a quelle ipossiche. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.**

B

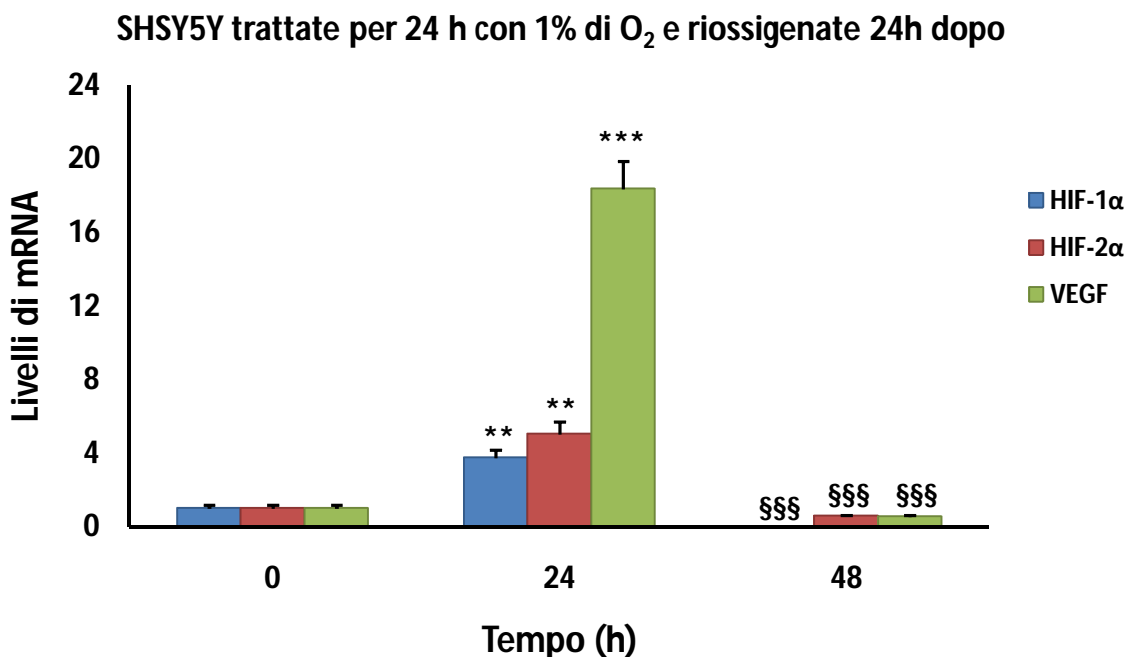


Figura 29. B) Livelli di mRNA di HIF-1 α , HIF-2 α e VEGF delle SHSY5Y dopo 24 h di ipossia. ** p <0.01, * p <0.001 differenze significative dei trattati rispetto al controllo; \$\$\$ p <0.001 differenza significativa delle cellule riossigenate in confronto a quelle in condizioni ipossiche. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.**

Le osservazioni constatate sul diverso ruolo trascrizionale dei geni delle due subunità HIF- α nelle cellule di neuroblastoma SHSY5Y sono in linea con quanto riportato nel lavoro di Lin e collaboratori (Lin et al., 2011). Queste considerazioni suggeriscono che la regolazione della trascrizione mediata dall'ipossia di HIF-1 α ed HIF-2 α è probabilmente dovuta a modifiche nelle cromatina delle regioni promotrici ed enhancer dei rispettivi geni. In particolare esperimenti hanno stabilito che cambiamenti nell'acetilazione degli istoni H3 ed H4, ovvero una diminuzione ed un aumento in prossimità dei siti di inizio della trascrizione rispettivamente di HIF-1 α ed HIF-2 α , sono la causa presumibile dei differenti livelli di espressione di entrambi in risposta a stimoli ipossici acuti e prolungati nelle cellule di neuroblastoma (Lin et al., 2011).

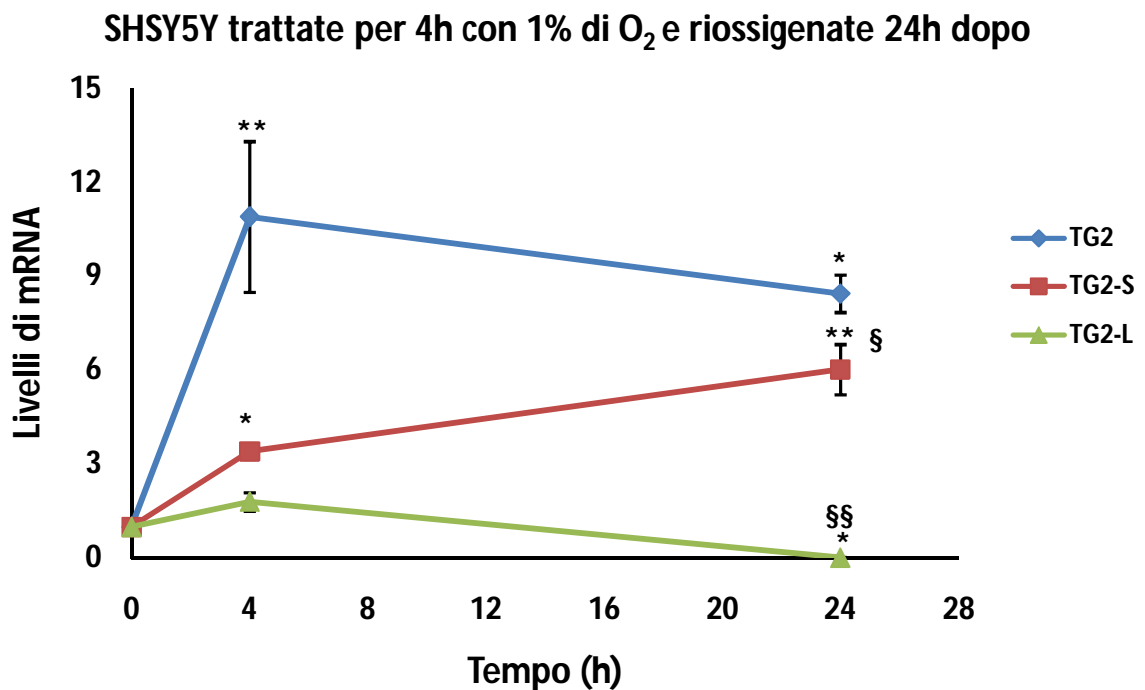
L'affascinante scoperta di una sequenza HRE nel gene codificante la transglutaminasi 2, riconosciuta dal fattore HIF-1, ci permette di studiare l'espressione di questa

proteina dalle molteplici funzioni e delle sue isoforme, ovvero la forma corta TG2-S e quella lunga TG2-L, in risposta allo stimolo ipossico.

Nella coltura di neuroblastoma SHSY5Y l'espressione della transglutaminasi 2 totale (TG2-T), data dalla somma delle sue isoforme, aumenta in modo ragguardevole trascorse le 4 h di trattamento delle cellule in un microambiente ipossico e nello specifico è 10,89 volte di più rispetto al controllo cellulare. A sua volta tramite il saggio di Western Blot si osserva un incremento nel tempo della proteina della transglutaminasi 2, ovvero dopo il trattamento in ipossia e la ripresa per ulteriori 24 h. In particolare la componente predominante della TG2-T o semplicemente TG2, è la TG2-S, il cui mRNA delle cellule in ipossia è 3,41 volte maggiore di quelle in normossia fino ad essere curiosamente poco meno del doppio (6,02) dopo le 24 h di riossigenazione. Invece TG2-L rimane pressoché invariata nelle SHSY5Y in ipossia per 4 h rispetto al controllo, per poi ridursi drasticamente dopo la nuova esposizione delle cellule in condizioni di pressione dell'ossigeno ambientale.

I dati appena descritti si riportano nei grafici della figura 30 (A e B).

A



B

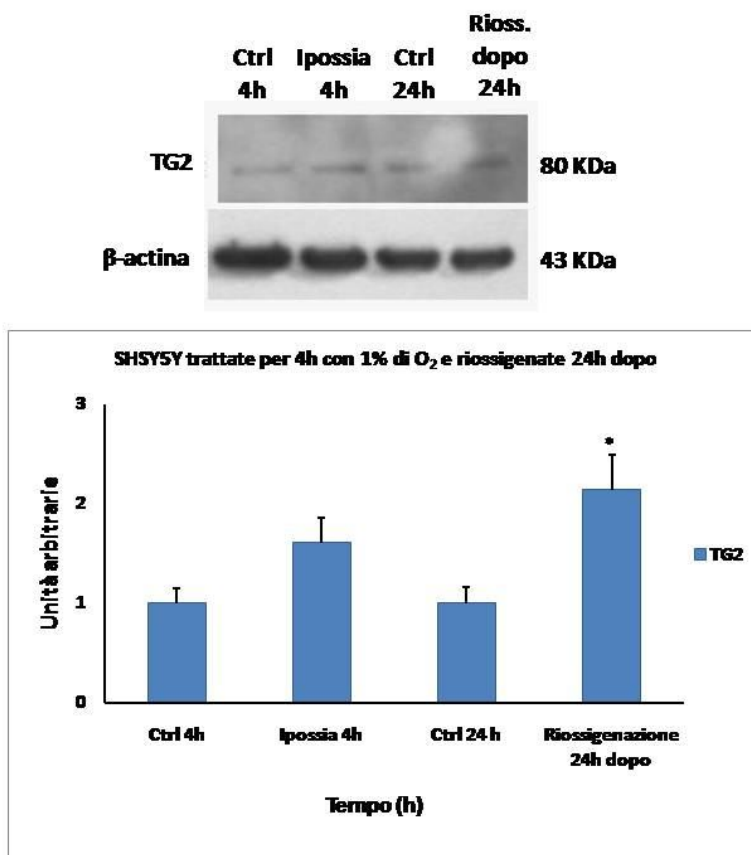


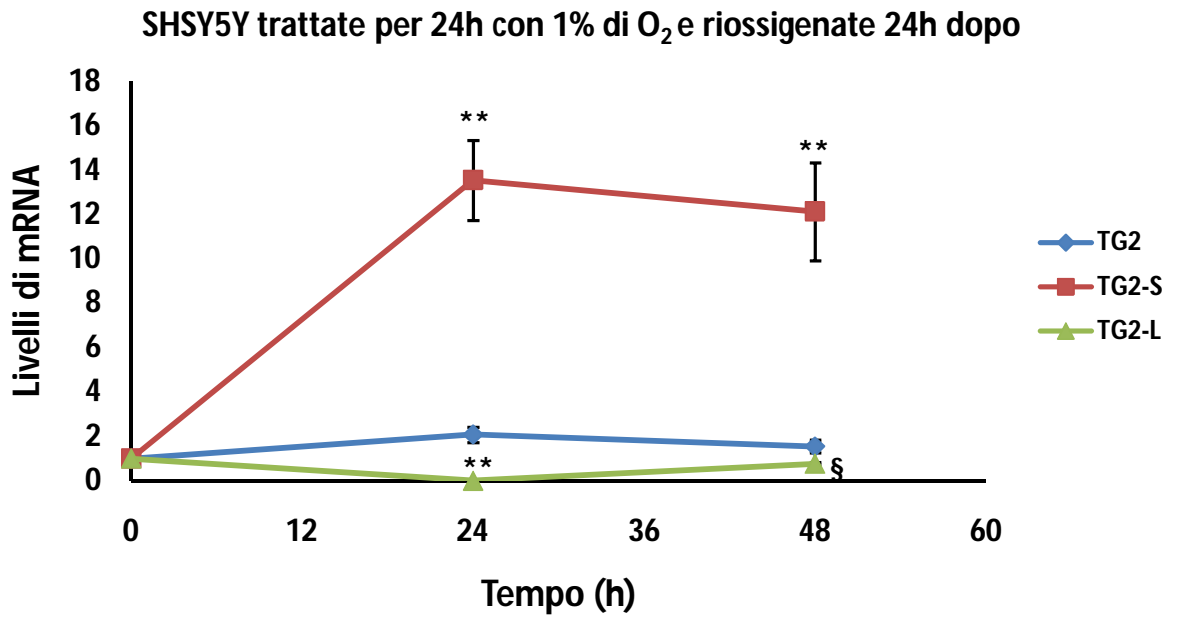
Figura 30. A) Livelli di mRNA di TG2, TG2-S, TG2-L delle SHSY5Y dopo 4 h di ipossia.

B) Saggio Western Blot ed analisi densitometrica dei livelli proteici di TG2 nelle SHSY5Y dopo 4 h di ipossia.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ differenze significative rispetto alle cellule controllo delle cellule trattate e riossigenate; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ differenze significative delle cellule riossigenate rispetto a quelle trattate. Le analisi statistiche sono state eseguite rispettivamente con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni e con il test t di Student.

Dopo 24 h di ipossia nelle cellule SHSY5Y si osserva il doppio di espressione dell'RNA messaggero di TG2 rispetto al controllo, rappresentata esclusivamente dall'isoforma corta TG2-S, la cui trascrizione è 13,55 volte maggiore quando paragonata alle cellule in normossia e rimane praticamente invariata alla fine della riossigenazione della coltura di neuroblastoma. L'analisi della proteina della transglutaminasi 2 in Western Blot conferma la sua presenza nelle cellule praticamente non modificata, dopo il trattamento e la ripresa di un giorno, rispetto al suo stesso controllo cellulare e quindi in sintonia con quanto si evidenzia dalla sua espressione genica. Nella figura 31 (A e B) si mostrano i grafici dei risultati discussi sopra.

A



B

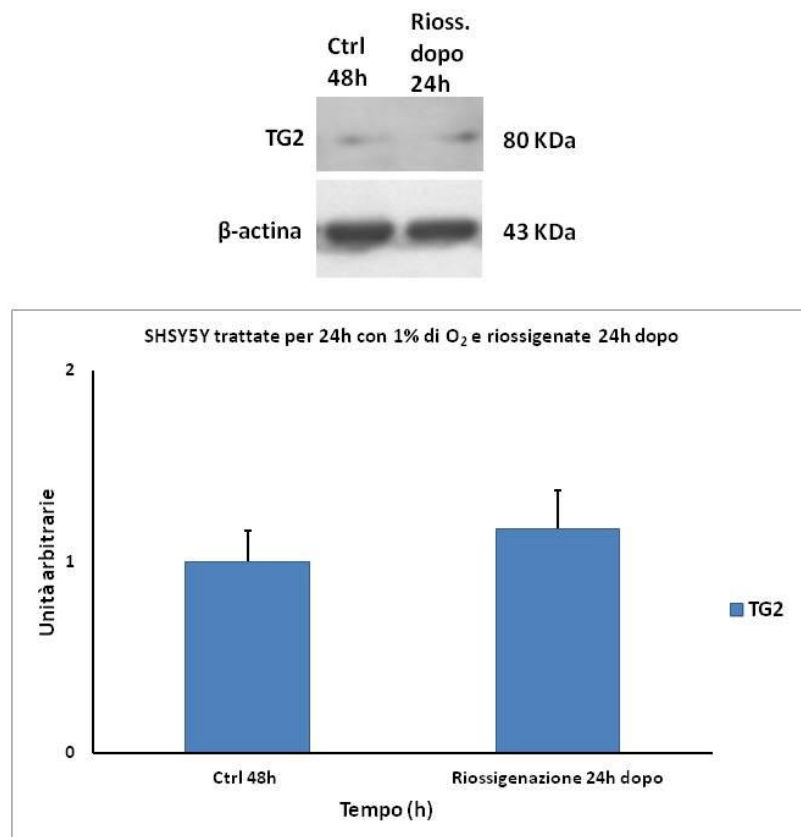


Figura 31. A) Livelli di mRNA di TG2, TG2-S, TG2-L delle SHSY5Y dopo 24 h di ipossia. B) Saggio Western Blot ed analisi densitometrica dei livelli proteici di TG2 nelle SHSY5Y trascorse 24 h di ipossia. ** $p < 0.01$ differenza significativa delle cellule trattate e riossigenate rispetto alle cellule controllo; § $p < 0.05$ differenza significativa delle cellule riossigenate rispetto a quelle trattate. Le analisi statistiche sono state eseguite rispettivamente con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni e con il test t di Student.

La presenza della transglutaminasi 2 e delle sue isoforme nelle colture di neuroblastoma SHSY5Y, sia come risposta all'esposizione ad un ambiente ipossico sia nelle cellule reincubate in termostato a concentrazioni di ossigeno ambientali, è anche spiegata dalla mancanza in questa linea cellulare dell'amplificazione del proto-oncogene *N-MYC*. Infatti studi evidenziano il ruolo di quest'ultimo nel reclutare l'enzima istone deacetilasi 1 nei pressi del promotore del gene *TGM2*, reprimendone la trascrizione (Liu et al., 2007).

E' ampiamente esaminata la questione sulla possibilità che differenti isoforme di un singolo gene, derivate da un meccanismo di splicing alternativo, possano esercitare funzioni simili o opposte (Matlin et al., 2005).

Il ruolo delle due isoforme di TG2 è estremamente intrigante; un lavoro di ricerca evidenzia gli effetti opposti di TG2-S e TG2-L sulla vitalità cellulare, indicando la forma troncata della proteina o S come quella responsabile dell'avvio alla morte cellulare programmata e la forma lunga o L necessaria per offrire un vantaggio nella sopravvivenza cellulare (Antonyak et al., 2006). D'altra parte nel neuroblastoma si aggiunge l'evidenza che TG2-S e TG2-L hanno rispettivamente la capacità di indurre o bloccare la differenziazione cellulare, la prima grazie alla sua unica attività transamidasi e la seconda perché non perde la capacità di legare il GTP, riducendo la sua funzione enzimatica (Tee et al., 2010).

I risultati ottenuti dal trattamento ipossico in diversi tempi delle SHSY5Y sembrano suggerire l'idea che la carenza prolungata di ossigeno scateni un meccanismo caratterizzato dall'aumento della mortalità cellulare per apoptosi e dalla differenziazione di questa linea di cellule di neuroblastoma, probabilmente tramite un'azione che vede anche coinvolta l'isoforma corta della transglutaminasi 2.

Una migliore comprensione del comportamento cellulare in ipossia è fornita dall'esame del ciclo delle cellule di neuroblastoma sia mediante l'analisi di espressione delle cicline e dell'inibitore p16 sia tramite la rivelazione della distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo utilizzando la citofluorimetria a flusso.

L'esito dei risultati della Real Time PCR dopo i due trattamenti delle SHSY5Y in ipossia mostrano una diversa risposta delle cellule, che in qualche modo è conforme ai

risultati dei test di vitalità cellulare.

Trascorse 4 h di esposizione all'1% di ossigeno si evidenzia una trascrizione rilevante della ciclina D1 (9,31 volte versus controllo), coinvolta nella fase G1, e significativa sia della ciclina E1 o G1/S sia della ciclina A1 o S, entrambe di circa 4,5 volte rispetto alle cellule in normossia. Pertanto in tal caso si immagina una indubbia progressione del ciclo cellulare.

Nel periodo di riossigenazione la ciclina A1 tende ancora ad aumentare (6,26 volte vs controllo) in accordo con la ripresa della crescita cellulare osservata.

Invece il trattamento in ipossia giornaliero induce un decremento notevole della ciclina D1 giustificato anche dall'aumento di 19,7 volte del suo inibitore p16, entrambi in confronto alle cellule in normossia. Mentre a conclusione del periodo di ripresa di 24 h la situazione sembra ripristinarsi, così da essere quasi paragonabile ai controlli.

