

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

Tesi di Dottorato in Farmacologia Clinica e Preclinica
Ciclo XXIV

CHIARA COSTA

L'espressione di fosfolipasi A2 Ca²⁺-dipendenti e Ca²⁺-indipendenti e le ciclossigenasi in melanociti umani e colture cellulari di melanoma maligno.

TESI SPERIMENTALE DI DOTTORATO

Tutor:
Chiar.mo Prof. Renato Bernardini

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

Indice

Premessa	<i>pag. 3</i>
1. Introduzione	<i>pag. 4</i>
1.1 Biologia clinica dei melanomi	<i>pag. 4</i>
1.2 Interazioni tra cellule melanomatose ed endoteliali	<i>pag. 20</i>
1.3 Obiettivi	<i>pag. 21</i>
2. Materiali e Metodi	<i>pag. 22</i>
2.1 Chimici e anticorpi	<i>pag. 22</i>
2.2 Colture cellulari	<i>pag. 23</i>
2.3 Saggio di proliferazione cellulare	<i>pag. 23</i>
2.4 Frazionamento subcellulare	<i>pag. 24</i>
2.5 Western blotting	<i>pag. 25</i>
2.6 Preparazione delle cellule per microscopio confocale a fluorescenza	<i>pag. 25</i>
2.7 Elettroporazione	<i>pag. 26</i>
2.8 L'isolazione totale di RNA e RT-PCR	<i>pag. 28</i>
2.9 Analisi statistica	<i>pag. 29</i>
3. Risultati	<i>pag. 29</i>
4. Discussione	<i>pag. 41</i>
Bibliografia	<i>pag. 46</i>

Parole chiave:

Fosfolipasi A2 Ciclossigenasi Melanoma umano Melanocita Eicosanoide

Premessa:

In questa tesi forniamo nuove prove che le colture cellulari di melanoma umano (M10, M14, SK-MEL28, SK-MEL93, 243MEL, 1074MEL, OCM-1, and COLO38) esprimono, ai livelli di proteina e mRNA, o fosfolipasi A2 (iPLA2) Ca^{2+} indipendente) oppure fosfolipasi citosolica A2 (cPLA2)) e la sua forma fosforilata. I melanociti umani normali contengono i livelli più bassi di ambedue le PLA2. Sono state espresse pure ciclossigenasi 1 e 2 (COX-1 e COX-2) nelle colture cellulari com'è dimostrato dai Western blot. La più notevole espressione genica di iPLA2 e COX-1 è stata trovata in due cellule derivate dal melanoma, M14 e COLO38. I melanociti umani normali e la coltura cellulare melanotica M10 non hanno dimostrato nessuna espressione COX-2. Utilizzando il frazionamento subcellulare, il Western blot e le analisi di microscopio confocale nelle cellule paradigmatiche SK-MEL28 e SK-MEL93, abbiamo dimostrato che iPLA2, COX-1 ed anche cPLA2, sono ugualmente localizzate nel citosol, le strutture membraniformi e le regioni nucleari mentre COX-2 è stata associata in modo preferenziale con il citosol. Gli inibitori selettivi di questi tre enzimi hanno ridotto significativamente il tasso di proliferazione basale nei melanociti o nelle colture cellulari melanocitiche. Questi risultati, associati con l'inibizione della proliferazione cellulare per l'elettroporazione di cellule melanotiche con cPLA2 o anticorpi di COX-2, dimostrano che esiste una possibile correlazione fra l'espressione PLA2-COX e la proliferazione di colture cellulari nel sistema melanocitico. Inoltre, l'alto livello dell'espressione delle PLA2 e COX suggerisce che gli eicosanoidi modulano la proliferazione cellulare e le attività invasive del tumore.

Introduzione

1.1. Biologia clinica dei melanomi

Il melanoma è una neoplasia maligna che origina dai melanociti presenti nello strato basale dell'epidermide, nei bulbi piliferi, più raramente nelle mucose, nell'occhio, nell'orecchio interno e nelle meningi. La cute è colpita nell'85% circa dei casi. Il melanoma cutaneo rappresenta il 3-5% dei tumori della pelle ed è tra questi il più temibile per la sua elevata propensione a sviluppare metastasi, è infatti responsabile del 65% delle morti per cancro della cute (Boring *et al*, 1991).

Con l'eccezione delle più rare forme amelanotiche (melanoma acromico), il melanoma si presenta come una neoformazione pigmentata, più o meno estesa in superficie ed in profondità, con tendenza all'ulcerazione tardiva e a metastatizzazione per via linfatica ed ematica; può insorgere su cute sana o su un nevo melanocitico acquisito o congenito preesistente; in rari casi l'esordio è di tipo metastatico senza che sia evidente la lesione d'origine. Dal punto di vista clinico si distinguono i seguenti istotipi: melanoma a diffusione superficiale; melanoma tipo lentigo maligna; melanoma acrale lentiginoso; melanoma muco-cutaneo; melanoma nodulare; forme rare di melanoma (melanoma desmoplastico, nevo blu maligno, ecc.). La variante più frequente è il melanoma a diffusione superficiale, seguito dal melanoma nodulare (Fig. 1), dal melanoma tipo lentigo maligna e dal melanoma acrale. I primi quattro istotipi hanno una fase iniziale con diffusione "piana" sulla superficie cutanea, che rappresenta la fase di crescita orizzontale (melanoma piano). Dopo un periodo di tempo variabile, questi tumori possono sviluppare componenti nodulari invasive (melanoma piano-cupoliforme). Invece il melanoma nodulare, fin dal primo momento, è un nodulo invasivo in profondità (melanoma cupoliforme) (Fig. 2).

L'incidenza del melanoma è in crescita costante in tutto il mondo, soprattutto tra gli individui giovani. L' Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stimato che annualmente, a livello mondiale, si verificano circa 132.000 nuovi casi di melanoma cutaneo e 66.000 morti per melanoma cutaneo e altri tumori della pelle (The World Health Organization, 2005). Tale aumento di incidenza è superiore a quello di qualsiasi altro tipo di tumore, ad eccezione del cancro del polmone nel sesso femminile. Per questo impressionante aumento di incidenza, tale da supportare il concetto di "epidemia di melanoma", questo tumore ha assunto una valenza di emergenza sanitaria nelle popolazioni maggiormente colpite. Il picco di incidenza è compreso tra i 35 e i 50 anni di età, andando a colpire individui nel pieno della propria attività lavorativa e costituendo così un notevole problema anche dal punto di vista socio-economico.

Il melanoma cutaneo è decine di volte più frequente nei soggetti di ceppo europeo (Caucasici) rispetto alle altre etnie (Ries *et al*, 2004). I tassi di incidenza più elevati, a livello mondiale, si riscontrano in aree molto soleggiate, come l'Australia e la Nuova Zelanda. Gran parte della popolazione infatti è rappresentata da Caucasici di origine europea, con pelle particolarmente chiara, emigrati in zone più vicine all'equatore con indici UV (valori di intensità della radiazione ultravioletta solare) significativamente più alti rispetto a quelli delle zone di provenienza.

In Italia ogni anno si verificano circa 7000 nuovi casi ed oltre 1600 morti per melanoma cutaneo (Parkin *et al*, 2003). Nelle regioni italiane settentrionali la mortalità è, per entrambi i sessi, circa il doppio di quella registrata nelle regioni meridionali. A livello delle diverse sedi anatomiche, l'aumento dell'incidenza è massimo per i melanomi del tronco e minimo per quelli della testa e del collo mentre, per quanto riguarda le estremità, si può rilevare un incremento più marcato a livello delle gambe nelle donne. Numerose ipotesi sono state

avanzate per giustificare il sostanziale aumento di incidenza del melanoma, ma la maggior parte degli studi suggerisce che l'esposizione al sole e ad altre fonti di radiazioni UV rappresenti un fattore critico. L'insorgenza del melanoma sembrerebbe correlata a un'esposizione al sole intensa e intermittente, specialmente in aree cutanee non abitualmente fotoesposte, e allo sviluppo di ustioni solari, in particolare nell'età infantile e adolescenziale (Holly *et al*, 1995; Lew *et al*, 1983; Osterlind *et al*, 1988;

Whiteman and Green, 1994; Elwood and Jopson, 1997; Oliveria *et al*, 2006). È ben noto che l'esposizione eccessiva alle radiazioni UV può provocare danni alla pelle e agli occhi e può ridurre l'efficacia del sistema immunitario. La radiazione UV gioca un ruolo fondamentale nell'eziologia del melanoma in quanto provoca danni al DNA, alle proteine e contribuisce alla produzione di radicali liberi, molecole la cui presenza è deleteria per l'organismo. Inoltre, la deplezione dello strato di ozono sulla terra può contribuire all'aumento di incidenza, a livello globale, del melanoma, poiché radiazioni UV sempre più intense possono raggiungere la superficie della terra (Henriksen *et al*, 1990; Cummins *et al*, 2006).

Tra le radiazioni UV, la radiazione solare UV-A è stata indicata come il principale responsabile. Nell'eziologia della malattia altri fattori solo in parte identificati sono certamente coinvolti (Bataille, 2003).

Tra i vari fattori di rischio, chiamati in causa nell'insorgenza del melanoma, vi sarebbe una predisposizione genetica. Da alcuni studi è emerso che vi sono mutazioni nella linea germinale del gene soppressore tumorale *CDKN2A* (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A), localizzato sul locus 9p21 e che codifica per la proteina p16, la quale ha la funzione di indurre l'arresto del ciclo cellulare nella fase G1. In un numero elevato di famiglie in cui si è vista una predisposizione a sviluppare il melanoma, ma anche in pazienti con melanoma

multiplo o melanoma sporadico, è stata rilevata una correlazione tra l'incidenza del melanoma e mutazioni germinali del gene *CDKN2A* (Kamb *et al*, 1994; Goldstein and Tucker, 2005), ritenuto il più noto gene suscettibile al melanoma. Un ulteriore fattore di rischio è rappresentato dalle alterazioni del gene che codifica per il Recettore 1 della Melanocortina (MC1R) che portano ad un'alterata sintesi di melanina, associata ad un maggiore rischio di sviluppare il melanoma.

Altre alterazioni riguardano geni che controllano le vie di trasduzione dei segnali proliferativi dalla superficie cellulare al nucleo, come i geni *N-ras* (Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog), *BRAF* (V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) e *PTEN* (Phosphatase and Tensin homolog) (Haluska, 2006; Davies *et al*, 2002; Maldonado *et al*, 2003; Curtin *et al*, 2005; Tsao *et al*, 2000; Haluska *et al*, 2006). Da un punto di vista patogenetico, le mutazioni N-ras e BRAF comparirebbero in una fase precoce, quelle PTEN in una fase tardiva della progressione tumorale. Esistono grandi differenze tra Paesi Europei in termini di sopravvivenza dei pazienti con melanoma cutaneo: la sopravvivenza è più alta in quasi tutti i Paesi dell'Europa occidentale. Questo può essere legato a una diagnosi precoce di lesioni superficiali, grazie a un'intensa campagna di prevenzione. La sopravvivenza a 5 anni è prossima al 90% in caso di malattia localizzata, mentre risulta inferiore al 20% per le lesioni con metastasi a distanza (Dickman *et al*, 1999). I melanomi localizzati sugli arti inferiori tendono ad avere una prognosi migliore rispetto a quelli localizzati sulla cute del capo, del collo e del tronco (Dickman *et al*, 1999; Schuchter *et al*, 1996; Clemente *et al*, 1996; Aitchison *et al*, 1995). La sopravvivenza media dei pazienti con melanoma, nonostante l'aumento di incidenza, è migliorata negli anni. Secondo alcuni autori, l'aumento dell'attenzione della popolazione e dei sanitari, e conseguentemente del ricorso a interventi diagnostici, come la biopsia escissionale di lesioni clinicamente dubbie, potrebbe avere

portato all'aumento della diagnosi di forme "indolenti" (cioè a lenta crescita) biologicamente poco aggressive, di incerto impatto sulla mortalità. E' da sottolineare come la diagnosi precoce rappresenti attualmente l'arma più efficace nel ridurre sensibilmente la mortalità per melanoma. La potenzialità di un melanoma primario di sviluppare metastasi può essere valutata utilizzando dei fattori prognostici clinici e istopatologici. I modelli prognostici rappresentano un valido strumento per assegnare i pazienti a diversi gruppi di rischio in base alle aspettative di sopravvivenza, una suddivisione che risulta di particolare importanza nella gestione clinica delle neoplasie. I fattori istopatologici più ampiamente utilizzati sono: la fase di progressione del tumore, il livello di invasione di Clark, l'indice mitotico, i satelliti, l'invasione angio-linfatica, i linfociti infiltranti il tumore, la regressione, lo spessore del tumore secondo Breslow, l'ulcerazione e le metastasi linfonodali.

Nella *fase di crescita radiale*, il melanoma non ha la capacità di formare una massa tumorale o di proliferare nel derma. E' in situ, quando rimane confinato all'epidermide, o microinvasivo, quando mostra un'iniziale, focale infiltrazione del derma papillare. Nella *fase di crescita verticale* (Vertical Growth Phase, VGP), le cellule tumorali hanno acquisito la capacità di sopravvivere e proliferare autonomamente nel derma e formano aggregati o noduli che si estendono al derma reticolare e al sottocute. La possibilità di metastatizzazione è molto rara nei melanomi con crescita radiale, tuttavia si può riscontrare una percentuale di mortalità ,seppur bassa, anche in questi tumori (Elder *et al*, 2005).

Il livello di Clark classifica i melanomi in cinque livelli di invasione (Clark, 1967; Clark *et al*, 1989). La microstadiazione di Clark si basa sulla profondità dell'invasione cutanea, che può essere associata alla malignità delle cellule e quindi alla progressione del tumore. Nei

melanomi di *livello I*, le cellule tumorali sono confinate all'epidermide, al di sopra di una membrana basale intatta, e costituiscono un melanoma "in situ". Nel *livello II*, le cellule di melanoma hanno la capacità di attraversare la membrana basale, di giungere al derma papillare, senza invaderlo totalmente. Al contrario, il *livello III* di invasione rappresenta un vero e proprio tumore con un nodulo a crescita verticale che si espande nel derma papillare, arrivando fino all'interfaccia tra derma papillare e reticolare. Il *livello IV* è caratterizzato dall'infiltrazione delle cellule tumorali tra le fibre collagene del derma reticolare, il quale rappresenta un ambiente meno "ospitale", in cui le cellule tumorali riescono a sopravvivere per aver acquisito nuove caratteristiche. Il *livello V* è caratterizzato dall'infiltrazione delle cellule tumorali nel tessuto adiposo sottocutaneo.

L'indice mitotico viene definito come il numero di mitosi per mm nell'ambito della fase di crescita verticale del tumore. Un alto indice mitotico predice una prognosi infausta (Elder *et al*, 2005).

I satelliti sono dei piccoli noduli neoplastici che possono essere presenti nel tessuto connettivo, separati dal tumore primitivo, e si pensa rappresentino le "*metastasi loco-regionali*" (Day *et al*, 1981). La letteratura distingue i satelliti dalle "*metastasi in-transit*" a seconda che si trovino, rispettivamente, entro o al di là di un raggio di 3 cm dal margine del tumore primario.

La maggior parte dei satelliti è il risultato dell'*invasione angio-linfatica*. Diversi studi hanno mostrato un'associazione tra l'invasione angio-linfatica e una ridotta sopravvivenza

(Borgstein *et al*, 1999; Kashani-Sabet *et al*, 2001; Kashani-Sabet *et al*, 2002; Barnhill and Lugassy, 2004).

Una diretta correlazione tra una maggiore densità di *linfociti infiltranti* il tumore (TILs) e una prolungata sopravvivenza è stata evidenziata (Clark *et al*, 1989; Cook, 1992; Clemente *et al*, 1996; Mihm *et al*, 1996; Tuthill *et al*, 2002). In un modello prognostico proposto da alcuni autori (Clark, 1989), la distribuzione dei linfociti infiltranti il tumore può essere definita come "brisk", quando una densa banda di linfociti infiltranti è presente tra le cellule tumorali e sembra distruggerle e l'intera base del tumore o l'intero tumore risultano infiltrati; "non-brisk", se sono presenti alcuni linfociti infiltranti il tumore; "absent", quando non sono presenti linfociti infiltranti.

La regressione, probabilmente derivante dall'azione dei linfociti T citotossici, si presenta come un'area all'interno del melanoma in cui si riscontra fibrosi, infiltrato linfocitario, vasi, melanofagi e assenza di melanoma (Elder *et al*, 2005). Il valore prognostico della regressione è ancora in fase di discussione.

Allo stato attuale, il nuovo sistema di stadiazione dell'American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Balch *et al*, 2004; Balch, 2002) contempla fattori legati al tumore primario, come lo spessore del tumore e l'ulcerazione, i satelliti, la presenza e il numero di metastasi linfonodali, la presenza e la sede di metastasi a distanza e i livelli sierici dell'enzima Lattico deidrogenasi (LDH), al fine di ottenere una classificazione dei pazienti associata alla probabilità di sopravvivenza (Figg. 3, 4). Il metodo di microstadiazione di Breslow (Breslow, 1970) determina l'effettivo *spessore del tumore*; utilizzando un oculare micrometrico, lo

spessore massimo verticale del melanoma viene misurato nella sezione istologica dalla parte più superficiale dello strato granuloso della cute (o dalla superficie ulcerata) al punto di massima infiltrazione. I cut off di distinzione dei diversi spessori di tumore sono stati recentemente modificati dall'AJCC rispetto a quelli di Breslow. *L'ulcerazione* viene definita come una locale perdita di continuità dell'epitelio lungo tutto il suo spessore, con evidenza di una risposta dell'ospite rappresentata da infiammazione, tessuto di granulazione, fibrina, fibrosi e con assottigliamento, perdita o iperplasia reattiva dell'epitelio adiacente alla periferia dell'ulcerazione. Recentemente, è stato dimostrato che l'ulcerazione è il fattore prognostico più rilevante per lesioni spesse più di 1 mm (Balch *et al*, 2001a; Balch *et al*, 2001b; Ronan *et al*, 1988; Balch *et al*, 1979; Shaw *et al*, 1985; Day *et al*, 1981). *Le metastasi nei linfonodi regionali* possono essere scoperte al momento della diagnosi del tumore primario o in un momento successivo. Il numero di linfonodi coinvolti è altamente predittivo di prognosi.