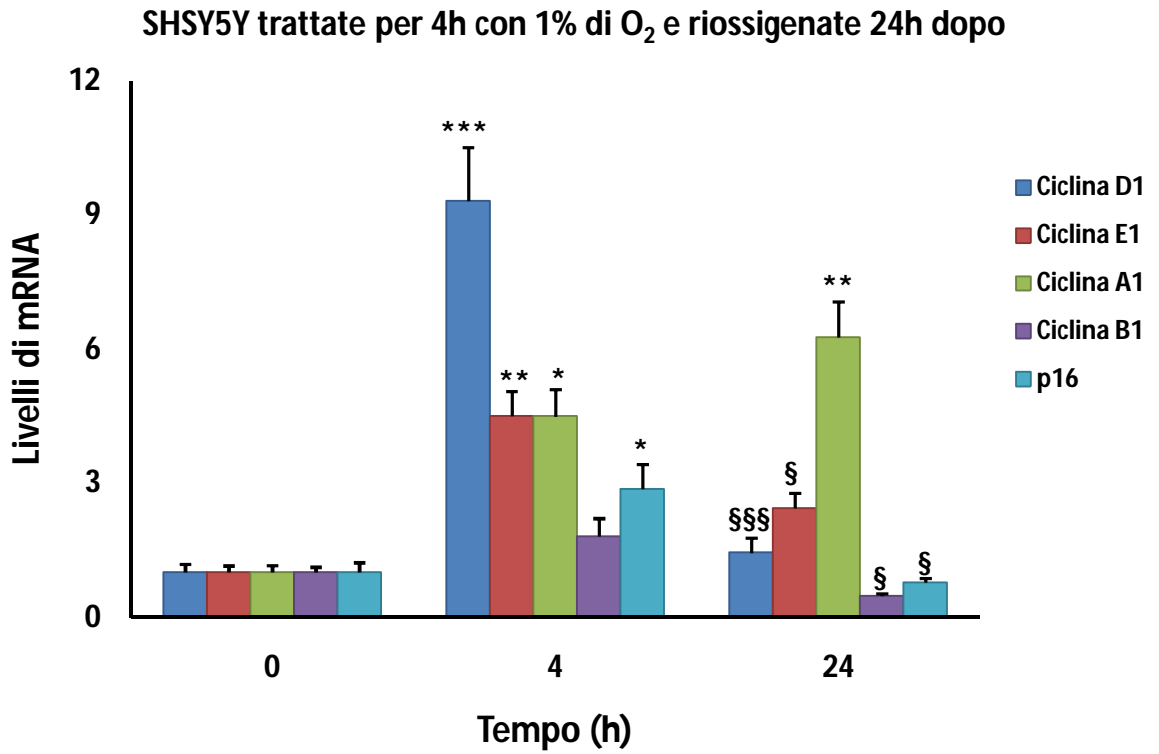
I risultati degli esami di espressione genica sono coerenti con quanto ottenuto tramite l'analisi del ciclo cellulare in citofluorimetria, svolto solo al termine del trattamento ipossico giornaliero.

Si nota che le cellule in ipossia si trovano in modo predominante in fase G1 e solo un numero estremamente esiguo in fase S rispetto alle stesse cellule in condizioni d'incubazione standard. Invece le cellule di neuroblastoma riossigenate hanno una distribuzione abbastanza comparabile alle cellule in normossia.

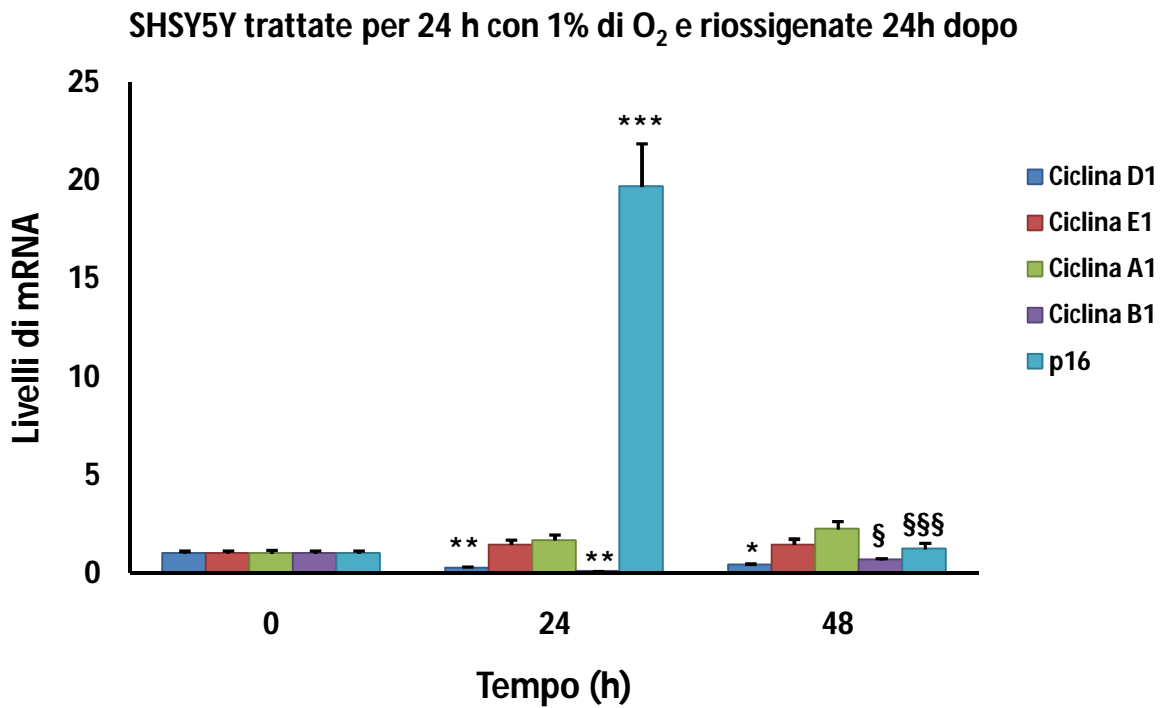
Questi dati potrebbero far ipotizzare che nelle cellule di neuroblastoma SHSY5Y l'ipossia prolungata aumenti la durata della fase G1 del ciclo cellulare, causando di conseguenza un rallentamento o l'arresto della proliferazione delle cellule, tramite l'azione inibitoria di HIF-1 α sull'espressione MYC dipendente della ciclina D. In tal modo si scatenano quell'insieme di fenomeni che non permettono lo switch biologico tra la ciclina E ed il complesso SCF deputato alla sua degradazione (Gordan et al., 2007; Bedessem and Stéphanou, 2014).

I grafici dell'espressione dei geni delle cicline dopo i due trattamenti ipossici e quello dell'analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare delle SHSY5Y si riportano nella figura 32 (A, B e C).

A



B



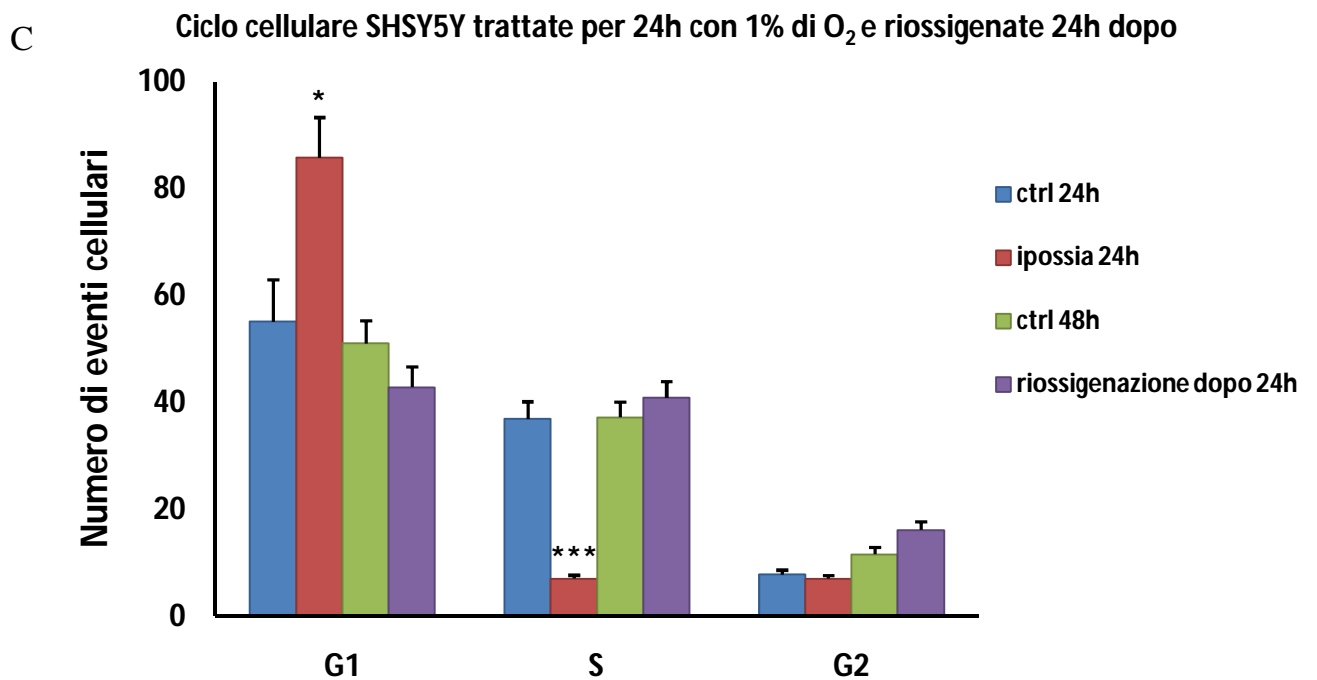


Figura 32. A) e B) Analisi espressione genica delle cicline e p16 delle SHSY5Y trattate in ipossia per 4h e 24h. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ differenze significative delle cellule trattate e riossigenate rispetto alle cellule controllo; § $p < 0.05$, §§§ $p < 0.001$ differenze significative delle cellule riossigenate rispetto a quelle trattate. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.

C) Analisi tramite citofluorimetro a flusso BD FACSCanto II del ciclo cellulare delle SHSY5Y esposte per 24 h ad ipossia. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ differenze significative delle cellule trattate rispetto al loro controllo. L'analisi statistica è stata eseguita con il test t di Student.

Per completare la panoramica della risposta delle cellule di neuroblastoma all'esposizione a tempi diversi di ipossia si studia l'espressione di alcune molecole implicate nell'adesione cellulare ovvero le caderine epiteliali e neurali, le molecole di adesione intercellulare (ICAM) e vascolare (VCAM) e gli enzimi coinvolti nella degradazione della matrice extracellulare, dette metalloproteasi, e nello specifico la MMP-2 e la MMP-9.

E' dibattuto il ruolo del fenomeno dello switch delle caderine sulla progressione tumorale.

Infatti se in certi casi, come nel cancro alla prostata e nel melanoma, è evidente la correlazione tra la perdita dell'adesione mediata dalla caderina epiteliale o E-caderina e l'espressione della caderina mesenchimale, come l'N-caderina, con l'aumento della

malignità tumorale, per altri tipi di tumore si richiedono ulteriori studi per stabilire se questo meccanismo sia alla base dello sviluppo metastatico del cancro (Sanders et al., 1999; Tomita et al., 2000; Cavallaro et al., 2002).

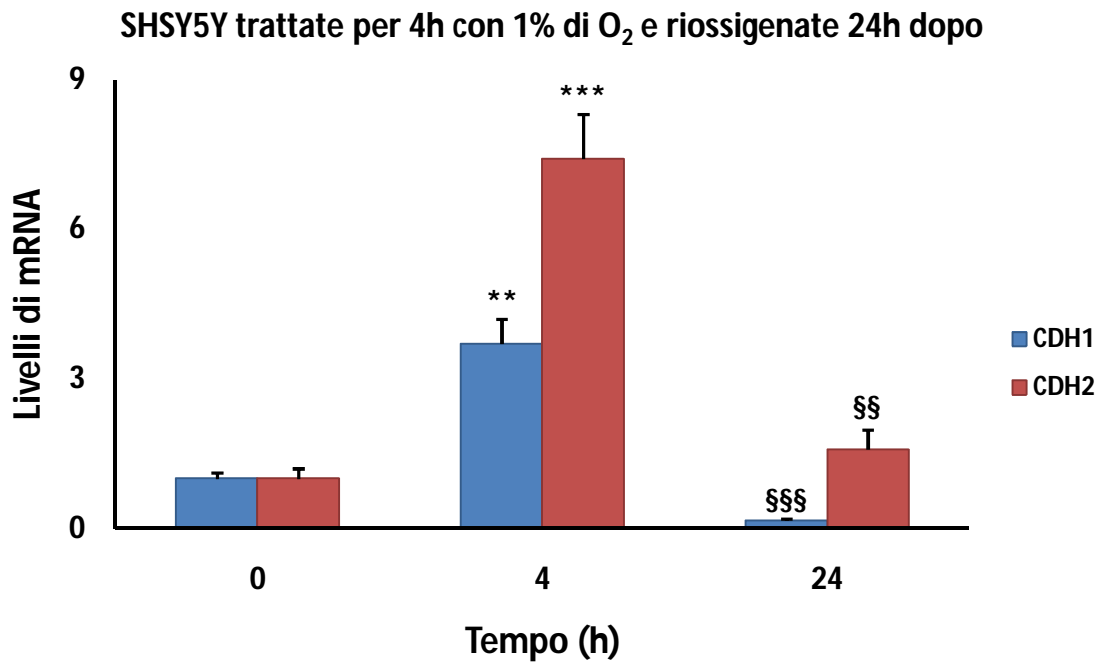
E' fondamentale tenere a mente che le variazioni dell'N-caderina nelle cellule della cresta neurale sono necessarie per permetterne una corretta migrazione durante lo sviluppo embrionale delle strutture nervose e non. Una riduzione di questa proteina di adesione è strettamente collegata alla motilità cellulare, motivo per cui evidenze sperimentali provano una stretta relazione tra la sua carente espressione e il potenziale metastatico in tumori come il neuroblastoma (Lammens et al., 2012).

L'espressione della N-caderina, anche conosciuta come caderina-2 o CDH-2, nelle linee SHSY5Y aumenta di 7,41 volte rispetto alle cellule controllo dopo un trattamento ipossico di 4 h, per poi ridursi significativamente durante la successiva riossigenazione. Tali cambiamenti non si rivelano dopo un'esposizione giornaliera all'ipossia, riscontrandosi dei livelli di mRNA delle due caderine, epiteliale o CDH1 e neurale o CDH2, abbastanza paragonabili alle cellule di neuroblastoma SHSY5Y coltivate in normossia. Comunque, anche in questo secondo caso, si nota visivamente un lieve aumento di CDH2 rispetto a CDH1, che diventa evidente durante la ripresa di 24 h in condizioni standard.

L'ipotesi ricavabile dall'analisi di questi risultati è il pensare che l'ipossia abbia la capacità di indurre una differenziazione delle cellule SHSY5Y. E tale idea potrebbe essere resa degna di considerazione valutando la sua correlazione con l'aumento dell'isoforma corta di TG2.

Nella figura 33 (A e B) si mostrano i grafici dei risultati ottenuti dall'analisi in Real Time PCR delle caderine CDH1 e CDH2 delle SHSY5Y, sopra descritti.

A



B

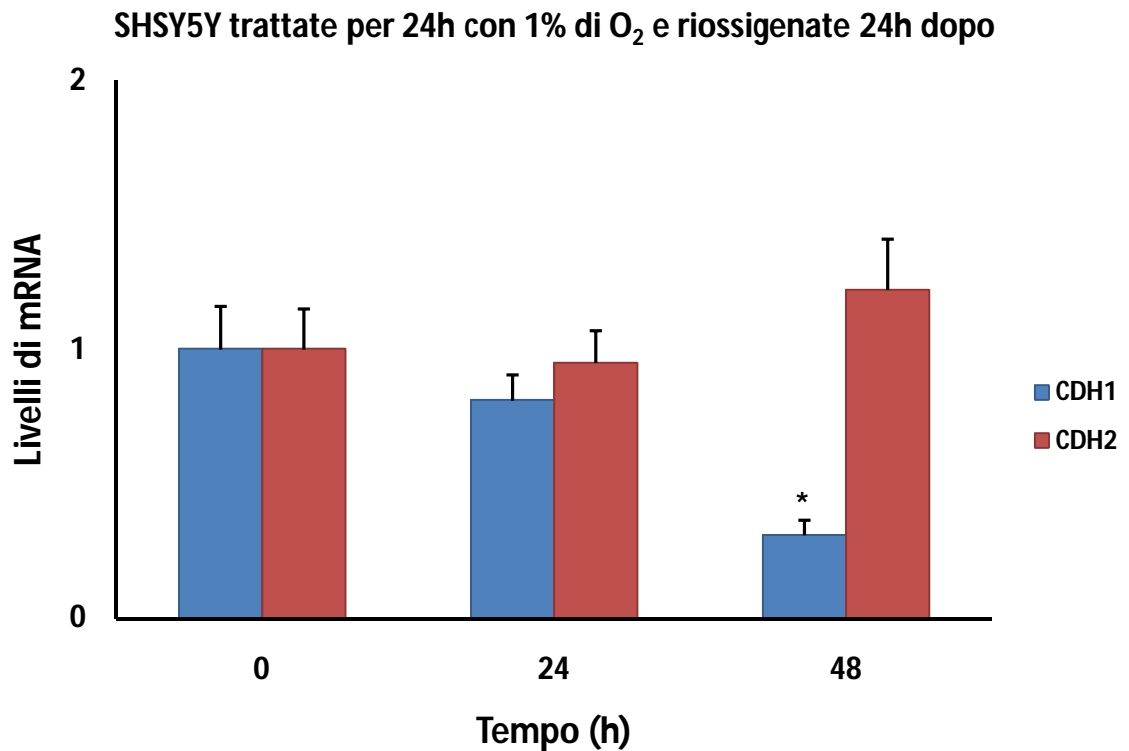


Figura 33. A) e B) Analisi espressione genica delle caderine epiteliale (CDH1) e neurale (CDH2) delle SHSY5Y trattate in ipossia per 4h e 24h. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ differenze significative delle cellule trattate e riossigenate rispetto alle cellule controllo; §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$ differenze significative delle cellule riossigenate rispetto a quelle trattate. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.

Interessanti sono infine gli esiti ottenuti dagli esperimenti volti ad esaminare le differenze trascrizionali delle metalloproteasi e delle proteine di adesione ICAM e VCAM.

Nella coltura di neuroblastoma SHSY5Y, dopo esposizione ad un microambiente ipossico nei due tempi, non si evidenziano dei cambiamenti estremamente ragguardevoli della MMP-2 e solo leggermente significativi della MMP-9 dopo 4 h di ipossia (2,28 volte versus controllo), che è invece completamente assente dopo 24 h di trattamento, tanto da non essere riportata nel grafico.

L'attività di questi enzimi è associata alla crescita ed alla capacità invasiva delle cellule tumorali (Rabbani et al., 2000). Pertanto il riscontro di un discreto livello di espressione della MMP-9 nelle SHSY5Y, solo alla fine di un'ipossia acuta, giustifica ancora di più la buona vitalità di queste cellule tumorali rivelata con il saggio MTT.

Notevole è l'aumento delle proteine di adesione ICAM e VCAM. Più esattamente dopo un'incubazione di 4 ore con l'1% di ossigeno si osserva un'espressione dell'mRNA di VCAM di 5,19 volte di più rispetto alle cellule di neuroblastoma in condizioni standard, mentre ICAM non subisce variazioni significative. Invece quest'ultimo, al termine del trattamento giornaliero in ipossia, presenta un livello trascrizionale 13,45 volte maggiore del controllo e VCAM continua ad essere molto espresso (7,92 volte versus cellule in normossia). In generale durante la riossigenazione che segue i trattamenti si evidenzia una riduzione significativa dell'espressione di questi geni rispetto alle cellule in ipossia e controllo.