Dai numerosi studi apparsi in letteratura, risulta che il fattore prognostico più rilevante per i tumori confinati alla sede primaria è lo spessore del melanoma determinato secondo i criteri di Breslow. Se il melanoma, al momento della diagnosi, risulta ancora confinato agli strati cutanei superficiali la prognosi è generalmente buona, con guarigione del paziente. Viceversa, se il melanoma ha raggiunto gli strati più profondi, perché ha avuto tempo di accrescersi prima della sua identificazione ed asportazione, i rischi per la vita del paziente sono molto elevati. La diagnosi precoce di melanoma costituisce, unitamente al corretto intervento chirurgico con analisi istopatologica e con la ricerca del linfonodo sentinella, il più favorevole fattore prognostico per il paziente. Attualmente viene diagnosticato un numero

sempre più cospicuo di melanomi cutanei "sottili" (< 1 mm), generalmente associati ad una buona prognosi, tuttavia una parte di questi può sviluppare recidive e/o metastasi a distanza con esito fatale per i pazienti. Allo stesso tempo, i melanomi più "spessi" possono rimanere localizzati nel sito primario per molti anni. Alla luce di queste osservazioni, è emerso che, sebbene lo spessore secondo Breslow sia il più importante fattore prognostico nel melanoma, per le lesioni "sottili" è indispensabile l'identificazione di altri parametri morfologici e/o molecolari, più strettamente correlati alla biologia delle cellule tumorali, che possano predire la progressione neoplastica e contribuire all'identificazione dei pazienti a maggior rischio di diffusione della malattia, al fine di migliorarne la gestione clinica complessiva.

La presenza di infiammazione e regressione nei melanomi primari è stata considerata un forte indicatore dell'esistenza di una risposta immunitaria antitumorale (Cook, 1992; Fig. 5). Il melanoma cutaneo di stadio I e II (secondo il sistema di stadiazione dell'AJCC) è quasi sempre associato ad un infiltrato infiammatorio cronico, costituito principalmente da linfociti. Alcuni studi hanno dimostrato che la localizzazione e l'estensione dell'infiltrazione da parte di cellule dendritiche e l'espressione delle cellule HLA-DR (Human Leukocyte Antigen-D-related) sono associate alla risposta clinica e ad un'aumentata sopravvivenza (Konstadoulakis *et al*, 1998; Zehntner *et al*,

I . Inoltre, l'infiltrazione da parte dei macrofagi (CD68) è strettamente correlata con la profondità del tumore e l'angiogenesi (Torisu-Itakura *et al*,

II. Tuttavia, la valutazione dei linfociti infiltranti il tumore sembra essere soggetta ad una grande variabilità (Busam *et al*, 2001). Il ruolo centrale dei linfociti T nell'immunità antitumorale è ben nota, tanto che sono stati finora caratterizzati numerosi antigeni associati al melanoma e riconosciuti dai linfociti T. La risposta dei linfociti T a questi antigeni è

eterogenea in quanto gli antigeni possono essere riconosciuti dai linfociti T helper, nell'ambito delle molecole HLA-II (Human Leukemic Antigen II), o dai linfociti T citotossici nell'ambito delle molecole HLA di classe I. Alla luce di queste conoscenze, numerosi studi riguardanti le immunoterapie e i vaccini hanno valutato la presenza dei linfociti T citotossici (che esprimono il recettore CD8) e di quelli helper (che esprimono il recettore CD4) come indice di attività antitumorale e regressione tumorale associate alla risposta immunitaria del paziente (Hakansson *et al*, 1996; Hakansson *et al*, 1998; Hakansson *et al*, 2001; Hakansson *et al*, 2003; Qiang *et al*, 2004; Obata *et al*, 2004; Dissanayake *et al*, 2004). I linfociti citotossici riconoscono antigeni estranei presenti sulla superficie delle cellule. Durante il riconoscimento esprimono il ligando del Fas, che è una molecola legata alla membrana o presente in fase solubile prodotta dalle cellule del sistema immunitario. In seguito al legame con il Fas, espresso dalle cellule bersaglio, viene attivato il programma di morte o apoptosi. Tuttavia, rimane ancora controverso il significato prognostico dei linfociti T infiltranti i tumori solidi (Bodey *et al*, 2000).

Normalmente, l'apoptosi è indotta dal gene oncosoppressore *p53* mediante un meccanismo innescato da un danno al DNA. Il gene oncosoppressore *p53*, coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare, ha un'attività anti-proliferativa e anti-trasformante (Giglia-Mari and Sarasin, 2003) e può causare l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 o indurre apoptosi. E' localizzato nel cromosoma 17 in posizione 17p13.1 e rappresenta la seconda sede più frequente di alterazioni genetiche nei tumori umani, infatti più del 50% dei tumori umani presenta mutazioni di questo gene. Tale osservazione suggerisce che la proteina *p53* funzioni come un attento guardiano che vigila sul genoma e sull'insorgenza di neoplasie, prevenendo la

proliferazione delle cellule che hanno subito un danno genetico (Levine, 1997; Fig. 6). La proteina p53 è localizzata nel nucleo e, quando entra in azione, la sua funzione primaria è rappresentata dal controllo della trascrizione di diversi altri geni. In condizioni fisiologiche, la p53 ha una breve emivita (20 minuti), probabilmente per l'azione proteolitica del sistema mediato dalla ubiquitina e, pertanto, normalmente non risulta rivelabile con metodiche immunostochimiche. La proteina p53 entra invece in gioco, come freno di emergenza, quando il DNA è danneggiato da radiazioni ionizzanti, luce UV o sostanze chimiche mutagene, in tali circostanze la proteina si attiva e va incontro ad importanti modificazioni. Con meccanismi ancora poco compresi, si osserva un rapido aumento dei livelli di p53 e una sua attivazione come fattore di trascrizione. Il prodotto del gene *p53* si lega al DNA e stimola la trascrizione di alcuni geni che mediano due funzioni fondamentali: l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi. L'arresto del ciclo cellulare avviene nella fase G1 tardiva ed è causato dalla trascrizione dell'inibitore delle chinasi ciclina- dipendenti (Cdk) *p21*. Il prodotto del gene *p21* inattiva i complessi ciclina/Cdk inibendo, in questo modo, la fosforilazione di *pRb* (proteina del retinoblastoma) necessaria per la progressione del ciclo cellulare alla fase S. Questa interruzione del ciclo cellulare è importante in quanto dà alla cellula il tempo per riparare il danno al DNA prodotto dall'agente mutageno. La p53 interviene direttamente in questo processo inducendo la trascrizione di *GADD45* (Growth Arrest and DNA Damage), il gene che codifica per una proteina coinvolta nei processi di riparazione del DNA. Se il danno al DNA viene riparato con successo, la p53 attiva un gene chiamato *mdm2* (murine double minute 2) il cui prodotto si lega a sua volta al gene della p53 e lo inattiva, sbloccando in questo modo il ciclo cellulare. Se invece, durante l'arresto del ciclo cellulare, il DNA non può essere riparato in maniera soddisfacente, la p53 come ultimo atto porta la cellula a morte attivando geni che inducono apoptosi. I geni *bax* (Bcl-2-

associated X protein) e *IGF-BP3* (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3) sono due geni che stanno sotto il controllo della p53 e che eseguono l'ordine di morte che parte da essa. Il prodotto del gene *bax* si lega alla proteina Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), un inibitore dell'apoptosi, e ne blocca l'azione; IGF-BP3 si lega invece al recettore dell'IGF (Insulin-like Growth Factor) e induce l'apoptosi presumibilmente bloccando la trasmissione del segnale intracellulare mediato dall'IGF. E' importante sottolineare che l'attivazione trascrizionale dei geni controllati dalla p53, quali *p21*, *GADD45* e *bax*, è di fondamentale importanza per il normale funzionamento del gene *p53* stesso. In accordo con questi dati, è stato osservato che le mutazioni che più frequentemente interessano la p53 colpiscono il dominio con cui la proteina si lega al DNA, precludendo in tal modo la trascrizione di geni che sono sotto il suo controllo. Si ritiene inoltre che la p53 possa interagire con altre proteine, anche se questo meccanismo non è ancora perfettamente compreso. Nelle cellule in cui il gene *p53* è perso o mutato, un danno al DNA non induce l'arresto del ciclo cellulare, l'attivazione dei meccanismi preposti alla riparazione del danno stesso, né l'apoptosi e pertanto tali cellule continuano a proliferare, fino a generare una neoplasia maligna.

Le cellule tumorali hanno mostrato di resistere al programma di morte cellulare con un'alterata espressione di proteine apoptotiche, come la p53, e anche di proteine anti-apoptotiche, eludendo in questo modo i meccanismi di sorveglianza cellulare.

Fra le proteine che hanno attività anti-apoptotica recentemente è stata descritta la survivina, un omodimero di 142 aminoacidi, la più piccola delle IAPs (Proteine Inibitrici dell'Apoptosi) (Salvesen and Duckett, 2002), che risulta espressa in numerosi tessuti fetali e tumori, mentre non è presente nei tessuti adulti normali (Adida *et al*, 1998; Kawasaki *et al*, 1998; Swana *et al*, 1999). Il gene della survivina è localizzato nel cromosoma 17 in posizione 17q25 e la

sua trascrizione risulta essere dipendente dal ciclo cellulare (Li *et al*, 1998). La survivina è coinvolta in varie funzioni essenziali per la cellula, come la mitosi, l'apoptosi, la risposta allo stress cellulare e in diversi meccanismi chiave per l'integrità genomica (Fig. 7). L'espressione di questa proteina si riscontra soprattutto durante la fase G2/M del ciclo cellulare (Li *et al*, 1998); essa svolge un ruolo importante nel controllo della divisione cellulare attraverso l'associazione con la chinasi Aurora B, la proteina INCENP (Inner Centromere Protein) e la proteina Borealin/Dasra B nel "chromosomal passenger complex" (Li, 2003; Gassmann *et al*, 2004), in cui la survivina è essenziale per la corretta segregazione cromosomica e la citochinesi (Vong *et al*, 2005; Li and Ling, 2006). La survivina è inoltre coinvolta nella formazione del fuso mitotico, dove può influenzare la stabilità dei microtubuli (Giodini *et al*, 2002), e nella progressione del ciclo cellulare delle cellule tumorali, promuovendo la transizione G1/S (Li and Ling, 2006). Recenti studi hanno indicato che questa proteina, non solo è localizzata nell'apparato mitotico e nel centromero/cinetocoro dei cromosomi, ma è anche localizzata nei mitocondri delle cellule tumorali (Li and Ling, 2006). Sono stati distinti due pool subcellulari della survivina (Fortugno *et al*, 2002) ed è stato suggerito che il pool nucleare sia coinvolto nel promuovere la proliferazione cellulare, mentre quello citoplasmatico potrebbe essere coinvolto nel controllo della sopravvivenza (Li *et al*, 2005). Numerosi studi hanno infatti dimostrato che l'espressione della survivina protegge le cellule normali o trasformate dall'apoptosi (Altieri, 2003; Zangemeister-Wittke and Simon, 2004; Wheatley and McNeish, 2005; Altieri, 2006). Il meccanismo con cui la proteina antagonizzi la morte cellulare non è ancora ben chiaro; sembra che la sua funzione di inibizione dell'apoptosi, innescata dalla via estrinseca o intrinseca, sia legata alla sua capacità di inibire direttamente o indirettamente le caspasi (Fig. 8). Probabilmente, in risposta a stimoli apoptotici, la survivina viene rilasciata dai mitocondri nel citoplasma dove si lega alle

caspasi, come la caspasi-9, bloccando in questo modo il processo dell'apoptosi (Dohi *et al*, 2004). Il ruolo cruciale della survivina nella protezione dall'apoptosi è supportato dal fatto che la sua inibizione da parte di RNA antisenso causa apoptosi spontanea (Olie *et al*, 2000), mentre una sua espressione forzata contrasta la morte cellulare indotta da stimoli apoptotici (Li *et al*, 1998).

In aggiunta al trascritto di survivina originariamente identificato, in cellule umane sono state trovate nuove isoforme, derivanti da uno splicing alternativo, denominate survivina-AEx3, survivina-2B, survivina-3B e survivina-2a (Mahotka *et al*, 1999; Mahotka *et al*, 2002; Badran *et al*, 2004; Caldas *et al*, 2005). Queste varianti presentano una diversa localizzazione cellulare e una diversa funzione; la survivina-AEx3 è localizzata a livello nucleare, la survivina-2B nel citoplasma, in particolare nei mitocondri, la survivina-2a è legata ai centromeri dei cromosomi in divisione, mentre la localizzazione della survivina-3B non è ancora ben chiara. Mentre le isoforme AEx3 e 3B conservano l'attività anti-apoptotica, le 2B e 2a presentano una marcata riduzione delle proprietà anti-apoptotiche.

In diversi studi, l'overespressione della survivina è stata associata a resistenza alle terapie e a ridotta sopravvivenza in pazienti con tumore (Zaffaroni *et al*, 2005; Altieri, 2003; Giodini *et al*, 2002; Zaffaroni *et al*, 2002) ed è stata quindi considerata un marker con significato prognostico nell'evoluzione di queste neoplasie.

La proteina p16^{INK4a} è un soppressore tumorale capace di indurre il blocco del ciclo cellulare in G1, contribuendo al controllo della proliferazione cellulare. Il suo gene è localizzato nel cromosoma 9 in posizione 9p21.3 e codifica sia per la proteina p16^{INK4a} che per la p14ARF, trascritte da due diversi esoni. La proteina p16 blocca la progressione del ciclo cellulare alla fase S inibendo le chinasi ciclina-dipendenti Cdk4 e Cdk6 (Ohtani *et al*, 2004). Il substrato

di questi complessi enzimatici è la proteina pRb la cui fosforilazione in fase G1 consente la progressione del ciclo cellulare (Sherr, 1994). Nella fase G1 di una cellula normale, la forma non fosforilata della proteina pRb si lega a un complesso formato da due fattori trascrizionali chiamati E2F-1 (E2F transcription factor 1) e DP-1 (transcription factor DP-1) e, fino a quando si mantiene questa situazione, le cellule rimangono in G1. Se viene segnalata la progressione attraverso il ciclo cellulare, pRb viene fosforilata dai complessi ciclina D/Cdk4 e ciclina D/Cdk6, è resa incapace di legare E2F e porta alla progressione del ciclo cellulare. Il gene della p16 risulta frequentemente mutato o deletato in molti tumori, compreso il melanoma, tanto da essere tuttora in fase di studio al fine di chiarire il suo coinvolgimento nella patogenesi e nella predisposizione verso queste neoplasie (Fig. 9).

Nella patogenesi di numerosi tumori, compreso il melanoma cutaneo, è stato implicato lo stress ossidativo indotto dalle radiazioni UV (Sander *et al*, 2004; Fig. 10). Lo stress ossidativo può danneggiare numerose strutture cellulari e bio-macromolecole, compresi gli acidi nucleici. Tra le quattro basi del DNA, la guanina, con il più basso potenziale di ossidazione, è quella preferenzialmente attaccata dai radicali idrossilici, anche in presenza di bassi livelli di stress ossidativo (Steenken and Jovanovic, 1997). Uno tra i danni ossidativi più frequenti è la formazione della 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG), una base modificata generata dall'ossidazione della deossiguanosina in posizione 8 (Fig. 11), a carico del DNA nucleare e mitocondriale (mtDNA). Se questa modificazione nucleotidica non viene riparata, durante la replicazione la DNA polimerasi inserirà preferenzialmente, come base complementare all'8-OHdG, un'adenina che a sua volta si accoppierà con una timina, portando a una transversione G^AT (G:C^AT:A). Per questo, l'8-OHdG viene considerata una lesione promutagena e un sensibile biomarker del danno ossidativo al DNA (Wallace, 2002; Bjelland and Seeberg, 2003). Queste mutazioni, portando a instabilità genomica, possono dunque condurre a un fenotipo di cellule tumorali più aggressive (Shen *et al*, 2007). Diversi

enzimi svolgono un ruolo di protezione contro lo stress ossidativo, in particolare la 8-oxoguanina DNA-glicosilasi 1 (OGG1), la cui ridotta attività è stata associata ad un aumentato rischio di tumore, e la glucoso-6-fosfato deidrogenasi (G6PD), un enzima coinvolto nella difesa anti-ossidante. L'OGG1 è un enzima specifico per la riparazione delle lesioni 8-OHdG. Esso catalizza in modo specifico l'escissione della base modificata e il ripristino della parte mancante di DNA. L'OGG1 è codificato da un gene localizzato sul cromosoma 3 in posizione 3p26.2 (Arai *et al*, 1997) che, mediante splicing alternativo, dà origine a diverse forme isoenzimatiche (Ia, Ib, Ic, Id, II), di cui la Ia presenta una localizzazione nucleare e tutte le altre una localizzazione mitocondriale (Mukunyadzi *et al*, 2003). E' stato suggerito che alti livelli di 8-OHdG inducono l'espressione dell'OGG1 e che una ridotta attività di questo enzima sia associata ad un aumentato rischio di sviluppare un tumore, per la mancata riparazione dei danni ossidativi al DNA. La G6PD è l'enzima che catalizza la prima reazione della via dei pentoso fosfati, durante la quale si genera il NADPH, un riducente importantissimo nei processi anabolici ma anche un importante cofattore di enzimi che catalizzano la detossificazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), le quali possono causare danno ossidativo al DNA. In tal modo, la G6PD svolge un ruolo importante nella difesa contro gli agenti ossidanti e nel mantenimento dell'equilibrio ossidazione/riduzione nella cellula (Luzzatto and Battistuzzi, 1985; Cheng *et al*, 2004). Il gene che codifica per la G6PD si trova sul cromosoma X in posizione q28 e, per la sua alta variabilità genetica, la G6PD presenta diverse varianti caratterizzate da un ampio range di livelli di attività enzimatica.