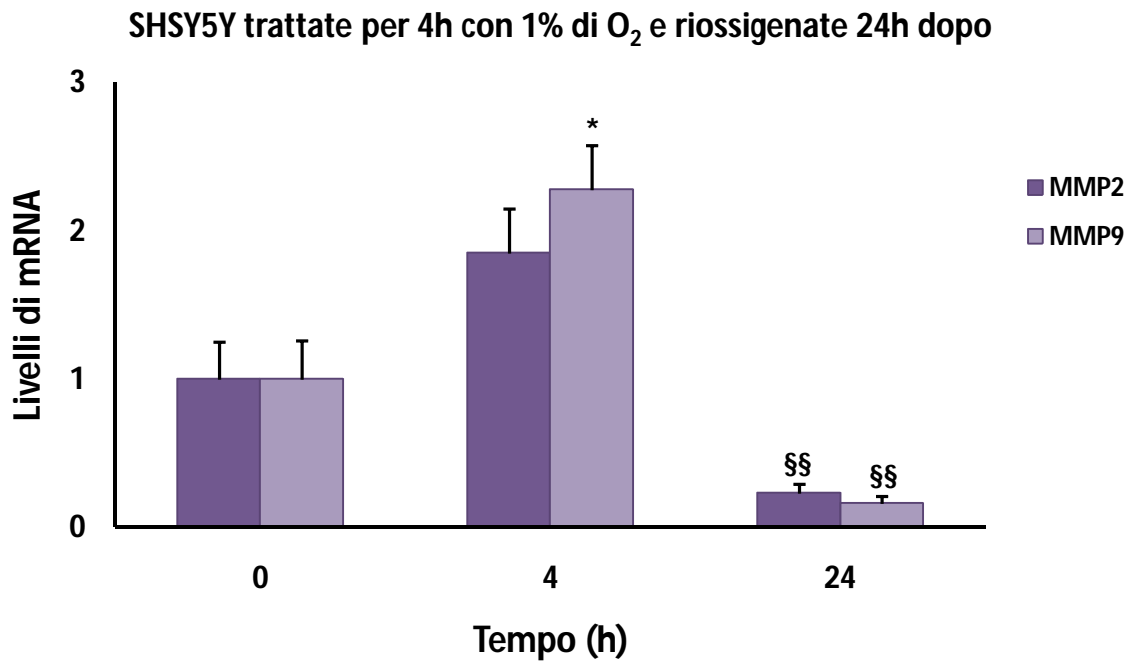
Un intrigante lavoro di ricerca ha evidenziato una netta induzione di espressione delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 da parte della citochina TNF- α , utilizzata per provocare cambiamenti morfologici delle cellule tumorali fino all'acquisizione di un fenotipo neuronale, nelle linee di neuroblastoma SK-N-SH ed SK-N-MC affini alla linea SHSY5Y (Ponzoni et al., 1992; Obregon et al., 1997). Da questa rivelazione si stabilisce una relazione tra l'espressione di queste proteine di adesione ed il grado di differenziazione delle cellule di neuroblastoma, soprattutto evidenziando che più grande è il livello trascrizionale di ICAM-1 più la cellula è differenziata. Inoltre la differenziazione cellulare si associa all'arresto della proliferazione cellulare (Gross et

al., 1992; Obregon et al., 1997).

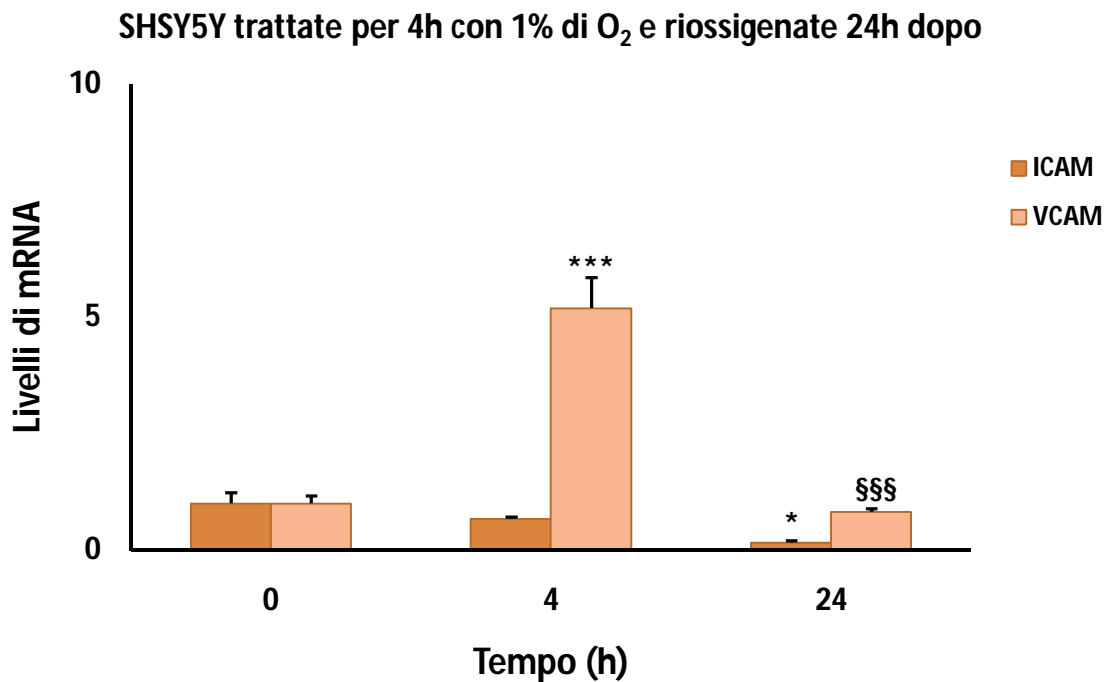
Pertanto volendo paragonare i nostri risultati agli esiti di questa scoperta si rende sempre più degna di nota l'idea che l'ipossia prolungata stimoli nella linea di neuroblastoma SHSY5Y lo scatenarsi di meccanismi volti alla differenziazione delle cellule tumorali.

La figura 34 (A, B e C) raccoglie i grafici dei dati sopra descritti.

A



B



C

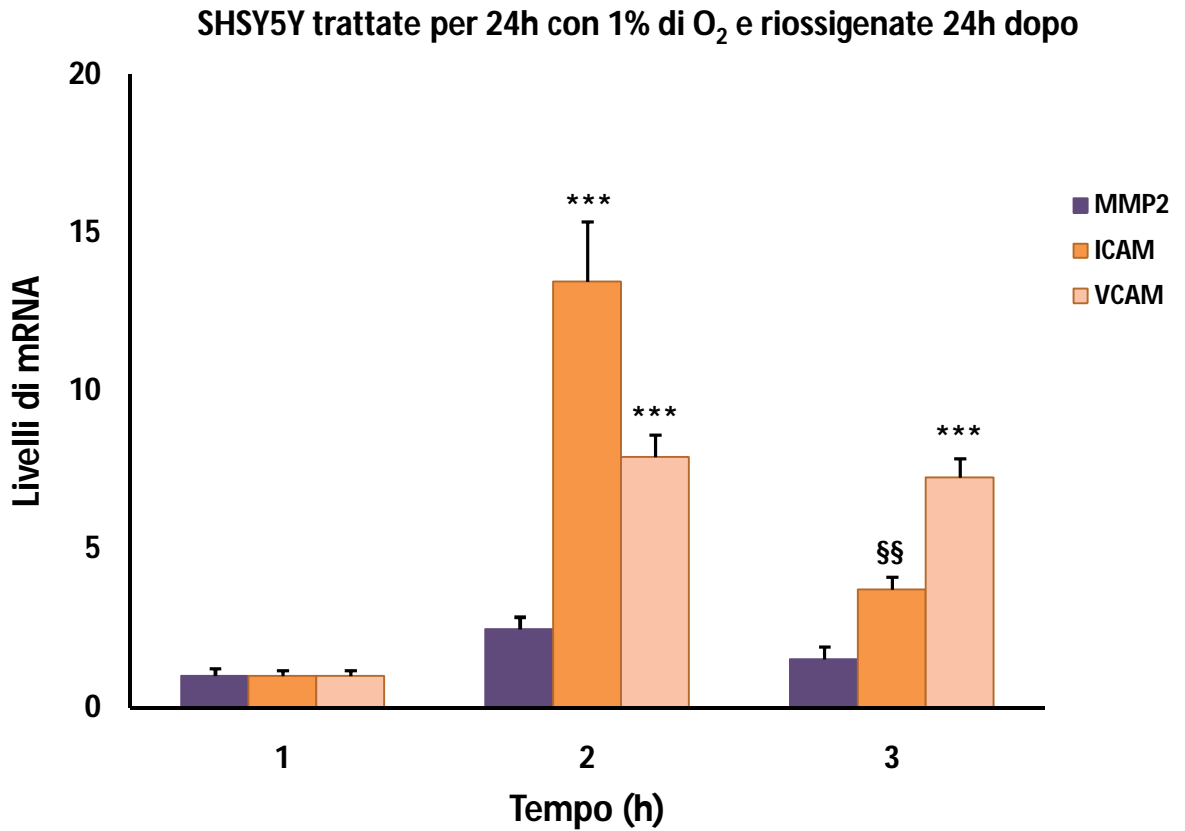


Figura 34. A) e B) Analisi espressione genica delle metalloproteasi MMP-2 ed MMP-9 e delle proteine di adesione ICAM e VCAM nelle SHSY5Y trattate in ipossia per 4h. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ differenze significative delle cellule trattate e riossigenate rispetto alle cellule controllo; §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$ differenze significative delle cellule riossigenate rispetto a quelle trattate. C) Analisi espressione genica di MMP-2, ICAM e VCAM nelle SHSY5Y esposte per 24 h ad ipossia. *** $p < 0.001$ differenza significativa delle cellule trattate e riossigenate rispetto al controllo; §§ $p < 0.01$ differenza significativa delle cellule riossigenate rispetto a quelle trattate. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.

2. VALUTAZIONE E CONFRONTO DELLA RISPOSTA DELLE IMR-32 ALL'ESPOSIZIONE AD UN MICROAMBIENTE IPOSSICO IN DUE TEMPI DIVERSI

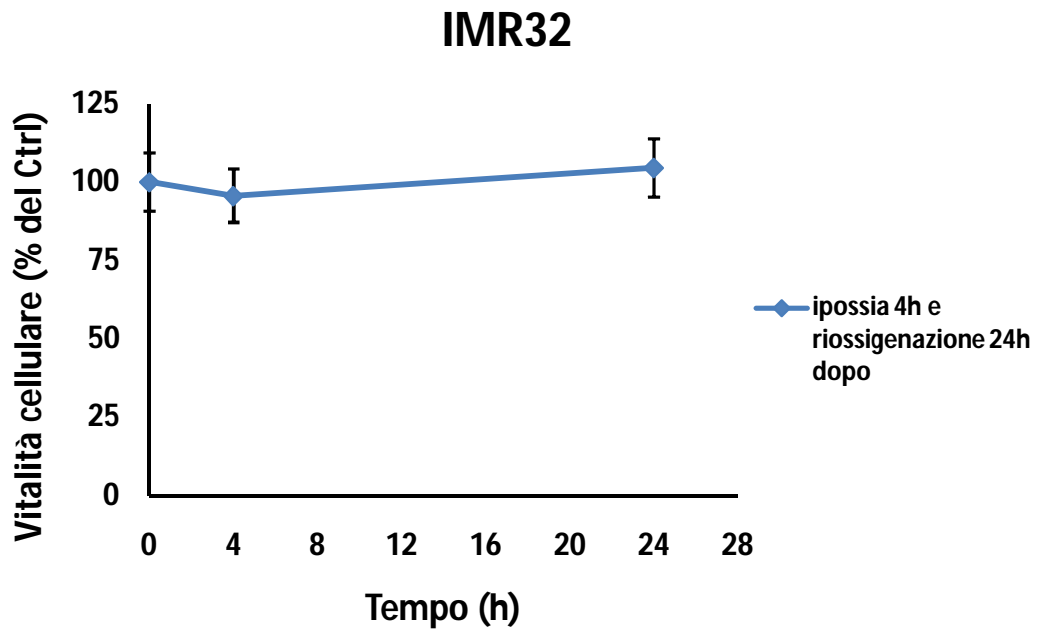
La linea cellulare di neuroblastoma IMR-32 presenta l'amplificazione del fattore di trascrizione N-MYC, l'alterazione genetica meglio caratterizzata di questa neoplasia e solitamente associata al neuroblastoma ad alto rischio a prognosi infausta (Seeger et al., 1985). N-MYC svolge molteplici ruoli che favoriscono la tumorigenesi del neuroblastoma e ne amplificano l'aggressività (Huang and Weiss, 2013).

Pertanto, insieme all'attenta analisi del comportamento delle cellule SHSY5Y in ipossia, si ritiene di notevole interesse osservare e confrontare la risposta ai due trattamenti ipossici, ovvero acuto (quattro ore) e prolungato (24 ore), di una linea cellulare rappresentante un fenotipo più invasivo e pericoloso di neuroblastoma.

Innanzitutto si esamina tramite il saggio MTT l'impatto di entrambe le esposizioni ad un microambiente ipossico sulla vitalità cellulare.

Dai grafici della figura 35 (A e B) non si evince nessun effetto antiproliferativo significativo sia dopo 4 h sia dopo 24 h di ipossia. Inoltre si evidenzia una straordinaria ripresa della crescita cellulare nel successivo periodo di riossigenazione, tale da far ipotizzare che il trattamento ipossico abbia indotto lo scatenarsi di meccanismi che rendono le cellule tumorali ancora più aggressive. Questa considerazione potrebbe essere affine alla scoperta che il fenotipo ipossico, caratterizzato da cellule di neuroblastoma dedifferenziate capaci di metastatizzare velocemente, persiste per 24 h o più durante la ripresa in un'atmosfera con il 21% o il 5% di ossigeno (Holmquist et al., 2005).

A



B

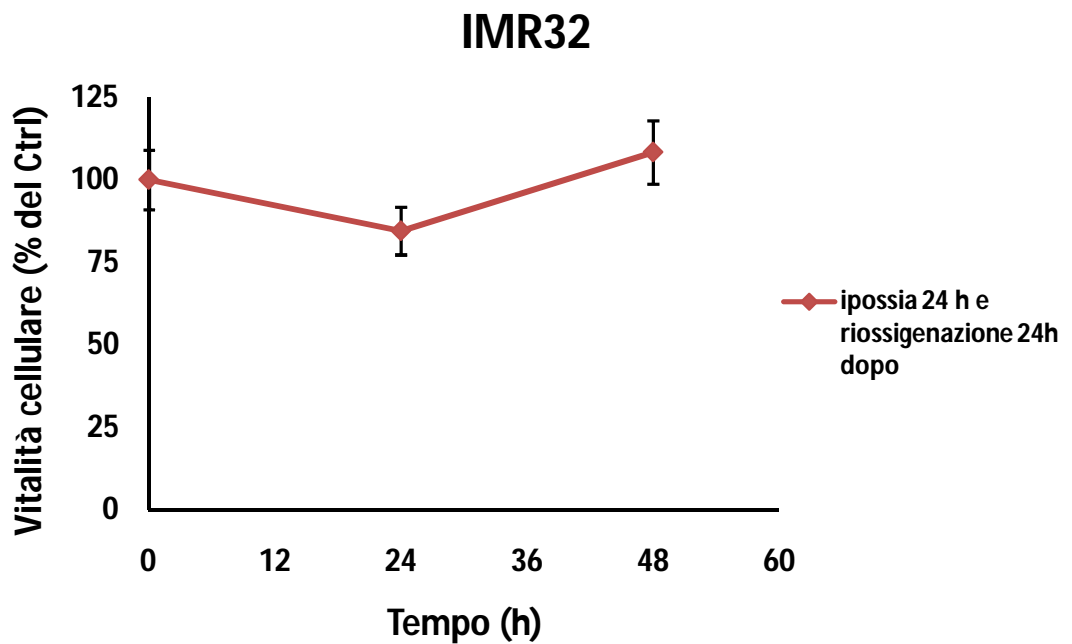


Figura 35. A) e B) Vitalità cellule IMR-32 dopo un trattamento ipossico rispettivamente di 4 h e 24 h. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.

La buona vitalità cellulare osservata, accompagnata da una discreta capacità proliferativa, è confermata anche dall'analisi dell'espressione dei geni codificanti le proteine Bax e Bcl-2, protagonisti dei fenomeni pro- ed anti-apoptotici.

Alla fine dei due trattamenti ipossici l'RNA messaggero di Bax non subisce nessuna variazione significativa, anzi la sua quantità è visivamente leggermente inferiore, quando paragonata alle cellule in condizioni d'incubazione standard. La stessa analisi è valida per l'espressione del fattore anti-apoptotico Bcl-2 che, soltanto dopo un trattamento ipossico di 4 h, raggiunge un livello pari quasi al doppio del controllo. Nella figura 36 (A e B) si riportano i risultati appena descritti.

A

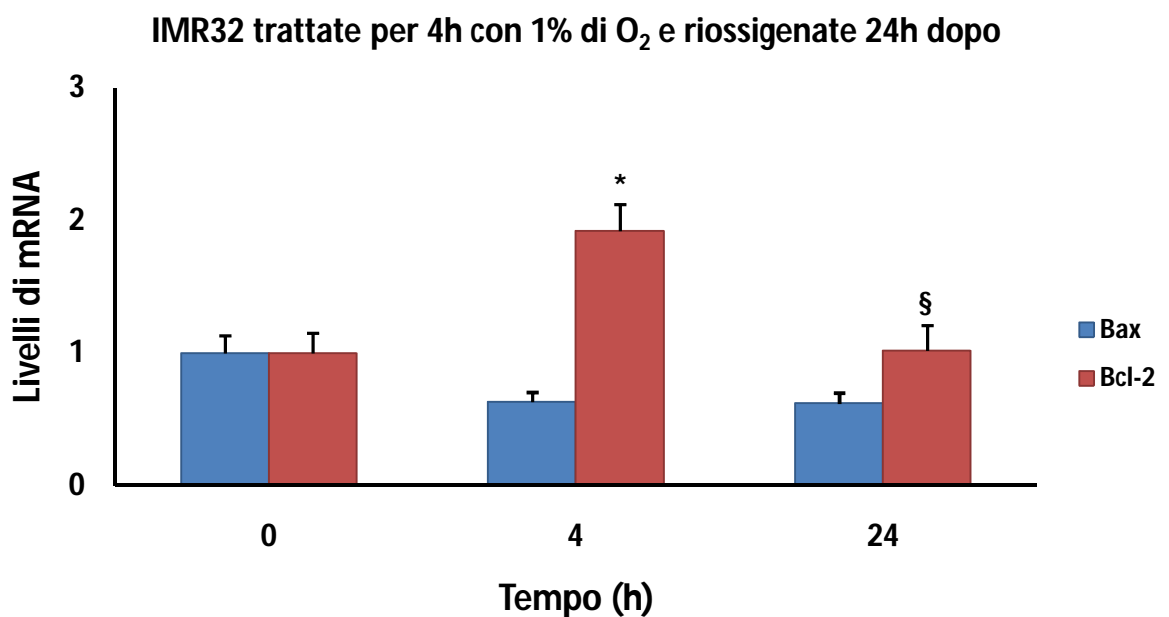


Figura 36. A) Analisi espressione genica in Real Time PCR di Bax e Bcl2 delle IMR-32 dopo 4 ore di stimolo ipossico. * $p < 0.05$ differenza significativa delle cellule trattate rispetto al controllo; § $p < 0.05$ differenza significativa delle cellule riossigenate rispetto quelle trattate. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.

B

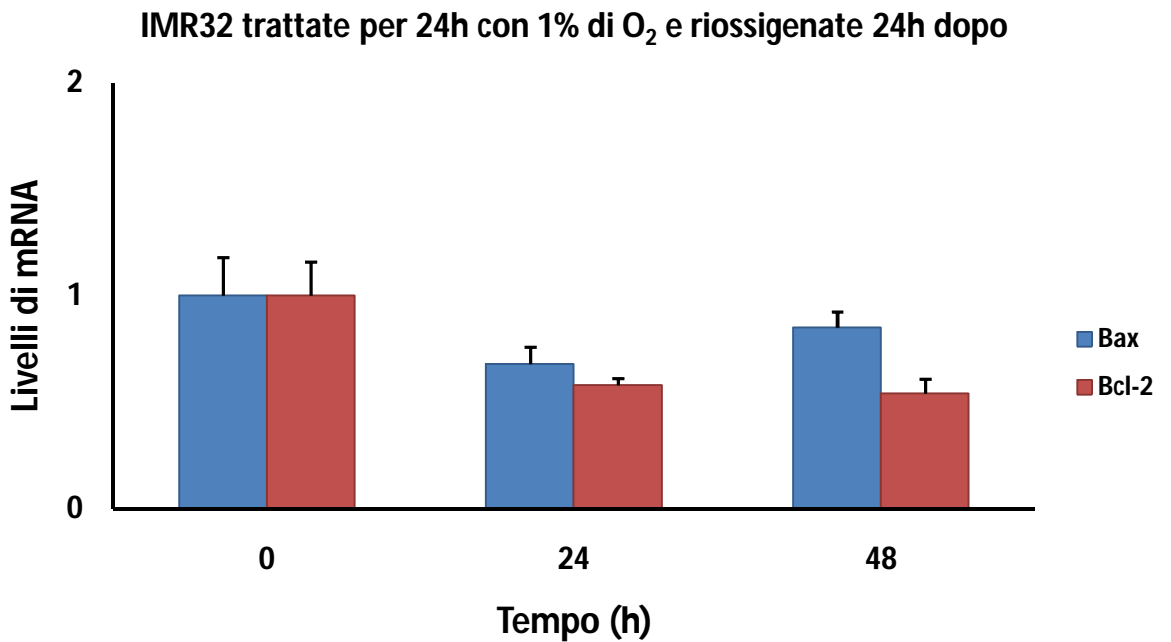


Figura 36. B) Livelli di mRNA di Bax e Bcl2 delle IMR-32 dopo 24 ore di ipossia. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.

Inoltre la mancanza di un evidente danno al DNA rivelata tramite il comet assay ribadisce la crescita delle cellule IMR-32 dopo 24 h di ipossia.

Le fotografie fatte al microscopio a fluorescenza delle cellule controllo e trattate durante l'analisi del saggio della cometa si mostrano nella figura 37 (A e B), mentre i grafici delle percentuali di DNA della testa e della coda delle comete cellulari e delle loro lunghezze si riportano nella figura 38 (A, B e C).

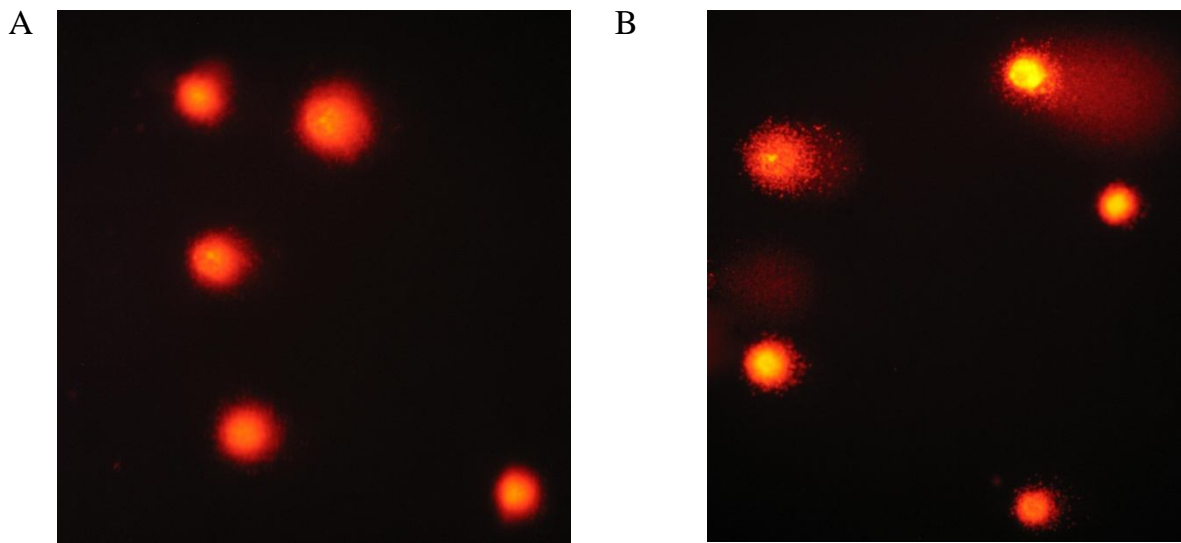


Figura 37. A) Fotografia a microscopio a fluorescenza del comet assay di cellule IMR-32 dopo 24 h in condizioni standard. B) Fotografia a microscopio a fluorescenza del comet assay di cellule IMR-32 esposte per 24 h ad ipossia.

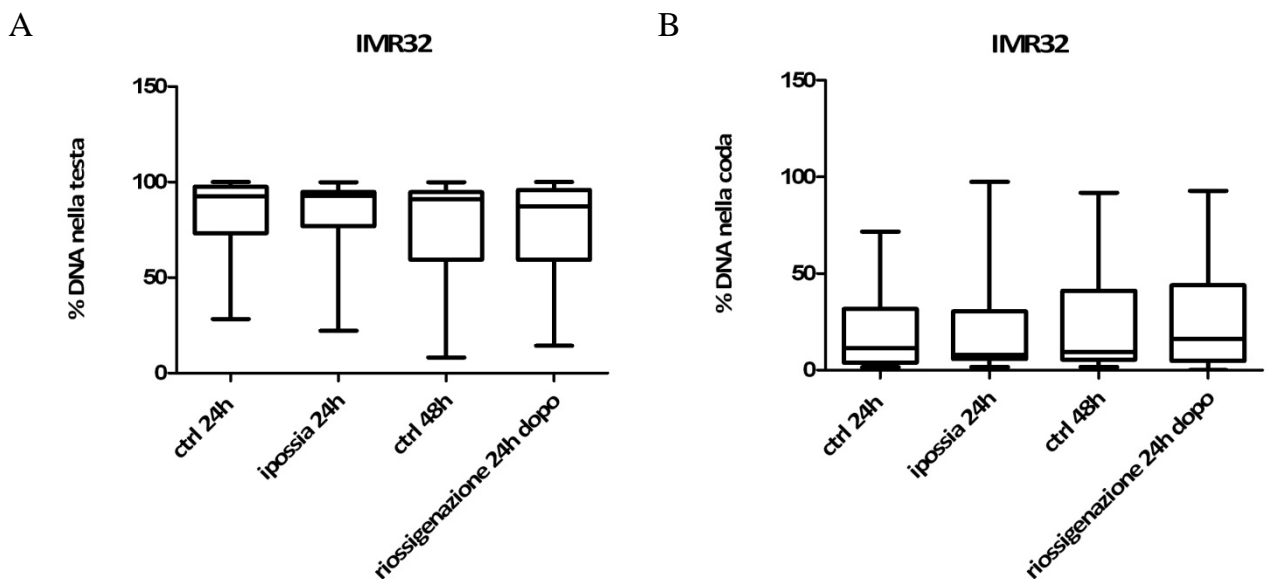


Figura 38. A) e B) Analisi comet assay delle percentuali di DNA nella testa e nella coda delle cellule IMR-32 controllo, esposte per 24 ad ipossia e riossigenate per altre 24 ore, svolte tramite il software CASP. Le analisi statistiche sono state eseguite mediante il test non parametrico di Mann-Whitney.

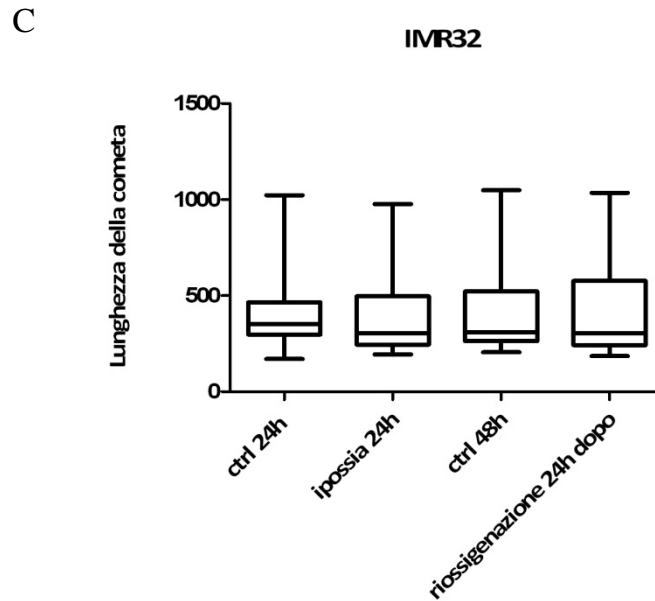


Figura 38. C) Analisi comet assay della lunghezza delle comete delle cellule IMR-32 controllo, esposte per 24 ad ipossia e riossigenate per altre 24 h tramite il software CASP. L'analisi statistica è stata eseguita mediante il test non parametrico di Mann-Whitney.

La risposta delle cellule di neuroblastoma IMR-32 al microambiente ipossico si manifesta con l'attivazione del fattore di trascrizione HIF-1, ed in particolare della sua subunità HIF-1 α , come si evince dall'analisi EMSA riportata nella figura 39. La sua densità arriva ad essere cinque volte più considerevole del controllo al termine di un'esposizione ipossica acuta ed aumenta ancora di circa il doppio trascorsa l'ipossia giornaliera.

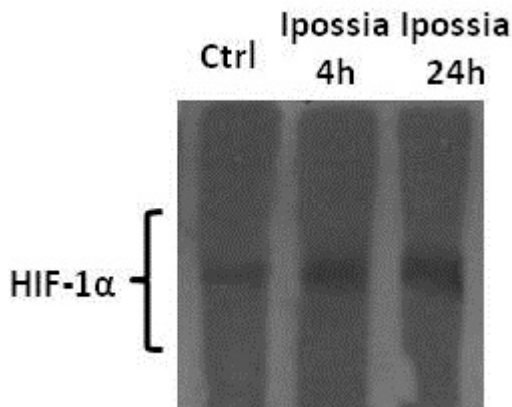


Figura 39. Saggio EMSA della subunità HIF-1 α nella linea cellulare IMR-32 controllo e esposta ad ipossia per 4h e 24 h.

La trascrizione della subunità HIF-1 α è ragguardevole subito dopo le 4 h di trattamento ipossico (3,83 volte versus controllo), per poi stabilizzarsi nelle 24 h di ipossia. Invece la subunità HIF-2 α tende a diminuire ed in modo significativo alla fine di una condizione ipossica prolungata. Questi risultati sono in accordo con quanto riscontrato in diversi lavori di ricerca dove si evince che nelle cellule di neuroblastoma in cui è presente l'amplificazione del gene *N-MYC* la subunità HIF-1 α è espressa in modo preferenziale rispetto alla subunità HIF-2 α , la cui proteina infatti nelle linee cellulari IMR-32 e LA-N-5 è in quantità talmente esigue da non essere rilevabile (Jögi et al., 2002; Qing et al., 2010). Il livello di RNA messaggero del VEGF è invece sempre alto in entrambe le condizioni di ipossia, ma il suo aumento rispetto al controllo è più degno di nota in ipossia acuta rispetto a quella giornaliera (10,48 versus 3,18). Nei grafici della figura 40 (A e B) si mostra quanto appena descritto.

A

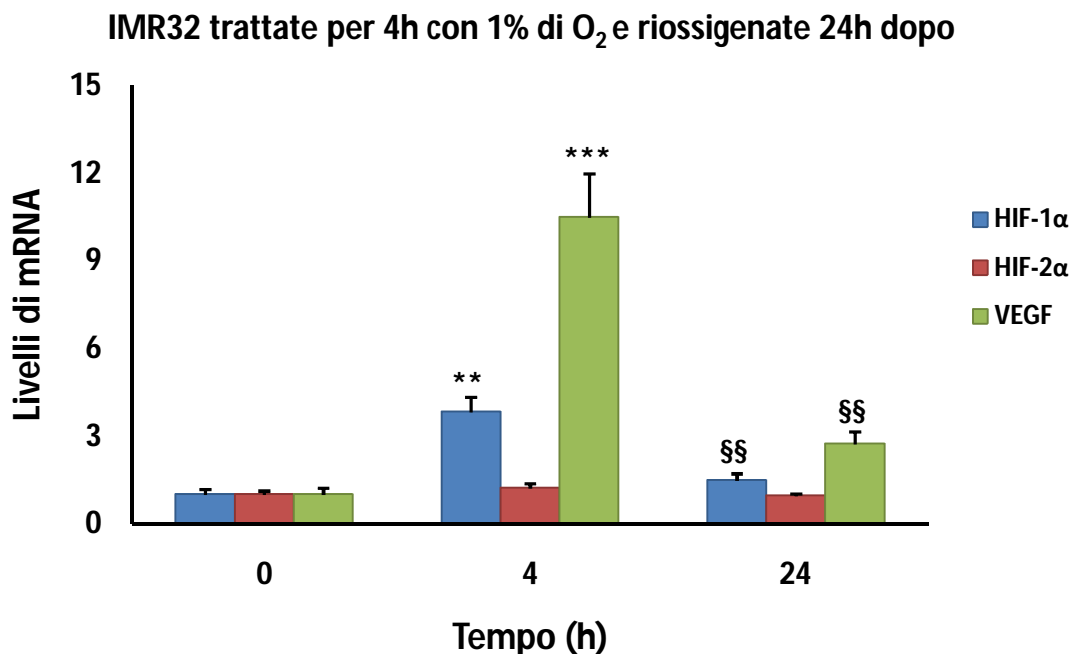


Figura 40. A) Livelli di mRNA di HIF-1 α , HIF-2 α e VEGF delle IMR-32 dopo 4 h di ipossia. ** p <0.01, * p <0.001 differenze significative dei trattati rispetto alle cellule controllo; §§ p <0.01 differenza significativa delle cellule riossigenate in confronto a quelle ipossiche. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.**

B

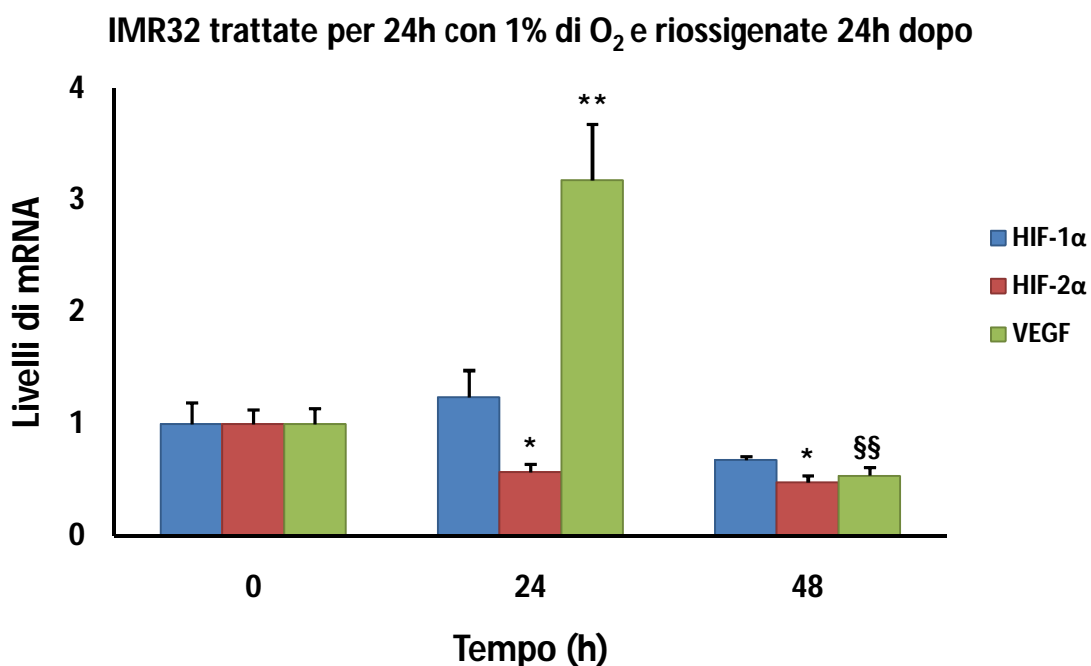


Figura 40. B) Livelli di mRNA di HIF-1 α , HIF-2 α e VEGF delle IMR-32 dopo 24 h di ipossia.* p <0.05, ** p <0.01 differenze significative di cellule trattate e riossigenate rispetto al controllo; §§ p <0.01 differenza significativa delle cellule riossigenate in confronto a quelle in condizioni ipossiche. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.

Come per le SHSY5Y anche per le IMR-32 si esamina l'espressione della transglutaminasi 2, in qualità di enzima stimolato in condizioni di ipossia, e si analizza insieme ad essa la trascrizione delle sue isoforme TG2-S e TG2-L.

L'esposizione all'ipossia induce un cambiamento nell'espressione di TG2 caratterizzato dall'aumento nel tempo, ovvero 2,3 volte dopo 4 h fino a 5,3 volte al termine delle 24 h di più rispetto alle cellule controllo. Questo risultato non si accorda con le osservazioni della repressione della trascrizione del gene *TGM2* ad opera di N-MYC (Liu et al., 2007), il cui gene è presente in molteplici copie nelle cellule di neuroblastoma IMR-32. Ma si può supporre che l'ipossia giochi un ruolo che in qualche modo contrasta l'azione svolta da N-MYC in normossia e questa ipotesi deve essere verificata ulteriormente.

Comunque questa osservazione si accompagna alla più curiosa rivelazione della

presenza dei trascritti alternativi di TG2, ovvero TG2-S e TG2-L.

Dopo entrambi i trattamenti ipossici l'mRNA dell'isoforma corta, la cui presenza sembra sia indispensabile per indurre la differenziazione nelle cellule di neuroblastoma (Tee et al., 2010), è quella presente in forma più abbondante e tende ad aumentare dopo l'ipossia giornaliera, nello specifico si calcola da 16,48 volte nelle 4 h fino a 18 volte nelle 24 h di più rispetto ai controlli. Ma contemporaneamente, a differenza delle cellule SHSY5Y, nelle IMR-32 l'mRNA dell'isoforma lunga si accresce in modo considerevole sia dopo un'esposizione acuta all'ambiente ipossico (5,81 volte versus controllo) e molto di più ancora al termine del trattamento ipossico di un giorno intero ovvero 15,79 volte rispetto alle cellule in normossia. Durante la riossigenazione della coltura delle IMR-32 nelle 24 h successive l'espressione di TG2-L si riduce in modo significativo rispetto alle cellule sottoposte ad ipossia sia per 4 h sia per 24 h, mentre non si notano variazioni considerevoli dei livelli di mRNA di TG2-S nei confronti delle cellule ipossiche di entrambi i trattamenti. Invece al termine del periodo di riossigenazione l'espressione di TG2 non si modifica rispetto alle cellule esposte ad ipossia per 4 h, mentre si riduce dopo l'ipossia giornaliera, sempre se confrontata con le cellule trattate.