1.2. Interazioni tra cellule melanomatose ed endoteliali.

L'interazione cellulare melanocitica con cellule endoteliali (CE) è un passo cruciale che conduce alle metastasi organo-selettive. Si constata che l'adesione delle cellule alle CE è mediata da endogenous 12 (S)-HETE, un metabolita 12-lipossigenasi dell'acido arachidonico (AA) espressa dalle cellule tumorali, per l'attivazione della proteina endoteliale chinasi C [1]. Inoltre, lo strumento condizionato con melanoma applicato alle colture CE induce un effetto di proliferazione, mediato da interleuchine, fattori di crescita e, almeno in parte, dal metabolita dell'AA. L'espressione aumentata di ciclossigenasi-2 (COX-2) e la sintesi successiva de PGE₂ nelle cellule previste sostiene il fenomeno [2]. Gli inibitori della via lipossigenasica e ciclossigenasica del metabolismo dell' AA convertono il melanoma e le cellule di fibrosarcoma umano in un fenotipo non invasivo indicato dalla riduzione degli enzimi metalloproteolitici della matrice del tessuto [3]. La maggior parte delle cellule tumorali producono il metabolita dell'AA, modulando una serie d'effetti biologici che inducono la crescita del tumore e le attività invasive. [3,4]. Insieme, questi studi indicano un ruolo chiave per il metabolita dell'AA nella metastatizzazione della cellula tumorale, ad esempio tramite la cascata PKC-MKK1,2-MAPK, nonché nel controllo della motilità della cellula endoteliale (per lo più tramite il ciclo COX) e la proliferazione (per la cascata lipossigenasi) [5].

La fosfolipasi A₂ catalizza l'idrolisi dei fosfolipidi nella posizione *sn*-2 dove l'AA è esterificato in modo preferenziale. Nelle cellule mammifere, è noto che PLA₂ si trova in isoforme diverse. La PLA₂ citosolica (85 kDa) è attivata dalla fosforilazione MAPK-dipendente nel Ser-505 e per traslocazione alla membrana affinché interagisca con il suo substrato, in modo dipendente dal calcio [6,7]. Un'altra forma di PLA₂ è il Ca²⁺-indipendente (iPLA₂), comunque il suo ruolo funzionale non è ben caratterizzato [8,9]. Recentemente, in

una coltura cellulare del cancro del colon-retto, la prova è stata fornita per il suo coinvolgimento nel rilascio d'AA indotto per il siero e la proliferazione della cellula [10]. Il gruppo VI delle PLA₂ rappresenta alcune delle più nuove PLA₂ scoperte. Il primo gruppo VI PLA₂ identificato è stato citosolico iPLA₂P (o gruppo VI A PLA₂, [9,11]. È espresso in diversi tessuti di numerose specie e in una vasta quantità di tipi cellulari. Comunque, dentro le cellule, iPLA₂P non è soltanto espresso nel citosol, ma è stato identificato principalmente legato alle membrane [12-15]. Inoltre, è stato dimostrato che i mitocondri provenienti dal fegato di un ratto e dal cuore di un coniglio contengono iPLA₂P inattivato da BEL [16,17]. Non è chiaro se iPLA₂ è localizzato nelle membrane microsomatiche e/o i mitocondri nelle cellule di cancro. Lo studio del progetto del genoma umano ha identificato iPLA₂Y, una PLA₂ legata ai microsomi (gruppo VI B PLA₂), la quale è anche inibita da BEL [18], ma è un prodotto genetico distintivo dalla iPLA₂p.

1.3. Obiettivi

In questo studio, ci si è chiesto se le variazioni nell'espressione di ambedue PLA₂ possano essere correlate con il tasso di proliferazione della cellula tumorale. I nostri risultati, con un pannello di cellule di melanoma umano, dimostrano che i più alti livelli d'espressione di iPLA₂ e di cPLA₂ sono stati associati con le cellule più proliferanti. L'espressione di fosfolipasi citosolica A₂ (cPLA₂), nel fenotipo metastatico è stata, infatti, dimostrata prima in alcuni tumori, compresi i melanomi umani. A nostra conoscenza, questa è la prima dimostrazione dell'espressione di iPLA₂ nelle colture cellulari di melanoma maligno umano.

2. Materiali e metodi

2.1. *Chimici e anticorpi*

I chimici di qualità reagenti sono stati comperati da Sigma (St. Louis, MO) o E. Merck (Darmstadt, Germania). Gli anticorpi primari contro cPLA₂ (monoclonale di topo), PLA₂ secretorio (sPLA₂ IIA) (policlonale di coniglio), COX-2 (anticorpo antiumano monoclonale di topo) e il anticorpo cPLA₂ monoclonale di topo coniugato a Alezfluor 488 (cPLA₂ 4-4B-3C) sono stati comperati da Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA). Il iPLA₂ (policlonale di coniglio) anticorpo e COX-1 (policlonale di coniglio) anticorpo sono pervenuti da Cayman Chemical Co., Michigan. Il monoclonale anti-fosfo-cPLA₂ di coniglio è stato ottenuto da Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA). L'inibitore di cPLA₂ e iPLA₂ AACOCF₃ (trifluoromethylketone acido arachidonico), il iPLA₂ inibitore bromoenol lactone (BEL) e COX-2 inibitore specifico NS-398 (N-[2-cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-methane-sulfonamide) sono stati comperati da Sigma (St. Louis, MO). Gli inibitori chinasi wortmannin, LY94002 e PD98059 sono stati comperati da Calbiochem (La Jolla, CA). Campioni di liquido sinoviali sono stati ottenuti da pazienti che soffrono di osteoartrite infiammatoria o che hanno subito il versamento traumatico dell'articolazione, dopo l'appropriato consenso informato, presso il Dipartimento di Churgia generale dell'Università di Catania.

2.2. *Colture cellulari*

Melanociti umani normali sono stati isolati dall'epidermide ricostituito *in vitro* come descritto precedentemente [19]. Tutte le colture cellulari di melanoma umano sono state regali generosi del Laboratorio di Immunologia, Istituto Nazionale Tumori Regina Elena, Roma, e sono state fatte per "subculturing" da 15 a 20 anni. La M14 e la M10 sono colture cellulari umane maligne isolate dal melanoma epidermico. (National Cancer Institute, Bethesda, MD); la SK-MEL28 è una coltura cellulare di melanoma metastatico aderente intermedio invasivo, di allotipo HLA; la SK-MEL93 è una coltura cellulare di suscettibilità del complemento presa dalle metastasi di pazienti; la COLO38 è un melanoma maligno che esprime l'antigene di MPG; la 1074MEL (National Cancer Institute, Bethesda, MD) è stata prodotta dalle metastasi nei pazienti che hanno vissuto le risposte cliniche dall'immunoterapia delle cellule T; la OCM-1 è una coltura cellulare di melanoma oculare coroidale non-metastatico; la 243MEL è una coltura cellulare di melanoma umano in collezione nel Laboratorio di Immunologia, Istituto Nazionale Tumori Regina Elena, Roma. Le cellule sono state cresciute nel medium Roswell Park Memorial Institute (RPMI) che conteneva 2mM di glutamina, antibiotici e 10% del siero Fetal Bovine (FCS).

2.3. *Saggio di proliferazione cellulare*

La proliferazione cellulare, nell'assenza o presenza di PLA₂, COX-2 e degli inibitori delle chinasi di proteina del tipo "upstream", è stata misurata utilizzando un test Crystal violet [20]. Le cellule sono state cresciute prima per 3 giorni nel medium RPMI che conteneva 10% FCS; le cellule a confluenza sono state tripsinnizzate, raccolte e poi messe in micro-piatti di 96 pozzi da 24 o 48 ore. Le cellule sono state placcate con tintura (0,1% in 20% metanolo) solubilizzata in acido d'acetico (10% v/v), e l'intensità colorimetrica nei pozzi è stata misurata a 570 nm (Microplate Reader SLT Lab Instrument, mod. 16887).