La co-presenza di entrambi i trascritti alternativi di TG2 in ipossia fa ipotizzare una maggiore resistenza alla differenziazione delle cellule di neuroblastoma IMR-32 in queste condizioni di stress e la tendenza alla proliferazione, permessa dalla presenza di TG2-L che, grazie alla sua attività GTPasica, contrasta l'azione di transamidazione di TG2-S necessaria per indurre la differenziazione cellulare (Tee et al., 2010).

Infine l'analisi delle proteine di TG2 tramite Western Blot ci permette di evidenziare la presenza della forma corta TG2-S, la cui quantità non varia rispetto ai controlli al termine della riossigenazione dopo 4 h di ipossia ed invece, in contrasto sorprendente con i risultati della Real Time PCR, diminuisce in maniera abbastanza significativa al termine del trattamento ipossico giornaliero per poi aumentare durante la riossigenazione. Tali variazioni possono essere giustificate con l'osservazione che non sempre ad un aumento del processo della trascrizione corrisponde un aumento della proteina.

Quanto sopra descritto si presenta nelle figure 41 (A e B) e 42 (A e B).

A

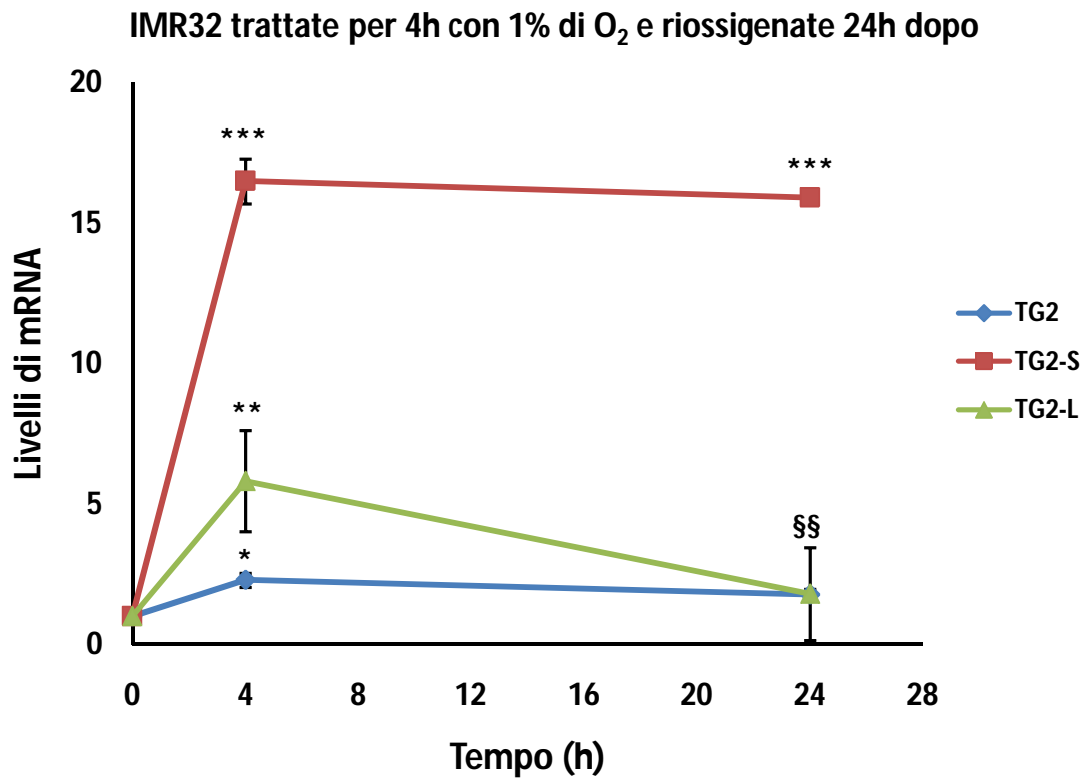


Figura 41. A) Livelli di mRNA di TG2, TG2-S, TG2-L delle IMR-32 dopo 4 h di ipossia. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ differenze significative rispetto alle cellule controllo delle cellule trattate e riossigenate; §§ $p < 0.01$ differenza significativa delle cellule riossigenate rispetto a quelle trattate. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.

B

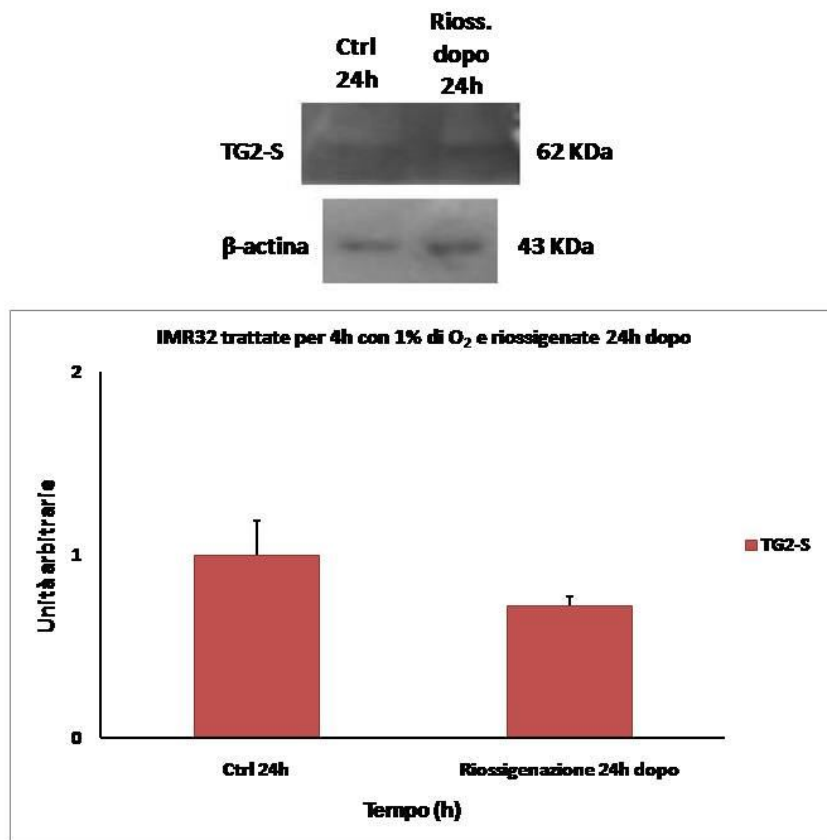


Figura 41. B) Saggio Western Blot ed analisi densitometrica dei livelli proteici di TG2-S nelle IMR-32 dopo 4 h di ipossia. L'analisi statistica è stata eseguita con il test t di Student.

A

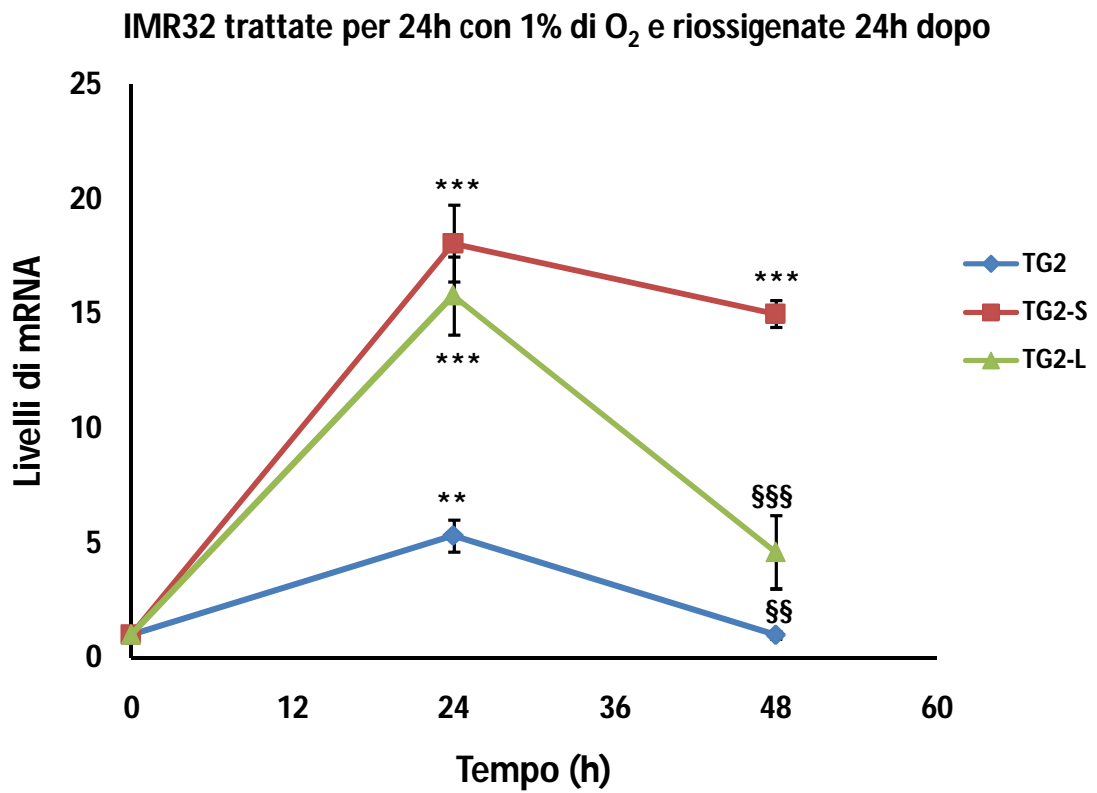


Figura 42. A) Livelli di mRNA di TG2, TG2-S, TG2-L delle IMR-32 dopo 24 h di ipossia. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ differenze significative delle cellule trattate e riossigenate rispetto alle cellule controllo; §§ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$ differenze significative delle cellule riossigenate rispetto a quelle trattate. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.

B

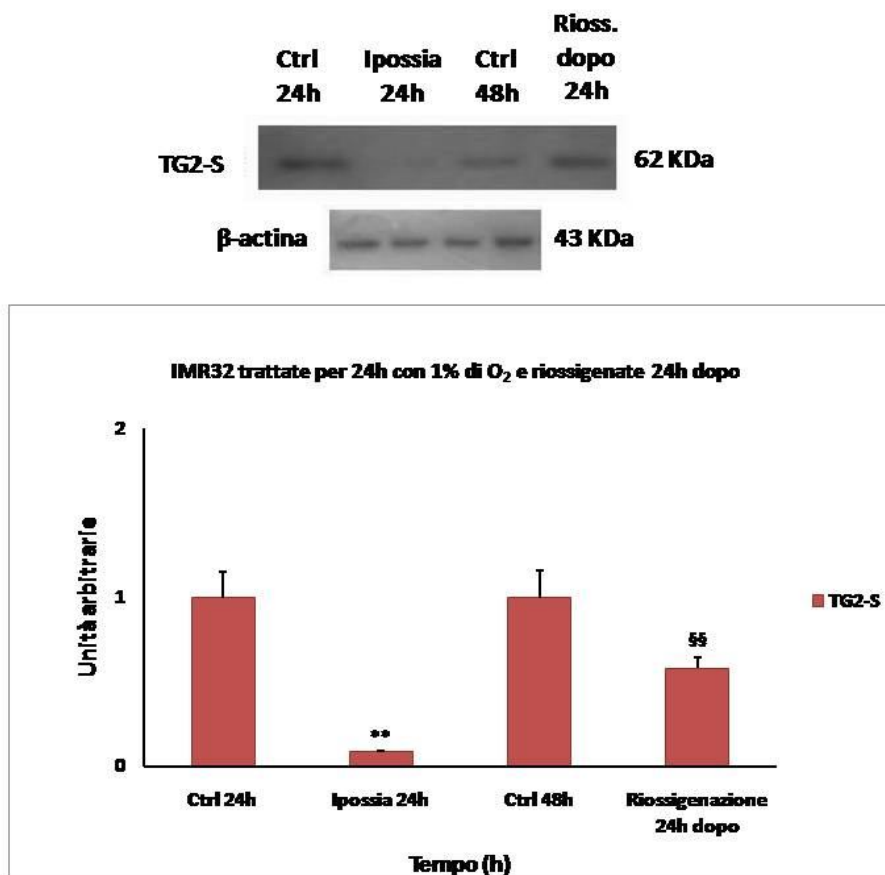


Figura 42. B) Saggio Western Blot ed analisi densitometrica dei livelli proteici di TG2-S nelle IMR-32 trascorse 24 h di ipossia.

** $p < 0.01$ differenza significativa delle cellule trattate rispetto alle cellule controllo; §§ $p < 0.01$ differenza significativa delle cellule riossigenate rispetto a quelle trattate. L'analisi statistica è stata eseguita con il test t di Student.

L'analisi del ciclo cellulare sia tramite la valutazione dell'espressione delle cicline in Real Time PCR sia per mezzo del citofluorimetro ci consente di completare la visione d'insieme dell'effetto dell'ipossia su una linea cellulare di neuroblastoma più invasiva. A conclusione del trattamento ipossico di 4 ore si osserva poca variazione di tutte le cicline rispetto al controllo, di cui la più espressa è la ciclina E1 (1,86 volte vs controllo), indice del superamento della fase G1 e della progressione del ciclo cellulare. Questo fenomeno è spiegato anche dall'aumento dell'inibitore delle cicline D ovvero p16 (2,31 vs controllo), la cui espressione rimane pressoché la stessa durante la riossigenazione, nella quale piuttosto i livelli di mRNA delle cicline E1 e B1

diminuiscono rispetto alle cellule in ipossia. Infine, in questa condizione di ripresa, l'espressione delle rimanenti cicline, ovvero la ciclina D1 e la ciclina A1, risulta praticamente invariata quando paragonata a quella delle cellule controllo e trattate.

Invece dopo 24 h di ipossia si nota un aumento abbastanza significativo della ciclina D1 di 2,66 volte rispetto al controllo, ma ancora di più una trascrizione considerevole della ciclina B1 o M, coinvolta nella fase mitotica, pari a 13,55 volte se paragonata sempre alle cellule IMR-32 in condizioni di normossia. Durante la riossigenazione la situazione si ripristina, con livelli di mRNA delle cicline confrontabili alle cellule controllo. Questi risultati concordano anche con quanto ricavato dalla prova in citofluorimetria, dove si riscontra una diffusione piuttosto omogenea delle cellule IMR-32 nelle varie fasi del ciclo cellulare. In tal caso le percentuali più rilevanti sono quelle delle cellule ipossiche in fase G1 (65,9%) ed in fase G2, che predispone alla fase M (14,09%).

Quindi, a differenza delle SHSY5Y, il ciclo cellulare prosegue e non si rileva un arresto in fase G1, in accordo con quanto riscontrato in lavori dove si mette in luce che gli alti livelli di espressione di N-MYC, sequestrando strettamente la proteina controparte MAX, superano e annullano l'attività inibitoria di HIF-1 α sulla trascrizione della ciclina D dipendente da N-MYC stesso (Qing et al., 2010).

Inoltre N-MYC ed HIF-1 α collaborano per favorire la glicolisi e la crescita delle cellule in presenza di basse disponibilità di ossigeno (Keith et al., 2011). Pertanto dai risultati ottenuti ed illustrati successivamente nella figura 43 (A, B e C) si può supporre che l'ipossia stimoli la linea cellulare di neuroblastoma IMR-32 verso una via proliferativa.

A

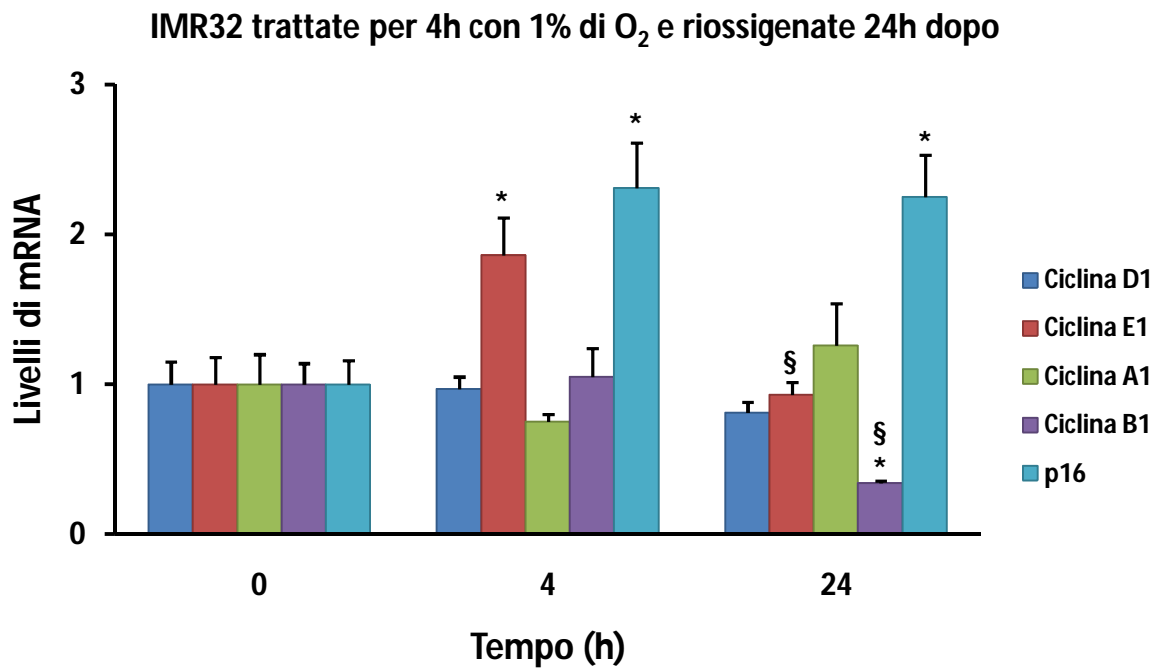
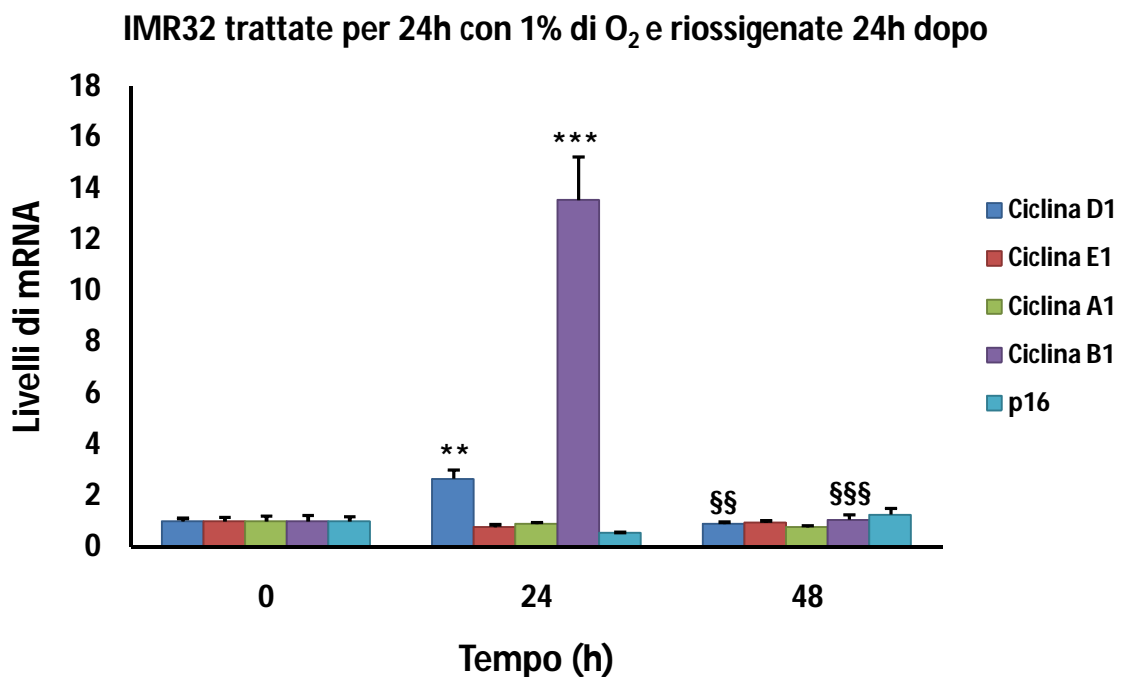


Figura 43. A) Analisi espressione genica delle cicline e p16 delle IMR-32 trattate in ipossia per 4h. * $p < 0.05$ differenza significativa delle cellule trattate e riossigenate rispetto al controllo; § $p < 0.05$ differenza significativa delle cellule riossigenate rispetto a quelle ipossiche. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.

B



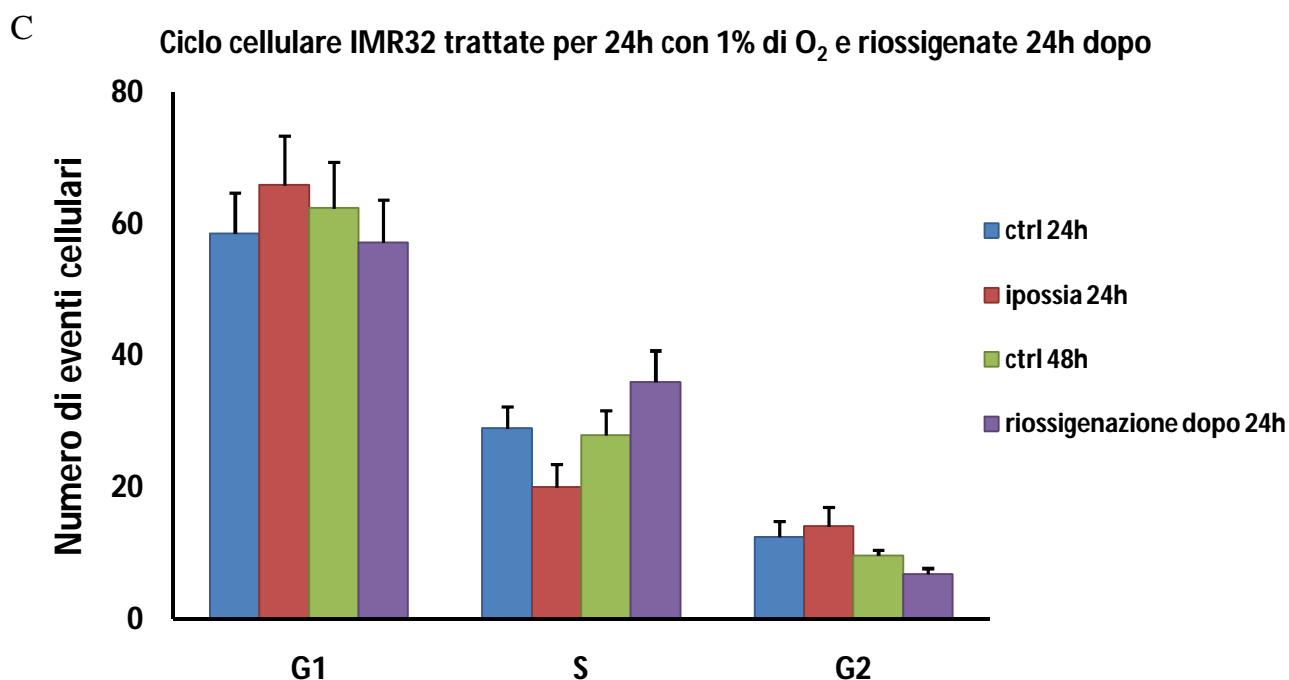


Figura 43. B) Analisi espressione genica delle cicline e p16 delle IMR-32 trattate in ipossia per 24h. $**p<0.01$, $***p<0.001$ differenze significative delle cellule trattate rispetto alle cellule controllo; $§§p<0.01$, $§§§p<0.001$ differenze significative delle cellule riossigenate rispetto a quelle trattate. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni. C) Analisi tramite citofluorimetro a flusso BD FACSCanto II del ciclo cellulare delle IMR-32 esposte per 24 h ad ipossia. L'analisi statistica è stata eseguita con il test t di Student.

Infine, come per la linea cellulare SHSY5Y, si esamina l'espressione in Real Time PCR delle proteine di adesione E-caderina (CDH-1), N-caderina (CDH-2), VCAM, ICAM e delle metalloproteasi 2 e 9 (MMP-2 ed MMP-9).

Trascorso il periodo di trattamento ipossico acuto di quattro ore si evidenzia un aumento netto di poco più di tre volte di entrambe le caderine rispetto alle cellule di neuroblastoma in normossia, ma non si nota una differenza di espressione significativa tra di loro tale da considerare che una prevalga sull'altra. Invece, durante la riossigenazione successiva delle cellule, CDH-1 si riduce in modo ragguardevole rispetto alle IMR-32 ipossiche, mentre CDH-2 rimane pressappoco invariata rispetto al controllo.

Dopo 24 h di ipossia non si osservano significative variazioni dei livelli di mRNA delle due caderine rispetto al controllo e lo stesso vale per le cellule che subiscono la ripresa in condizioni di pressioni di ossigeno ambientali. Sembrerebbe comunque che

nelle cellule esposte a basse concentrazioni di ossigeno per 24 h sia CDH-1 sia CDH-2 tendono a diminuire e questa risposta potrebbe trovare conformità con la rivelazione che nel neuroblastoma ad alto rischio, in cui N-MYC è amplificato, esiste un'importante correlazione tra la riduzione dell'espressione dell'RNA messaggero e della proteina dell'N-caderina e la prognosi sfavorevole del tumore (Lammens et al., 2012). Quanto appena discusso si mostra nella figura 44 (A e B).

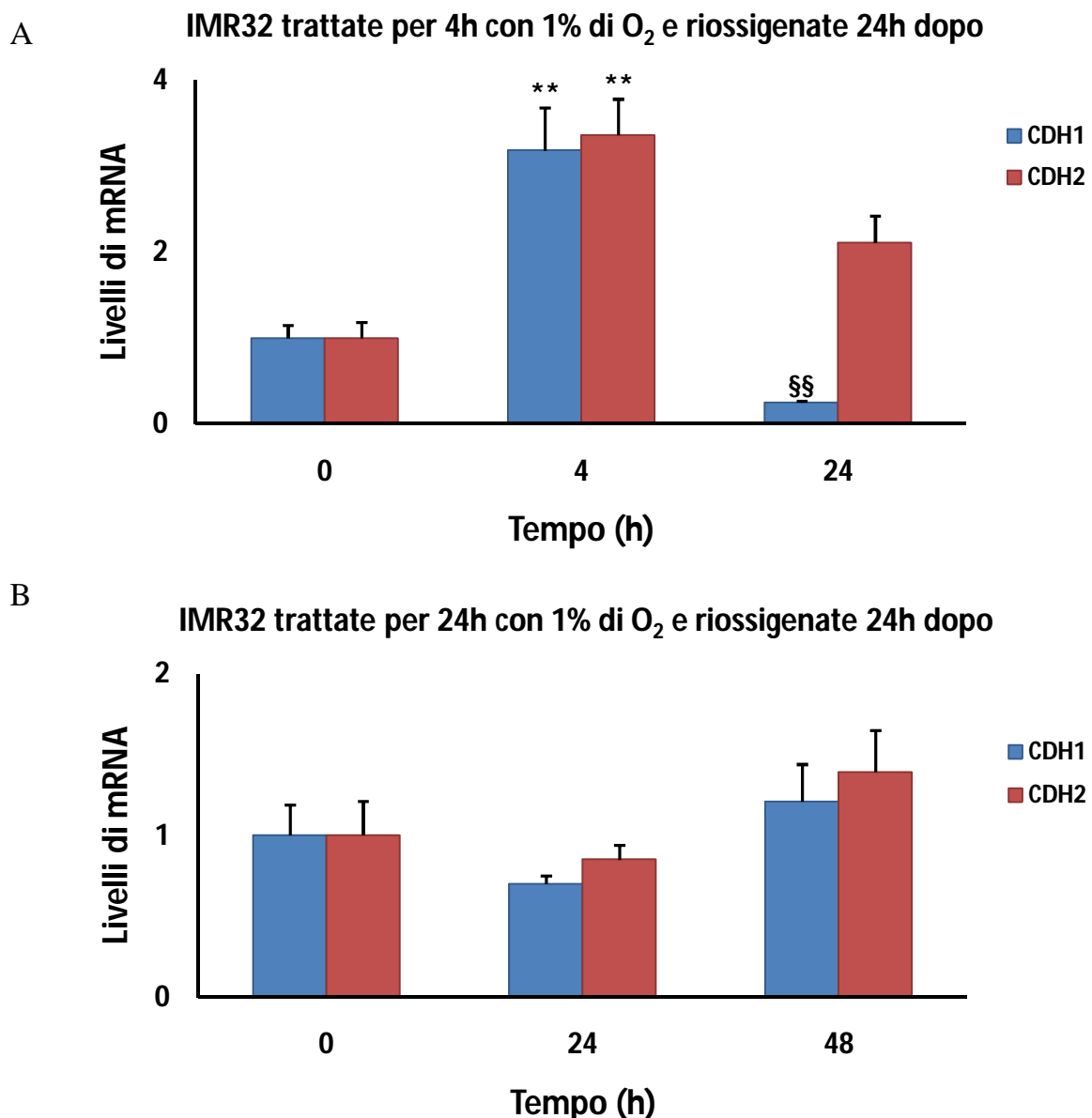


Figura 44. A) e B) Analisi espressione genica delle caderine epiteliale (CDH1) e neurale (CDH2) delle IMR-32 esposte ad ipossia per 4h e 24h. ** $p < 0.01$ differenza significativa delle cellule trattate rispetto alle cellule controllo; §§ $p < 0.01$ differenza significativa delle cellule riossigenate rispetto a quelle trattate. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.

L'espressione delle molecole di adesione ICAM e VCAM non variano in modo sufficientemente significativo nelle cellule IMR-32 esposte ad un trattamento ipossico acuto di 4 h, anche se è evidente una loro diminuzione rispetto alle cellule in normossia. Invece nel periodo di riossigenazione successivo la quantità dell'RNA messaggero di entrambe queste proteine aumenta in modo netto sia rispetto alle cellule ipossiche (ICAM 1,23 versus 0,38) sia rispetto al controllo (VCAM 2,26 versus 0,68 e versus controllo).

Contrariamente, alla fine di un'ipossia giornaliera, si nota solo una maggiore espressione dell'mRNA di ICAM e non di VCAM (3,178 versus 0,59) rispetto alle cellule in normossia, mentre nelle IMR-32 in condizioni di ripresa ICAM rimane pressoché invariato se paragonato alle cellule ipossiche ed invece l'mRNA di VCAM aumenta di tre volte circa in confronto al controllo ed alle cellule trattate .

Sebbene lavori di ricerca evidenziano da un lato la correlazione tra la presenza di ICAM-1 e VCAM-1 e la differenziazione cellulare in colture di neuroblastoma SK-N-SH ed SK-N-MC e dall'altro la capacità di ICAM-2 N-glicosilata di sopprimere il potenziale metastatico ma non tumorigenico di cellule di neuroblastoma SK-N-AS (Feduska et al., 2013; Obregon et al., 1997); nella coltura cellulare di neuroblastoma IMR-32, più aggressiva rispetto a quelle appena nominate, il ruolo di queste proteine di adesione deve essere ancora adeguatamente esplorato.

La figura 45 (A e B) illustra i risultati descritti nel testo.

A

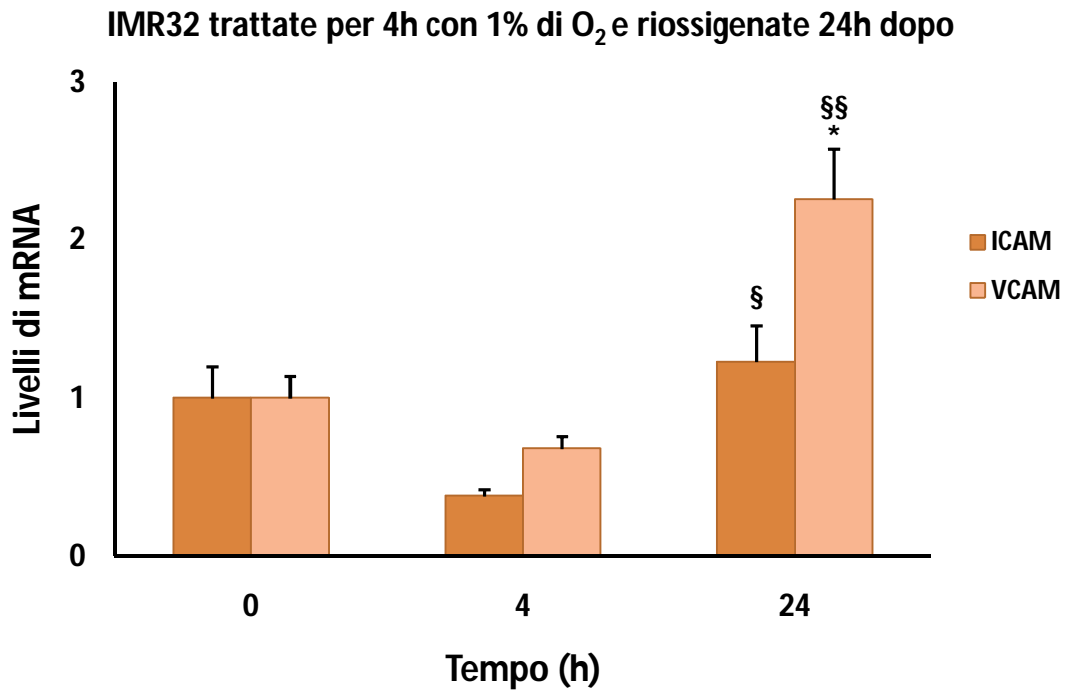


Figura 45. A) Analisi espressione genica delle proteine di adesione ICAM e VCAM nelle IMR-32 trattate in ipossia per 4h. * $p < 0.05$ differenza significative delle cellule riossigenate rispetto alle cellule controllo; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ differenze significative delle cellule riossigenate rispetto a quelle trattate. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.

B

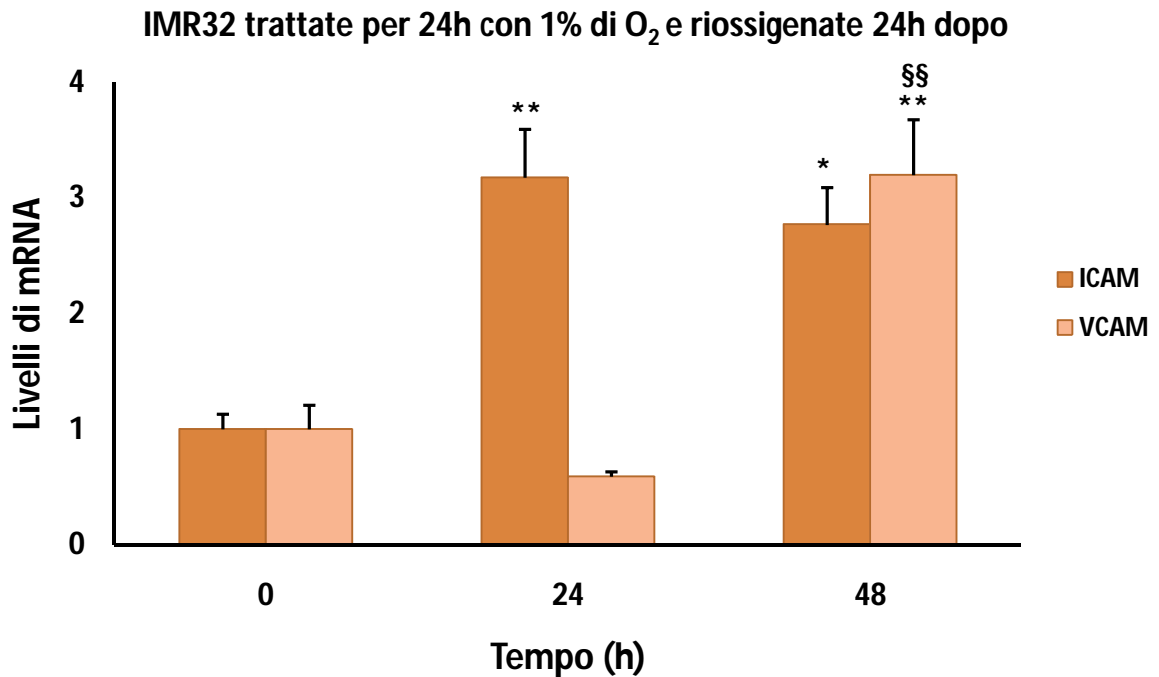


Figura 45. B) Analisi espressione genica delle proteine di adesione ICAM e VCAM nelle IMR-32 trattate in ipossia per 24h. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ differenze significative delle cellule trattate e riossigenate rispetto alle cellule controllo; §§ $p < 0.01$ differenza significativa delle cellule riossigenate rispetto a quelle trattate. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.

Interessante è l'esito della Real Time PCR delle metalloproteasi 9 e 2, markers dell'invasività tumorale.

Nelle cellule IMR-32 sottoposte ad un'ipossia acuta di quattro ore si osserva un considerevole aumento di espressione solo delle MMP-9 (4,59 volte versus controllo), che si riduce drasticamente nelle 24 h di riossigenazione seguente, mentre la MMP-2 non varia significativamente in nessun caso, così da essere paragonabile alle cellule in normossia. Invece al termine del trattamento ipossico di 24 h non si notano differenze ragguardevoli sia di MMP-2 sia di MMP-9 tra cellule esposte e riossigenate rispetto a quelle controllo, anche se la MMP-9 aumenta durante la riossigenazione quando paragonata alle cellule ipossiche. E' degno di nota ricordare che la MMP-9 non svolge solo un'azione extracellulare di degradazione della matrice ma anche potrebbe attivamente partecipare ad alcuni passaggi della divisione cellulare, in quanto si

osserva una sua precisa e dinamica distribuzione all'interno delle cellule di neuroblastoma in mitosi, soprattutto nelle sue fasi iniziali, favorendo diversi fenomeni di questo fine processo (Sans-Fons et al., 2010).

I grafici sopra discussi si illustrano nella figura 46 (A e B).