2.4. Frazionamento subcellulare

Le cellule di melanoma sono state raccolte per centrifugazione a 600g per 7 minuti, e la pallina è stata risospesa nel buffer di lisi (20mM Hepes-KOH, pH 7.5/10 mM KCl/1.5 mM MgCV1 mM EDTA/1 mM EGTA/1 mM DTT/ miscela d'inibitore proteasi) integrata con 250 mM di saccarosio. Il buffer integrato con 250 mM di saccarosio è chiamato buffer A. La sospensione è stata lasciata in ghiaccio e mescolata periodicamente per 30 minuti. Poi le cellule sono state omogeneizzate utilizzando il dounce, e la lisi è stata controllata per qualità utilizzando il microscopio di contrasto di fasi. La frazionamento subcellulare è stato eseguito secondo Desai et al. [21]. L'omogenato è stato centrifugato(750 g/10 min a 4 °C); il risultante supernatant A è stato raccolto, il pellet è stato lavato due volte con il buffer di lisi, il pellet così lavato è stato conservato in quanto frazione nucleare. Il supernatant A è stato centrifugato (12.500 g/15 min a 4 °C), ed il risultante supernatant B è stato anch'esso conservato. Il pellet è stato lavato una volta con il buffer C e conservato in quanto pellet di membrana pesante. Il supernatant B è stato ultracentrifugato (100.000 g/45 min a 4 °C), e il risultante supernatant C è la frazione citosolica S/100. Il pellet è stato etichettato frazione vesicolare. Il pellet di membrana pesante è stato risospeso nel buffer A e rigirato a 4000 g per 15 min per ottenere il pellet mitocondriale pesante per un ulteriore arricchimento dei mitocondri. Tutte le frazioni subcellulari sono state preservate a -80 °C fino ad ulteriore analisi.

Per l'analisi SDS/PAGE, le frazioni sono state solubilizzate in 0,125% SDS e 0.012 M NaOH, regolate a 1 mg/ml di proteina (Bradford), e somme uguali di proteina sono state caricate per immunoblotting.

2.5. *Western blotting*

Le colture cellulari di melanoma e i melanociti sono state lisate come descritto in precedenza[22]. Il contenuto di proteina del lisato cellulare è stato quantificato dal saggio di Lowry e gli immunoblot sono stati eseguiti come descritto altrove [22]. Le membrane incubate con gli anticorpi primari contro cPLA₂ (monoclonale di topo, 1:500 diluzione), sPLA₂ IIA (policlonale di coniglio, 1:500 diluzione), iPLA₂P (policlonale di coniglio, 1:1000 diluzione), fosfo-cPLA₂ (monoclonale di coniglio, 1:250 diluzione), COX-1 (anticorpo policlonale di coniglio, 1:500 diluzione) e COX-2 (anticorpo monoclonale di topo), 1:500 diluzione). Successivamente le membrane sono state incubate con anticorpi secondari per 1 ora a temperatura ambientale, e gli immunocomplessi sono stati individuati dal reagente di chemiluminescenza aumentata (ECL, Amersham).

2.6. *Preparazione delle cellule per microscopio confocale a fluorescenza*

Per identificare l'espressione e la distribuzione subcellulare di cPLA₂, iPLA₂, COX-1 e COX-2, il microscopio confocale è stato utilizzato su due colture di melanoma (SK-MEL28 e SK-MP93) effettuate in vetrini portaoggetti messe in una piastra da 6 pozzetti. Le cellule sono state fissate aggiungendo 4% di paraformaldeide in PBS ed è stato trattato per immunocitochimica come descritto prima [22] utilizzando gli anticorpi d'anti-cPLA₂, anti-iPLA₂, anti-COX-1 o anti-COX-2. La distribuzione cellulare degli immunocomplessi degli enzimi è stata osservata dal microscopio confocale ad immunofluorescenza utilizzando un microscopio confocale spettrale a scansione laser Olympus FV1000, equipaggiato con un software d'immagine ad alta risoluzione.

2.7. *Elettroporazione*

Le cellule cresciute all'80- 90% di confluenza sono state rimosse dal piatto utilizzando 0,025% tripsina/EDTA a temperatura ambiente. $1.5-2 \times 10^6$ cellule sono state risospese nel medium RPMI che conteneva 10% FCS. I saggi d'elettroporazione sono stati eseguiti per incubazione per 10 min a 4 °C, 10-20 μ g del anticorpo specifico (anti-cPLA₂ o anti-COX-2) con la sospensione cellulare ad un volume di 400 μ l in una cuvetta d'elettroporazione con apertura di 4mm. Le cellule sono state elettroporate alla capacitance di 800 μ F, in combinazione con il voltaggio di 150 V utilizzando un sistema d'elettroporazione Bio Rad Gene Pulser Xcell che ha dato una lunghezza di polso da 40 a 45 ms. La scelta di questa sistemazione è stata basata sulla sperimentazione e la percentuale d'equilibrio della sopravvivenza cellulare con l'incorporazione degli anticorpi. Le cellule elettroporate (1 polso) sono state lasciate nella cuvetta per 10 min a temperatura ambiente, lavate una volta con il medium non-siero Ham per centrifugazione a 1000 rpm per 10 min, e poi trasferite a un piatto Petri di 60mm che contiene il medium RPMI + 10% FCS. Più dell'80% delle cellule erano vitali dopo il lavaggio. Le cellule sono state raschiate 12 ore dopo il placcamento, lisate in PBS contenente 0,5% Triton X-100, e le cellule lisate sono state separate dal SDS-PAGE in un gel poliacrilammide al 10% per esaminare l'incorporazione anticorpale con la tecnica del Western blotting. Fasce di proteina sono state trasferite a una membrana di nylon che è stata macchiata con l'anticorpo secondario. Mentre le cellule elettroporate con l'anticorpo cPLA₂ o COX-2 hanno mostrato il macchiarsi delle fasce elettroforetiche, le cellule di controllo non hanno mostrato tale processo. Inoltre, questi dati sono stati corroborati qualitativamente visualizzando microscopicamente nelle cellule funzionalmente intatte la fluorescenza intracellulare dell'anticorpo cPLA₂ dopo l'elettroporazione fatta usando degli anticorpi cPLA₂ coniugati ad AlexaFluor 488.

Le cellule fluorescenti sono state considerate elettroporate con successo. I test di proliferazione cellulare sono stati eseguiti come descritto sopra. I controlli hanno compreso cellule mescolate con anticorpi ma non elettroporate, e cellule elettroporate in assenza di anticorpi.

2.8 L'isolazione totale di RNA e RT-PCR

Il RNA cellulare totale è stato purificato dai melanociti confluenti e quiescenti e da colture cellulari di melanoma utilizzando il reagente TRIzol (Invitrogen Life Technologies) secondo le istruzioni del produttore, e ridissolto in 30 μ l d'acqua purificata non-RNase. Le concentrazioni e purezza di RNA sono state stimate dalla densità ottica a 260 e 280 nm. Il cDNA primo-filo è stato trascritto all'inverso in un volume reazionale con 200 U di SuperScript II, 50 ng di random examiners, e 125 mM dNTP, 10 mM ditiotreitolo, 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies). La reazione, eseguita a 42 °C per 50 min, è stata interrotta a 70 °C per 10 min.

Le reazioni della PCR sono state eseguite in 10 μ l volumi finali che contenevano di cDNA, 8 pmol di ogni primer, 1.7 mM miscela di dNTP, 1 U Taqman Gold DNA polymerase (Applied Biosystem) in 1x Buffer II. I parametri dei cicli sono stati: denaturazione iniziale, 95 °C per 10 min, denaturazione, 95 °C per 35 s, annealing (appaiamento) alla temperatura specifica (55-60 °C) per 35 s, estensione (72 °C per 45 s), e uno step d'estensione finale a 72 °C per 5 min. Il numero appropriato di cicli è stato stabilito come descritto sotto. I primer specifici per i geni di ratto cPLA₂, iPLA₂ e GAPDH (sintetizzati da Invitrogen Life Technologies) sono stati utilizzati in un RT-PCR semi-quantitativo nelle colture di melanoma umano. Un prodotto 450 bp è stato amplificato per cPLA₂ di ratto utilizzando un primer forward (5'-AAGGCCAAGTGACACCAGCC-3') e un primer reverse (5'-GAAACAGAGCAACGAGATGGG-3'). Un prodotto 353 bp è stato amplificato per iPLA₂ utilizzando un primer forward (5'-AAGTGAACGTGTTCGAGAGG-3') e primer

reverse (5'-GATGATGCGGCTGTGATGG-3'). I primer utilizzati per GAPDH sono stati 5'-TAGACAAGATGGTGAAGG-3' (forward) e 5'-GCAGGGATGATGTTCTGG-3' (reverse) e la loro amplificazione è stata di 650 bp.