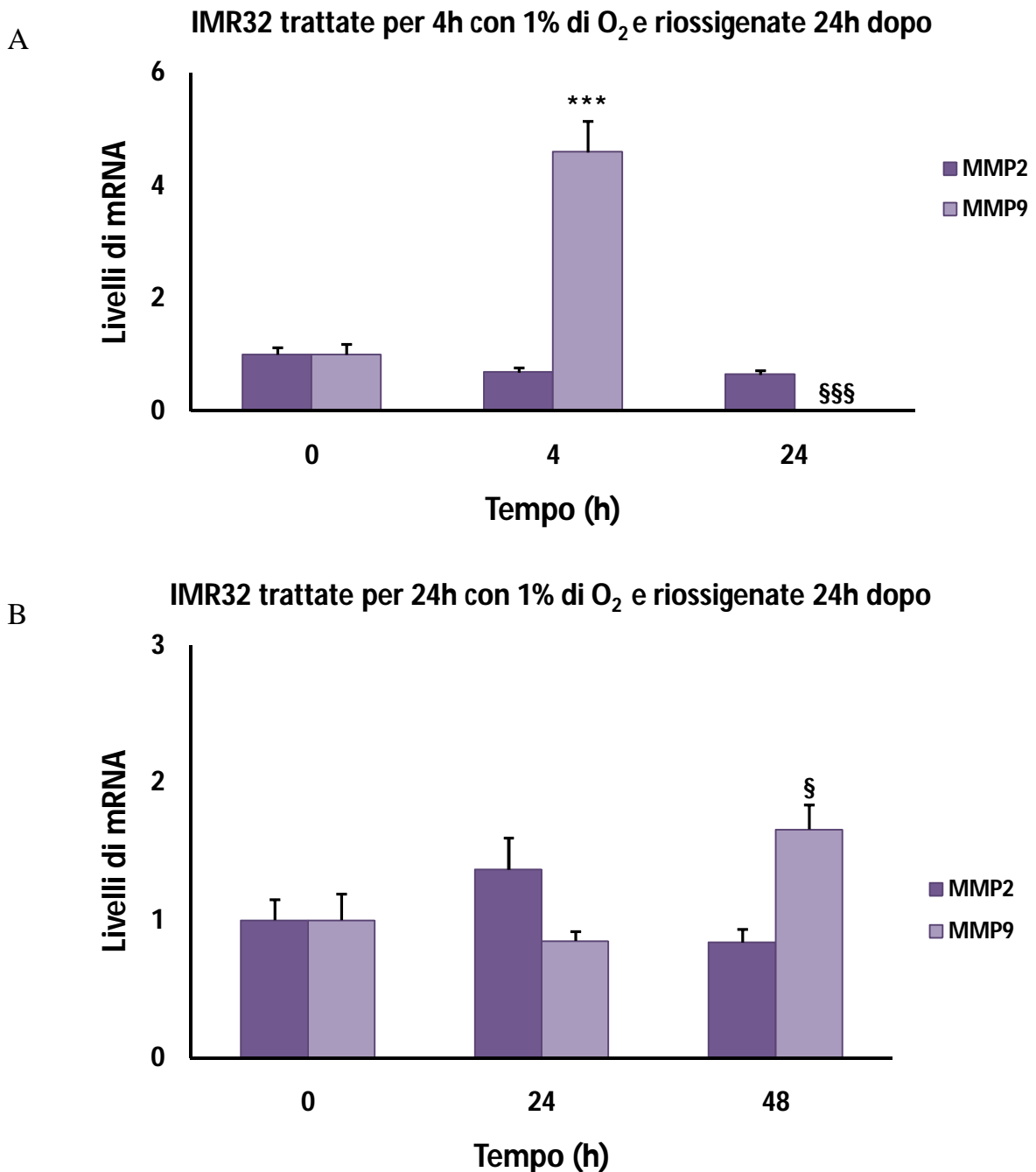


Figura 46. A) e B) Analisi espressione genica delle metalloproteasi MMP-2 ed MMP-9 nelle IMR-32 trattate in ipossia per 4h e 24h. * $p < 0.001$ differenza significative delle cellule trattate rispetto alle cellule controllo; § $p < 0.05$, \$\$\$ $p < 0.001$ differenze significativa delle cellule riossigenate rispetto a quelle trattate. L'analisi statistica è stata eseguita con il test ANOVA ad una via seguito dal test Bonferroni.**

CONCLUSIONI

Questo lavoro di ricerca sperimentale si propone di valutare i possibili meccanismi biochimici che regolano il comportamento di uno dei più comuni ed enigmatici tumori infantili, ovvero il neuroblastoma, quando esso si trova nella frequente condizione di ipossia.

Gli interessanti risultati ottenuti in questo studio iniziale permettono di provare a delineare probabili scenari dell'azione della carenza di ossigeno su colture cellulari di neuroblastoma, nello specifico le SHSY5Y e le IMR-32, che mimano in vitro due fenotipi cancerogeni, rispettivamente meno aggressivo (proto-oncogene *N-MYC* non amplificato) e più aggressivo (proto-oncogene *N-MYC* amplificato).

La risposta delle due colture cellulari ai due tipi di stimolo ipossico, ovvero uno breve di quattro ore, tanto da considerarsi acuto, ed uno lungo pari ad un giorno intero, mostra le sue maggiori differenze soprattutto quando il trattamento in ipossia si prolunga nel tempo.

In particolare le SHSY5Y, dopo un'esposizione all'1% di ossigeno per 24 h, presentano una mortalità significativa, probabilmente tramite una via apoptotica alternativa a quella classica mitocondriale, giustificata anche da un evidente danno al DNA valutato dal comet assay. Come atteso nelle cellule di questa linea si scatenano i meccanismi adattativi alla nuova situazione ambientale, permessi dall'accumulo ed attivazione di HIF-1 α e soprattutto HIF-2 α e dei geni a valle e tra questi innanzitutto il VEGF. Sorprendente è l'espressione della transglutaminasi 2 come enzima stimolato dall'ipossia, la cui componente prevalente è la sua forma alternativa corta o TG2-S. L'analisi del ciclo cellulare sia tramite l'esame dell'espressione delle cicline in Real Time PCR sia per mezzo del citofluorimetro evidenzia un rallentamento o arresto in fase G1, spiegato dall'inibizione della ciclina D ad opera del fattore 1 indotto dall'ipossia.

Infine intrigante è la valutazione della presenza degli mRNA delle molecole di adesione cellulari E-caderina ed N-caderina, intercellulare ICAM e vascolare VCAM e

delle metalloproteasi. Mentre queste ultime sono praticamente assenti o presenti in modo non significativo e le due caderine non variano rispetto alle cellule in normossia, anche se l'N-caderina è sempre lievemente superiore a quella epiteliale, spicca l'espressione di VCAM ed ancora di più di ICAM.

Lo sguardo d'insieme di questi primi risultati indirizza verso l'ipotesi che l'ipossia giornaliera inneschi una serie di fenomeni che conducono le cellule di neuroblastoma SHSY5Y alla differenziazione verso un fenotipo neuronale. Questi fenomeni per l'appunto sono l'arresto delle cellule in fase G1, accompagnato dalla loro maggiore mortalità per apoptosi, la presenza di TG2-S coinvolta nei processi differenziativi proprio nel neuroblastoma, la scarsa presenza delle proteine deputate all'invasione tumorale, ovvero le metalloproteasi, e l'accumulo di molecole di adesione ed in particolare ICAM, la cui presenza pare sia correlata alla differenziazione delle cellule di neuroblastoma.

Invece le IMR-32, sottoposte allo stesso trattamento delle SHSY5Y, presentano una buona vitalità cellulare, che tende quasi ad amplificarsi durante il periodo di riossigenazione successivo, confermata da una presenza non significativa dei fattori pro- e anti-apoptotici Bax e Bcl-2 così come dalla mancanza di un danneggiamento del DNA.

La carenza di disponibilità di ossigeno induce una ragguardevole attivazione di HIF-1 α ed una diminuzione della subunità 2 α , in accordo con quanto appurato in bibliografia. Si riscontra l'attesa espressione considerevole del VEGF e la meno attesa presenza della transglutaminasi 2 ed in particolare di entrambe le sue isoforme TG2-S e TG2-L, di cui si mette in evidenza il notevole aumento di espressione della forma lunga proprio durante l'ipossia giornaliera. L'analisi del ciclo cellulare mostra una ragguardevole trascrizione soprattutto della ciclina mitotica B ed una maggiore distribuzione delle cellule in fase G1 ed in fase G2, indice di una progressione della crescita cellulare.

Le molecole di adesione e le metalloproteasi presentano un comportamento che deve essere ulteriormente verificato. Nello specifico le caderine epiteliali e neurali si esprimono in modo quasi uniforme tra di loro ed anche per le metalloproteasi non si riscontra una significativa presenza. Infine è da comprendere il ruolo della rilevante

espressione di ICAM in questa coltura di neuroblastoma in condizioni di ipossia giornaliera.

Gli esiti ottenuti per la linea cellulare IMR-32 inducono all'intrigante idea che l'ipossia stimoli fortemente la proliferazione di queste cellule di neuroblastoma, rendendo il tumore ancora più pericoloso ed invasivo. In particolare è interessante ed inattesa la rilevazione delle due isoforme della transglutaminasi 2 in ipossia, di cui è già provato che TG2-L agisca per stimolare la proliferazione cellulare in contrasto con TG2-S.

In conclusione questo primo approccio alla scoperta dei processi scatenati dall'ipossia nelle due differenti colture cellulari di neuroblastoma apre interessanti orizzonti sulla comprensione sempre più specifica del comportamento di questa neoplasia maligna. Inoltre offre ulteriori spunti di riflessione alla clinica ed alla chirurgia pediatrica sulla possibilità o sul rischio di applicare tecniche come la chirurgia mininvasiva per le biopsie di tale tumore, proprio a causa dell'ambiente ipossico creato dall'insufflazione di anidride carbonica.

Pertanto gli obiettivi futuri puntano ad ulteriori approfondimenti e conferme dei risultati ottenuti, rivolgendo soprattutto un particolare sguardo al ruolo della transglutaminasi 2 e delle molecole di adesione quali ICAM e VCAM nelle IMR-32.

BIBLIOGRAFIA

Ackermann S, Goeser F, Schulte JH, et al. Polo-like kinase 1 is a therapeutic target in high-risk neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2011;17(4):731–41

Ai L, Kim WJ, Demircan B, et al. The transglutaminasi 2 gene (TGM2), a potential molecular marker for chemotherapeutic drug sensitivity, is epigenetically silenced in breast cancer. *Carcinogenesis* 2008;29:510–8

Akimov SS, Belkin AM. Cell-surface transglutaminasi promotes fibronectin assembly via interaction with the gelatinbinding domain of fibronectin: a role in TGF- β -dependent matrix deposition. *Journal of Cell Science* 2001; 114(16):2989–3000

Akimov SS, Krylov D, Fleischman LF, Belkin AM. Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectina. *Journal of Cell Biology* 2000;148(4):825–838

Alarcon T, Jensen HJ. Quiescence: a mechanism for escaping the effects of drug on cell populations. *J R Soc Interface* 2011;8(54):99–106

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Biologia molecolare della cellula*. Edizione Zanichelli (quarta edizione) 2004

Amler LC, Schurmann J, Schwab M. The DDX1 gene maps within 400 kbp 5' to MYCN and is frequently coamplified in human neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;15:134–37

Antonyak MA, Jansen JM, Miller AM, et al. Two isoforms of tissue transglutaminase mediate opposing cellular fates. *PNAS* 2006;103(49):18609–18614

Attiyeh EF, London WB, Mosse YP, et al. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2005;353:2243–53

Axelson H, Fredlund E, Ovenberger M, et al. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells--a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16(4-5):554–63

Balamuth NJ, Wood A, Wang Q, et al., Serial transcriptome analysis and cross species integration identifies *CENPE* as a novel neuroblastoma target. *Cancer Res* 2010;70(7): 2749–2758

Barbero S, Mielgo A, Torres V, et al. Caspase-8 association with the focal adhesion complex promotes tumor cell migration and metastasis. *Cancer Res* 2009;69:3755–3763

Battle E, Sancho E, Franci C, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000;2:84–89

Bárdos JI, Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 2005;1755(2):107–120

Bedessem B, Stéphanou A. A mathematical model of HIF-1 α -mediated response to hypoxia on the G1/S transition. *Math Biosci* 2014;248:31–9

Belkin AM. Extracellular TG2: emerging functions and regulation. *FEBS Journal* 2011;278(24):4704–4716

Bell E, Lunec J, Tweddle DA. Cell cycle regulation targets of MYCN identified by gene expression microarrays. *Cell Cycle* 2007;6:1249–1256

Ben-Yosef Y, Miller A, Shapiro S, Lahat N. Hypoxia of endothelial cells leads to MMP-2-dependent survival and death. *The American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2005; 289(5):C1321–C1331

Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 1973;33(11):2643–52

Bindra RS, Crosby ME, Glazer PM. Regulation of DNA repair in hypoxic cancer cells. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:249–260

Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1994;1198:11–26

Bogen D, Wei JS, Azorsa DO, et al. Aurora B kinase is a potent and selective target in MYCN-driven neuroblastoma. *Oncotarget* 2015;6:35247–35262

Bosse KR, Maris JM. Advances in the translational genomics of neuroblastoma: From improving risk stratification and revealing novel biology to identifying actionable genomic alterations. *Cancer* 2016;122(1):20–33

Boyd JM. Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell* 1994;79:1121

Breit S, Ashman K, Wilting J, et al. The N-myc oncogene in human neuroblastoma cells: down-regulation of an angiogenesis inhibitor identified as activin A. *Cancer Res.* 2000;60(16):4596–601

Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med* 2007;85:1301–1307

Bresler SC, Weiser DA, Huwe PJ, et al. ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma. *Cancer Cell.* 2014;26:682–94

Brinkschmidt C, Christiansen H, Terpe HJ, et al. Distal chromosome 17 gains in neuroblastomas detected by comparative genomic hybridization (CGH) are associated with a poor clinical outcome. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:11–13

Brodeur, G. M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev. Cancer* 2003;3:203–216

Brodeur GM, Bagatell R. Mechanisms of neuroblastoma regression. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11(12):704–13

Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, CastelV, Castelberry RP, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993;11:1466–77

Brown JM. Tumor microenvironment and the response to anticancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2002;1:453–8

Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumours: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Research* 1998;58(7):1408–1416

Capasso M, Devoto M, Hou C, et al. Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma. *Nat Genet.* 2009;41:718–23

Capasso M, Sidarovich V, Quattrone A, Tonini GP. Genomic Alterations and Abnormal Cell Cycle in High-Risk Neuroblastoma. Christiansen H, Christiansen NM

(eds): Progressive Neuroblastoma: Innovation and Novel Therapeutic Strategies. *Pediatr Adolesc Med. Basel*, Karger, 2015;20:23–34

Carpenter EL, Mossé YP. Targeting ALK in neuroblastoma--preclinical and clinical advancements. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012;9:391–9

Cavallaro U, Schaffhauser B, Christofori G. Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett* 2002;176(2):123–8

Cejude-Martin P, Johnson RS. A new notch in the HIF Belt: How hypoxia impacts differentiation. *Dev Cell* 2005;9:575–576

Chappell J, Dalton S. 2013. Roles for MYC in the establishment and maintenance of pluripotency. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;1:3(12)

Chen L, Iraci N, Gherardi S, et al. P53 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2010;70:1377–1388

Chen D, Li M, Luo J, et al. Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem* 2003;278:13595–8

Cohn SL, Pearson AD, London WB, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol.* 2009;27(2):289–97

Corvi R, Savelyeva L, Schwab M. Duplication of N-MYC at its resident site 2p24 may be a mechanism of activation alternative to amplification in human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1995;55:3471–74

Currò M, Montalto AS, Impellizzeri P, et al. CO(2) pneumoperitoneum induces in vitro hypoxic response culminating in apoptosis of human neuroblastoma cells. *J Biol Regul Homeost Agents* 2014;28(3):497–506

Dale JW, von Schantz M, “Dai geni ai genomi: principi e applicazioni della tecnologia del DNA ricombinante”, EdiSES Srl-Napoli, 2004

Dang CV, Kim JW, Gao P, Yustein J. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:51–56

De Gregori J, Leone G, Miron A. Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:7245–7250

de Pontual L, Kettaneh D, Gordon CT, et al. Germline gain-of-function mutations of ALK disrupt central nervous system development. *Hum Mutat* 2011;32:272–6

Di Pietro A, Visalli G, La Maestra S, et al. Biomonitoring of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of subjects with dental restorative fillings. *Mutat res* 2008;650:115–122

Diskin SJ, Capasso M, Diamond M, et al. Rare variants in tp53 and susceptibility to neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 2014;106(4)

Doz F, Roosen N, Rosenblum ML. Metallothionein and anticancer agents: the role of metallothionein in cancer chemotherapy. *J Neurooncol* 1993;17:123–129

Dungwa JV, Uparkar U, MayMT, Ramani P. Angiogenin up-regulation correlates with adverse clinicopathological and biological factors, increased microvascular density and poor patient outcome in neuroblastomas. *Histopathology* 2012;60:911–923

Eckert RL, Fisher ML, Grun D, et al. Transglutaminase is a tumor cell and cancer stem cell survival factor. *Mol Carcinog* 2015;54(10):947–958

Eckert RL, Kaartinen MT, Nurminskaya M, et al. Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol Rev* 2014;94(2):383–417

Edsjö A, Holmquist L, Pålman S. Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. *Seminars in Cancer Biology* 2007;17:248–256

Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, et al. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 2006;440:1222–1226

Farrell F, Lee A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist* 2004;9(Suppl.5):18–30

Farrell AS, Sears RC. MYC degradation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;1:4(3)

Feduska JM, Garcia PL, Brennan SB, et al. N-glycosylation of ICAM-2 is required for ICAM-2-mediated complete suppression of metastatic potential of SK-N-AS neuroblastoma cells. *BMC Cancer* 2013;13:261

Folk JE. Mechanism and basis for specificity of transglutaminase-catalyzed epsilon-(gammaglutamyl) lysine bond formation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1983;54:1–56

Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4–6

Fraij BM, Birckbichler PJ, Patterson MK Jr, et al. A retinoic acid inducible mRNA from human erythroleukemia cells encodes a novel tissue transglutaminasi homologue. *J Biol Chem* 1992;267:22616–22623

Fraij BM, Gonzales RA. A third human tissue transglutaminasi homologue as a result of alternative gene transcripts. *Biochim Biophys Acta* 1996;1306(1):63–74

Gatta G, Botta L, Rossi S, et al. Childhood cancer survival in Europe 1999–2007: results of EUROCORE-5—a population-based study *Lancet Oncol* 2014;15:35–47

Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 1997;277:1669–72

George RE, London WB, Cohn SL, et al. Hyperdiploidy plus nonamplified MYCN confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 2005;23:6466–73

Giannini G, Cerignoli F, Mellone M, et al. High mobility group A1 is a molecular target for MYCN in human neuroblastoma. *Cancer Res* 2005;65:8308–8316

Gilany K, Vafakhah M. Hypoxia: a Review. *JPS* 2010;1(2):43–60

Gogolin S, Ehemann V, Becker G. CDK4 inhibition restores G1-S arrest in MYCN amplified neuroblastoma cells in the context of doxorubicin-induced DNA damage. *Cell Cycle* 2013;12:1091–1104.

Goodman LA, Liu BC, Thiele CJ, et al. Modulation of N-myc expression alters the invasiveness of neuroblastoma. *Clin Exp Metastasis* 1997;15:130–139

Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, et al. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* 2007;11:335–347

Ghosh S, Baltimore D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature* 1990;344:678–682

Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 2004;57:1009–1014

Griffin M, Casadio R, Bergamini CM. Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem J* 2002;368:377–396

Gross J, Favre B, Meyer M. Differentiation-related expression of adhesion molecules and receptors on human neuroblastoma tissues, cell lines and variants. *Int J Cancer* 1992;52:5–91

Gu L, Zhang H, He J, et al. MDM2 regulates MYCN mRNA stabilization and translation in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 2012;31:1342–1353

Gundemir S, Colak G, Tucholski J, Johnson GV. Transglutaminase 2: a molecular Swiss army knife. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823(2):406-19

Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, et al. hypoxia requires Notch signalling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* 2005; 9:617–628

Hallett A, Traunecker H. A review and update on neuroblastoma. *Paediatrics and Child Health* 2012;22:3

Hang J, Zemskov EA, Lorand L, Belkin AM. Identification of a novel recognition sequence for fibronectin within the NH₂-terminal β -sandwich domain of tissue transglutaminasi. *The Journal of Biological Chemistry* 2005;280(25):23675–23683

Hansson LO, Friedler A, Freund S, et al. Two sequence motifs from HIF-1 alpha bind to the DNA-binding site of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:10305–9

Harris AL. Hypoxia – a key regulatory factor in tumor growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38–47

Hatzi E, Murphy C, Zoephel A, et al. N-myc oncogene overexpression down-regulates leukemia inhibitory factor in neuroblastoma. *Eur J Biochem* 2002a;269: 3732–3741

Hatzi E, Murphy C, Zoephel A, et al.. N-myc oncogene overexpression down-regulates IL-6; evidence that IL-6 inhibits angiogenesis and suppresses neuroblastoma tumor growth. *Oncogene* 2002b;21:3552–3561

He T, Wei D, Fabris D, Fenselau C. Intracellular sequestration of anti-tumor drugs by metallothionein, *Cell Mol Biol* 2000;46:383–392

Hernando E, Nahle Z, Juan G, Diaz-Rodriguez E, et al. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature*. 2004;430:797–802

Hickman JA, Potten CS, Merritt AJ, et al. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994;345:319–25

Hockel M, Vaupel P. Tumor Hypoxia: definitions and current clinical, biologic and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:266–76

Holmquist L, Jögi A, Pålman S. Phenotypic persistence after reoxygenation of hypoxic neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 2005;116(2):218–25

Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, et al. Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 2006;10:413–423

Hsu PP, Sabatini D. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 2008;134:703–707

Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, et al. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003;23:9361–9374

Huang R, Cheung N-KV, Vider J, et al. MYCN and MYC regulate tumor proliferation and tumorigenesis directly through BMI1 in human neuroblastomas. *FASEB J* 2011;25:4138–4149.

Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a014415

Huang L, Xu AM, Liu W. Transglutaminase 2 in cancer. *Am J Cancer Res* 2015;5(9):2756–2776

Ibson JM, Rabbitts PH. Sequence of a germ-line N-myc gene and amplification as a mechanism of activation. *Oncogene* 1988;2:399–402

Iolascon A, Giordani L, Moretti A, et al. Structural and functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitor genes (CDKN2A, CDKN2B, and CDKN2C) in neuroblastoma. *Pediatr Res* 1998;43(1):139–44

Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIFa targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001;292:464–468

Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001;158:905–919

Jain M, Nilsson R, Sharma, S, et al. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science* 2012;336:1040–1044

Jang GY, Jeon JH, Cho SY, et al. Transglutaminase 2 suppresses apoptosis by modulating caspase 3 and NF-kappaB activity in hypoxic tumor cells. *Oncogene* 2010;29:356–367

Jin R, Chow VT, Tan PH, et al. Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer, *Carcinogenesis* 2002;23:81–86

Jögi A, Øra I, Nilsson H, et al. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:7021–7026

Jögi A, Vallon-Christersson J, Holmquist L, et al. Human neuroblastoma cells exposed to hypoxia: induction of genes associated with growth, survival, and aggressive behavior. *Exp Cell Res* 2004;295(2):469–87

Joshi S, Guleria R, Pan J, et al. Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Oncogene* 2006;25:240–247

Kaelin Jr WG. Proline hydroxylation and gene expression. *Annual Review of Biochemistry* 2005;74:115–128

Kang J, Rychahou PG, Ishola TA, et al. N-myc is a novel regulator of PI3K-mediated VEGF expression in neuroblastoma. *Oncogene* 2008;27:3999–4007

Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progression. *Nat Rev Cancer* 2011;12(1):9–22

Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2004;36(2):189–204

Kim JW, Gao P, Liu YC, Semenza GL, Dang CV. Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol Cell Biol* 2007;27:7381–7393

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006;3:177–185

- Kim JY, Park JH. ROS-dependent caspase-9 activation in hypoxic cell death. *FEBS Lett* 2003;549:94–8
- Kim SY. Transglutaminase 2 in inflammation. *Front Biosci* 2006;11:3026–35
- Kohl NE, Kanda N, Schreck RR, et al. Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* 1983;35:359–367
- Kohl NE, Legouy E, DePinho RA, et al. Human N-myc is closely related in organization and nucleotide sequence to c-myc. *Nature* 1986;319:73–77
- Knudson AG Jr, Strong LC. Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. *Am J Hum Genet* 1972;24:514–32
- Koppen A, Ait-Aissa R, Koster J, et al. Direct regulation of the minichromosome maintenance complex by MYCN in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 2007;43: 2413–2422.
- Kreissman SG, Seeger RC, Matthay KK, et al. Purged versus non-purged peripheral blood stem-cell transplantation for high-risk neuroblastoma (COG A3973): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14(10):999–1008
- Kumar S, Mehta K. Tissue Transglutaminase Constitutively Activates HIF-1 α Promoter and Nuclear Factor- κ B via a Non-Canonical Pathway. *PLoS One* 2012;7(11):e49321
- Kuncio GS, Tsyganskaya M, Zhu J, et al. TNF-alpha modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells. *Am J Physiol* 1998;274:G240–245
- Lai TS, Liu Y, Li W, Greenberg CS. Identification of two GTP-independent alternatively spliced forms of tissue transglutaminase in human leukocytes, vascular smooth muscle, and endothelial cells. *Faseb J* 2007;21(14):4131–4143
- Lammens T, Swerts K, Derycke L, et al. N-cadherin in neuroblastoma disease: expression and clinical significance. *PLoS One* 2012;7(2):e31206
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch. *Science* 2002;295(5556):858–861
- Lasorella A, Boldrini R, Dominici C, et al. Id2 is critical for cellular proliferation and is the oncogenic effector of Nmyc in human neuroblastoma. *Cancer Res* 2002;62:301–306

Lee HJ, Park MK, Bae HC, et al. Transglutaminase-2 is involved in all-trans retinoic acid-induced invasion and matrix metalloproteinases expression of SH-SY5Y neuroblastoma cells via NF- κ B pathway. *Biomol Ther* 2012;20(3):286-292

Lee J, Kim YS, Choi DH, Bang MS, et al. Transglutaminase 2 induces nuclear factor-kappaB activation via a novel pathway in BV-2 microglia. *J Biol Chem* 2004;279:53725–53735

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479–89

Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* 2001;61:3819–3825

Lin Q, Cong X, Yun Z. Differential hypoxic regulation of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α . *Mol Cancer Res* 2011;9(6):757–765

Liu T, Tee AE, Porro A, et al. Activation of tissue transglutaminase transcription by histone deacetylase inhibition as a therapeutic approach for Myc oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:18682–18687

Löfstedt T, Jögi A, Sigvardsson M, et al. Induction of ID2 expression by hypoxia-inducible factor-1: a role in dedifferentiation of hypoxic neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2004;279:39223–31

Lu S, Saydak M, Gentile V, et al. Isolation and characterization of the human tissue transglutaminase gene promoter. *J Biol Chem* 1995;270:9748–9756

Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, et al. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1991;9:581–91

Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol* 2010;12:247–256

Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes and Development* 2001;15(20):2675–2686

Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell* 2010;40(2): 294–309

Mangala LS, Arun B, Sahin AA and Mehta K. Tissue transglutaminase-induced alterations in extracellular matrix inhibit tumor invasion. *Mol Cancer* 2005;4:33

Mangala LS, Fok JY, Zorrilla-Calancha IR, et al. Tissue transglutaminase expression promotes cell attachment, invasion and survival in breast cancer cells. *Oncogene* 2007;26:2459–2470

Mangala LS, Mehta K. Tissue transglutaminase (TG2) in cancer biology. *Prog Exp Tumor Res* 2005;38:125–38

Mann AP, Verma A, Sethi G, et al. Overexpression of tissue transglutaminase leads to constitutive activation of nuclear factor-kappaB in cancer cells: delineation of a novel pathway. *Cancer Res* 2006;66: 8788–8795

Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010;362(23):2202–11

Maris JM, Weiss MJ, Guo C, et al. Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 2000;18:1888–99

Matlin AJ, Clark F, Smith CW. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(5):386–398

Mattsson ME, Enberg G, Ruusala AI, et al. Mitogenic response of human SH-SY5Y neuroblastoma cells to insulin like growth factor I and II is dependent on the stage of differentiation. *J Cell Biol* 1986;102:1949–1954

Megison ML, Stewart JE, Nabers HC, et al. FAK inhibition decreases cell invasion, migration and metastasis in MYCN amplified neuroblastoma. *Clin Exp Metastasis* 2012;18: 2740–2753

Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006;6:449–458

Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* 2008;8:976–990

Mehta K, Fok JY, Mangala S. Tissue transglutaminase: from biological glue to cell survival cues. *Frontiers in Bioscience* 2006;11(1):173–185

Mehta K, Kumar A, Kim HI. Transglutaminase 2: a multi-tasking protein in the complex circuitry of inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol* 2010;80(12):1921-1929

Mhaouty-Kodja S. Gha/tissue transglutaminase 2: an emerging G protein in signal transduction. *Biol Cell* 2004;96:363–7

Milakovic T, Tucholski J, McCoy E, Johnson JW. Intracellular localization and activity state of tissue transglutaminase differentially impacts cell death. *J Biol Chem* 2004;279:8715–8722

Mirza A, Liu SL, Frizell E, et al. A role for tissue transglutaminase in hepatic injury and fibrogenesis, and its regulation by NF-kappaB. *Am J Physiol* 1997; 272:G281–288

Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, et al. Cyclin D1 and CDK4 activity contribute to the undifferentiated phenotype in neuroblastoma. *Cancer Res* 2008;68(8):2599–609

Moll UM, LaQuaglia M, Bénard J, Riou G. Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995;92:4407–4411

Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System: an INRG Task Force Report. *J Clin Oncol* 2009;27(2):298–303

Montalto AS, Currò M, Russo T, et al. In vitro CO₂-induced ROS production impairs cell cycle in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Pediatr Surg Int* 2013;29(1):51–9

Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, et al. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 2002;277:34287–94

Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. 2008;455(7215):930–5

Mullassery D, Losty PD. Neuroblastoma. *Paediatrics and Child Health* 2016;26:2

Muth D, Ghazaryan S, Eckerle I, et al. Transcriptional repression of SKP2 is impaired in MYCN-amplified neuroblastoma. *Cancer Res* 2010;70:3791–3802

Nagy L, Saydak M, Shipley N, et al. Identification and characterization of a versatile retinoid response element(retinoic acid receptor response element-retinoid X

receptor response element) in the mouse tissue transglutaminase gene promoter. *J Biol Chem*. 1996;271:4355–4365

Nakagawara A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett* 2001;169: 107–14

Nicholas B, Smethurst P, Verderio E, et al. Cross-linking of cellular proteins by tissue transglutaminase during necrotic cell death: a mechanism for maintaining tissue integrity. *Biochemical Journal* 2003;371(2):413–422

Nieto MA. The early steps in neural crest development. *Mech Dev* 2001;105:27–35

Nigg EA. Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:312–317

Obregon E , Punzon MC, Gonzalez-Nicolas J, et al. Induction of adhesin differentiation of human neuroblastoma cells by tumour necrosis factor- α requires the expression of an inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Neuroscience* 1997;9:1184–1193

Odi BO, Coussons P. Biological functionalities of transglutaminase 2 and the possibility of its compensation by other members of the transglutaminase family. *Scientific World Journal* 2014;2014:714561

Oldridge D, Wood AC, Crimmins I, et al. Genetic predisposition to neuroblastoma mediated by a LMO1 oncogene super-enhancer polymorphism. *Nature* 2015;528(7582):418–21

Otto T, Horn S, Brockmann M, et al. Stabilization of N-MYC is a critical function of Aurora A in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 2009;15:67–78

Påhlman S, Stockhausen MT, Fredlund E, Axelson H. Notch signaling in neuroblastoma. *Semin Cancer Biol* 2004;14:365–73

Park D, Choi SS, Ha KS. Transglutaminase 2: a multi-functional protein in multiple subcellular compartments. *Amino Acids* 2010;39:619-31

Park MT, Lee SJ. Cell cycle and cancer. *J Biochem Mol Biol* 2003;36(1):60–5

Persson P, Jögi A, Grynfeld A, et al. HASH-1 and E2-2 are expressed in human neuroblastoma cells and form a functional complex. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:22–31

Petrella BL, Lohi J, Brinckerhoff CE. Identification of membrane type-1 matrix metalloproteinase as a target of hypoxia-inducible factor-2 alpha in von Hippel-Lindau renal cell carcinoma. *Oncogene* 2005;24:1043–1052

Pietras A, Hansford LM, Johnsson AS, et al. HIF-2alpha maintains an undifferentiated state in neural crest-like human neuroblastoma tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:16805–16810

Ponzoni M, Casalaro A, Lanciotti M, et al. The combination of γ -interferon and tumor necrosis factor causes a rapid and extensive differentiation of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1992;52:931–939

Powathil GG, Gordon KE, Hill LA, Chaplain MA. Modelling the effects of cell-cycle heterogeneity on the response of a solid tumour to chemotherapy: biological insights from a hybrid multiscale cellular automaton model. *J Theor Biol* 2012;308:1–19

Pritchard J, Hickman JA. Why does stage 4s neuroblastoma regress spontaneously? *Lancet* 1994;344:869–70

Qing G, Skuli N, Mayes PA, et al. Combinatorial regulation of neuroblastoma tumor progression by N-Myc and hypoxia inducible factor HIF-1 α . *Cancer Res* 2010;70(24):10351–10361

Raabe EH, Laudenslager M, Winter C, et al. Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma. *Oncogene* 2008;27(4):469–76

Rabbani SA, Harakidas P, Guo Y, et al. Synthetic inhibitor of matrix metalloproteases decreases tumor growth and metastases in a synergic model of rat prostate cancer in vivo. *Int J Cancer* 2000;87:276–282

Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death and Differentiation* 2008;15(4):678–685

Reddy CD, Patti R, Guttapalli A, et al. Anticancer effects of the novel 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 hybrid analog QW1624F2-2 in human neuroblastoma. *J Cell Biochem* 2006;97:198–206

Reynolds TY, Rockwell S, Glazer PM. Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res* 1996;56:5754–7

Ritter SJ, Davies PJ. Identification of a transforming growth factor-beta1/bone morphogenetic protein 4 (TGF-beta1/BMP4) response element within the mouse tissue transglutaminase gene promoter. *J Biol Chem* 1998;273:12798–12806

Rofstad EK. Microenvironment-induced cancer metastasis. *Int J Radiat Biol* 2000;76:589–605

Ruan Q, Johnson GV. Transglutaminase 2 in neurodegenerative disorders. *Front Biosci* 2007;12:891–904

Ruas JL, Poellinger L, Pereira T. Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* 2002;277(41):38723–38730

Saikumar P, Dong Z, Patel Y, et al. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene* 1998;17:3401–15

Sanders DS, Blessing K, Hassan GA, et al. Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours. *Mol Pathol* 1999;52:151–157

Sans-Fons MG, Sole S, Sanfeliu C, Planas AM. Matrix metalloproteinase-9 and cell division in neuroblastoma cells and bone marrow macrophages. *Am J Pathol* 2010;177(6):2870–85

Sarkar NK, Clarke DD, Waelsch H. An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochim Biophys Acta* 1957;25: 451–452

Satpathy M, Shao M, Emerson R, et al. Tissue transglutaminase regulates matrix metalloproteinase-2 in ovariancancer by modulating cAMP-response element-binding protein activity. *J Biol Chem* 2009; 284: 15390-15399

Savelyeva L, Corvi R, Schwab M. Translocation involving 1p and 17q is a recurrent genetic alteration of human neuroblastoma cells. *Am J Hum Genet* 1994;55:334–40

Schell M, Bergeron C. Neuroblastoma. *Orphanet Encyclopedia* 2003

Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *THE LANCET Oncology* 2003; Vol 4

Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985;313:1111–6

Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 α . *Brain* 2010;133:983–995

Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000;88:1474–80

Semenza GL. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Pharmacology* 2002;64:993–998

Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annual Review of Physiology* 2014;76:39–56

Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia inducible factor 1. *J Biol Chem* 1994; 269:23757–23763

Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology* 1992;12(12):5447–5454

Skuli N, Liu L, Runge A, et al. Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood* 2009;114(2):469–477

Slack A, Chen Z, Tonelli R, et al. The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:731–736

Soker S, Takashima S, Miao HQ, et al. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoformspecific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92:735–745.

Song L, Ara T, Wu H-W, et al. Oncogene MYCN regulates localization of NKT cells to the site of disease in neuroblastoma. *J Clin Invest* 2007;117:2702–2712

Srinivas V, Zhang LP, Zhu XH, Caro J. Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor α (HIF- α) proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999;260(2):557–561

- Stafman LL, Beierle EA. Cell Proliferation in Neuroblastoma. *Cancers (Basel)* 2016;8(1)
- Sullivan R, Graham CH. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:319–331
- Surveillance, Epidemiology and End Result Database (<http://seer.cancer.gov>), 2015
- Suto N, Ikura K, Sasaki R. Expression induced by interleukin-6 of tissue-type transglutaminase in human hepatoblastoma HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993;268:7469–7473
- Takeuchi Y, Ohashi H, Birckbichler PJ, Ikejima T. Nuclear translocation of tissue type transglutaminase during sphingosine-induced cell death: a novel aspect of the enzyme with DNA hydrolytic activity. *Z Naturforsch C* 1998;53:352–358
- Takita J, Hayashi Y, Kohno T, et al. Deletion map of chromosome 9 and p16 (CDKN2A) gene alterations in neuroblastoma. *Cancer Res* 1997;57(5):907–12
- Tanaka N, Fukuzawa M. MYCN downregulates integrin $\alpha 1$ to promote invasion of human neuroblastoma cells. *Int J Oncol* 2008;33: 815–821
- Tatsukawa H, Furutani Y, Hitomi K, Kojima S. Transglutaminase 2 has opposing roles in the regulation of cellular functions as well as cell growth and death. *Cell Death Dis* 2016;7(6):1–12
- Tee AEL, Marshall GM, Liu PY, et al. Opposing Effects of Two Tissue Transglutaminase Protein Isoforms in Neuroblastoma Cell Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* 2010;285(6):3561–3567
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871–887
- Tian XJ, Liu F, Zhang XP, et al. A two-step mechanism for cell fate decision by coordination of nuclear and mitochondrial p53 activities. *PLoS ONE* 2012;7(6):e38164
- Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, et al. Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* 2000;60:3650–3654
- Tumilowicz JJ, Nichols WW, Cholon JJ, Greene AE. Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res* 1970;30(8):2110-8

Tweddle DA, Malcolm AJ, Cole M. p53 cellular localization and function in neuroblastoma: evidence for defective G1 arrest despite WAF1 induction in MYCN-amplified cells. *Am J Pathol* 2001;158:2067–2077

Valent A, Le Roux G, Barrois M, et al. MYCN gene overrepresentation detected in primary neuroblastoma tumour cells without amplification. *J Pathol* 2002;198:495–501

Valli E, Trazzi S, Fuchs C, et al. CDKL5, a novel MYCN-repressed gene, blocks cell cycle and promotes differentiation of neuronal cells. *Biochim Biophys Acta* 2012;1819:1173–1185

Vaupel P. The Role of Hypoxia-Induced Factors in Tumor Progression. *The Oncologist* 2004;9(suppl 5):10–17

Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:225–39

Wei MC, Zong WX, Cheng EH, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001;292:727–30

Weinstein IB and Zhou P. Defects in cell cycle control genes in human cancer. *Encyclopedia of Cancer*, Bertino, J.R. (ed.), 1997;256–267, Academic Press, New York, New York

Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Science's STKE* 2005;2005(306)

Yaari S, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, et al. Disruption of cooperation between Ras and MycN in human neuroblastoma cells promotes growth arrest. *Clin Cancer Res* 2005;11:4321–4330

Yamashiro DJ, Liu XG, Lee CP, et al. Expression and function of Trk-C in favourable human neuroblastomas. *Eur J Cancer* 1997;33:2054–57

Zhang Z, Faouzi M, Huang J, et al. N-Myc-induced up-regulation of TRPM6/TRPM7 channels promotes neuroblastoma cell proliferation. *Oncotarget* 2014;5:7625–7634

Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed Res Int* 2015;2015:1–13

Zudaire E, Martinez A, Cuttitta F Adrenomedullin and cancer. Regul Pept
2003;112:175–183