Il gene GAPDH è stato utilizzato come dime di controllo interno per normalizzare rispettivamente i cambi relativi del mRNA previsto in RT-PCR nei melanomi e melanociti. Per ogni gene target d'essere analizzato e per ogni singolo esperimento la fase esponenziale dell'amplificazione è stata determinata dove la formazione del prodotto è connessa alla dima iniziale. Come operazione preliminare, la PCR realizzata con vari numeri di cicli, con controlli positivi e negativi, per trovare il ciclo dove i prodotti diventano visibili dentro la fase esponenziale dell'amplificazione. Le condizioni sono state scelte affinché nessuno dei RNA analizzati raggiungesse una stabilità alla fine del protocollo d'amplificazione, in altri termini essi sono stati nella fase esponenziale dell'amplificazione. Rispettivamente 32, 32 e 34 cicli d'amplificazione per cPLA₂, iPLA₂ e GAPDH sono stati scelti per produrre l'aumento lineare di prodotti PCR prima di raggiungere una stabilità in GP8.39. Normalmente eseguiamo un controllo negativo consistente in reazioni RT piuttosto che di cDNA per verificare la contaminazione da DNA genomico.

Inoltre, il sequenziamento del DNA dei prodotti PCR ha confermato la specificità delle nostre amplificazioni. Le sequenze sono state eseguite da C.R.I.B.I. sequencing service dell'Università di Padova (Italia).

I prodotti di PCR sono stati separati in 1,5% gel di agarosio in TAE (TrisAcetate-EDTA) buffer 1X, e macchiati con bromuro di etidio. Le fasce sul gel UV-trasilluminato sono stati convertiti in immagini e la loro quantità è stata quantificata con il software Scion Images (Scion Corporation, Frederick, MD).

2.9. Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state determinate in paragoni multipli fra gruppi indipendenti di dati in cui ANOVA e Test F hanno indicato la presenza di differenze significative. Un valore di probabilità di $<0,05$ è stato considerato significativo

3. Risultati

Prima abbiamo valutato la capacità di crescita delle diverse cellule melanocitiche normali e tumorali. La mitogenesi di tutte le linee cellulari di melanoma umano è aumentata alla 24^a ora e ha raggiunto un picco alla 48^a ora dopo il placcamento. I dati in Fig.1 dimostrano che, per tutte le colture cellulari indagate, il rapporto di proliferazione

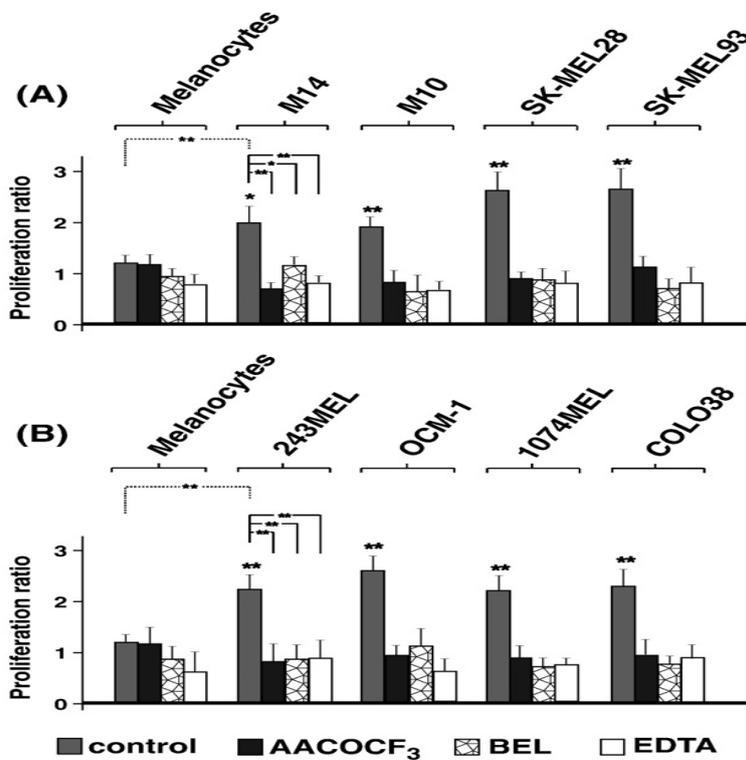


Fig. 1. Rapporto di proliferazione (quantità di cellule-pozzetti a 48 ore di coltura/ quantità di cellule/pozzetti aderiti a 24 ore) di melanociti umani e otto colture cellulari di melanoma (pannelli A e B). Per mettere alla prova gli effetti degli inibitori, le cellule sono state stimulate con AACOCF₃ (20 μ M), BEL (μ M), EDTA (5 mM) aggiunti per 48 ore al medium RPMI + 51% FCS. Le colture cellulari di melanoma sono state anche incubate alla presenza del veicolo (DMSO) soltanto. I dati sono stati raccolti ed analizzati come descritto in Materiali e metodi. L'intensità colorimetrica dalla crystal violet nei pozzetti è stata misurata a 570 nm. Una riduzione significativa della proliferazione basale in confronto alle condizioni di controllo (no inibitori) è stata valutata dal test Student's t. Ogni sbarra è la media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. *P<0,05, **P<0,01 confrontando le colture cellulari di melanoma con i melanociti o con un controllo corrispondente.

(quantità delle cellule/pozzetto alla 48^a ora di coltura rispetto alla quantità di cellule/ pozzetto aderite alla 24^a ora) è più alto (1,6-2,5) nei melanomi che nei melanociti, con valori da moderati (M10, M14) ad elevati (SK-MEL23 e OCM-1). Per analizzare il coinvolgimento di cPLA₂ e gruppo VI iPLA₂ nella proliferazione delle cellule, abbiamo valutato l'effetto degli inibitori PLA₂ quali AACOCF₃, BEL, e EDTA. L'incubazione con 20 μ M AACOCF₃ (considerato un inibitore delle attività di cPLA₂ e iPLA₂) ha causato una riduzione significativa della proliferazione cellulare di melanoma (2,5-2,8 ai rispettivi controlli in tutte le colture cellulari esaminate) (Fig. 1).

Le attività enzimatiche insensibili a BEL rappresentano Ca²⁺-dipendente PLA₂, mentre quelli insensibili ad EDTA rappresentano Ca²⁺-indipendente PLA₂. I nostri risultati hanno dimostrato che il trattamento delle colture cellulari di melanociti o di melanoma per 24-48 ore con 25 μ M BEL (inibitore di iPLA₂) e 5 mM EDTA ha avuto come risultato una riduzione significativa della proliferazione delle cellule di melanoma (rispettivamente: 1,4-3,1 per BEL, e 2.2-3.7 per EDTA) (Fig. 1). Tutti questi risultati riflettono l'inibizione delle attività di PLA₂ basale, che è la somma delle attività enzimatiche di cPLA₂ e iPLA₂. Questi risultati

sostengono la conclusione che entrambe le fosfolipasi A₂ sono importanti nella proliferazione e nell'invasione tumorale. L'applicazione del solvente inibitore DMSO da solo nella coltura alla stessa concentrazione raggiunta con inibitori solubilizzati (0,1-0,5%) non ha esercitato alcun effetto.

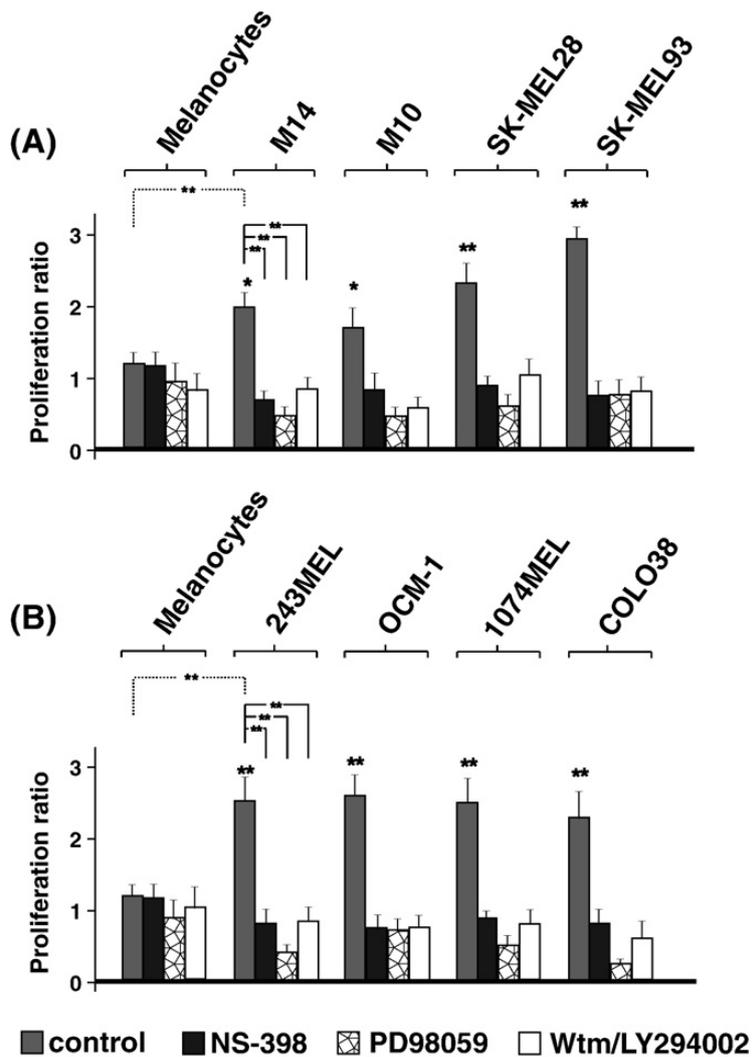


Fig. 2. Rapporto di proliferazione (quantità di cellule/pozzetto a 48 ore di cultura alla quantità di cellule/pozzetto aderiti a 24 ore) di melanociti umani e otto colture cellulari di melanoma (pannelli A e B). Per mettere alla prova gli effetti degli inibitori, le cellule sono state stimulate con NS-398 (10 pM), wortmannin (60 nM) più LY294002 (20 pM) o PD98059 (25 pM) aggiunti per 48 ore al medium RPMI + 51% FCS. Le colture cellulari di melanoma sono state anche incubate alla presenza del veicolo (DMSO) soltanto. I dati sono stati raccolti ed analizzati come descritto in Materiali e metodi. L'intensità colorimetrica dalla crystal violet nei pozzetti è stata

misurata a 570 nm. Una riduzione significativa della proliferazione basale in confronto alle condizioni di controllo (no inibitori) è stata valutata dal test Student's t. Ogni sbarra è la media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. *P<0,05, **P<0,01 confrontando le colture cellulari di melanoma con i melanociti o con un controllo corrispondente.

Ad una concentrazione di 5 mM, l'EDTA ha dimostrato un'inibizione significativa di proliferazione delle colture cellulari (dati non forniti).

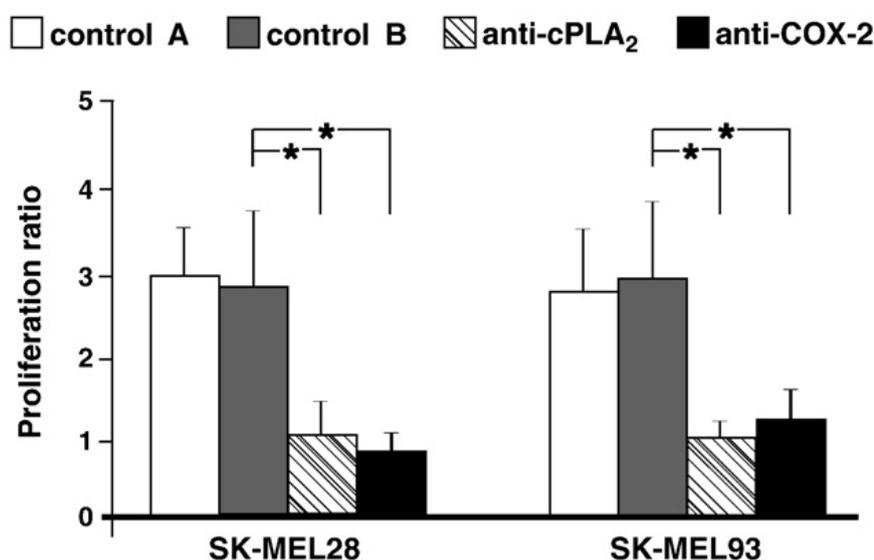


Fig. 3. Effetti dell'elettroporazione anticorporeale d'anti-cPLA₂ e anti-COX-2 sulla proliferazione della coltura cellulare di melanoma di SK-MEL28 o SK-MEL93. La proliferazione è espressa come un rapporto della quantità di cellule/pozzetto a 48 ore di coltura alla quantità di cellule/pozzetto aderite a 24 ore. Le cellule cresciute nel medium RPMI + 10% FCS sono state elettroporate con 25 pg/ml dell'anti-cPLA₂ monoclonale di topo o l'anti-COX-2 monoclonale di topo. Le condizioni ottimali scelte, dopo il test preliminare, per osservare l'incorporazione anticorporeale sono descritte sotto Materiali e metodi.

Dopo l'elettroporazione, le cellule lavate sono state incubate per un periodo addizionale di 24-48 ore in RPMI + 10% FCS. La proliferazione cellulare è espressa come assorbenza di crystal violet a 570 nm. I controlli includono cellule miste con anticorpi ma non elettroporate (control A) e cellule elettroporate nell'assenza di anticorpi (control B). I dati rappresentano la media \pm SEM di almeno quattro esperimenti (ognuno in duplicato). *P<0,05 confrontando le colture cellulari di melanoma elettroporate con gli anticorpi con un controllo corrispondente.

Lo stesso effetto marcato sul tasso di proliferazione basale, a paragone dei rispettivi controlli (le cellule non trattate con l'inibitore), è stato chiaramente rilevabile anche per l'inibitore selettivo COX-2, NS-398 [23] (a 94,4-25,6% di controllo in tutte le colture cellulari esaminate) (Fig. 2). Questo indica una contribuzione sostanziale del COX-2 alla sintesi di prostanoide di melanoma (soprattutto prostaglandine E₂, che a sua volta attiva la proliferazione delle cellule. Esperimenti supplementari sono stati effettuati per indagare il coinvolgimento della forma fosforilata di cPLA₂ nell'effetto mitogenico. Il trattamento di melanociti o di colture cellulari con (PD98059) (MEK1 inibitore) ha indotto una diminuzione acuta nel rapporto di proliferazione (Fig. 2) che suggerisce che il chinase MEK1 può essere coinvolto nell'attivazione di fosfolipase A₂ per il processo di fosforilazione e la produzione libera d'acido arachidonico. Il PD98059 è ben riconosciuto quale inibitore della fosforilazione di PLA₂ [22, 24, 25]. Abbiamo utilizzato anche gli inibitori di coppia wortmannin/LY294002 (60 nM wortmannin più 20 ^{^-}M LY294002), droghe molto conosciute le quali inibiscono l'upstream fosfatidilinositolo-3-chinase (PI3-chinase) [24]. Quando gli inibitori sono stati incubati con cellule hanno causato una riduzione significativa della proliferazione cellulare (da 34,3 a 21,5% di controllo in tutte le colture cellulari esaminate) (Fig. 2). Questo risultato conferma che l'attivazione della via chinase PI3/Akt/PDK1, governante la cPLA₂ fosforilazione downstream, regola la crescita cellulare.

Abbiamo utilizzato un ulteriore approccio per verificare il coinvolgimento delle attività enzimatiche di PLA₂ e COX-2 nel meccanismo proliferativo: abbiamo incorporato gli anticorpi anti-cPLA₂ e anti- COX-2 in due colture cellulari paradigmatiche di melanoma, SK-MEL28 e SK-MEL93. Le cellule sono state elettroporate in condizioni ottimali per elettroinserire anticorpi senza incidere sulla loro integrità fisiologica. Abbiamo osservato che l'80% delle cellule sono sopravvissute ed in circa l'85% queste sono stati trovati livelli significativi di anticorpi all'interno della cellula con la tecnica Western blotting (dati non

forniti). Ambedue gli anticorpi incorporati hanno ridotto significativamente il tasso di proliferazione in condizioni basali, a 32,3% per cPLA₂ e 29,2% per COX-2 del controllo cellulare di SK-MEL28 elettroporato senza anticorpi nel medium di crescita, o a 32,5% per cPLA₂ e 36,2% per COX-2 del controllo cellulare di SK-MEL93 elettroporato senza anticorpi nel medium (Fig. 3). Questo risultato ci permette di concludere che nelle cellule di melanoma l'attivazione della via cPLA₂/COX-2 è specificamente coinvolta nella proliferazione cellulare. I controlli sono compresi per escludere il riporto di anticorpi extracellulari nel medium o sulla superficie delle cellule per cui i risultati non dimostrano un'inibizione significativa del tasso di proliferazione.

Le espressioni di proteina di PLA₂ valutate dalle analisi Western blot hanno dimostrato che tutte le colture cellulari di melanoma hanno espresso cPLA₂ e iPLA₂ a livelli significativamente più alti che i melanociti (Fig. 4A, B), con l'eccezione della coltura cellulare di M14 che dimostrava un livello molto basso di cPLA₂ (e la sua forma fosforilata, analoga a quella nei melanociti). L'omogeneità considerabile fra altre colture cellulari suggerisce ancora che l'attività totale di PLA₂ nelle cellule tumorali è mediata per entrambi gli enzimi di fosfolipasi A₂. La Fig. 4A dimostra il rapporto p-cPLA₂/cPLA₂: i melanomi dimostrano la presenza della forma fosforilata cPLA₂ laddove i melanociti hanno espresso questa forma attivata dell'enzima in una misura molto bassa. L'espressione di iPLA₂ (Fig. 4B) ha dimostrato un schema differenziale: è stato alto su cinque colture cellulari su otto ed in una misura più bassa su tre melanomi (M10, SK-MEL28 e SK-MEL93).

Poiché l'espressione di cPLA₂ e di proteina iPLA₂ nei melanomi è costitutivamente alta, abbiamo valutato i livelli di cPLA₂ e iPLA₂ mRNA per queste proteine enzimatiche per il RT-PCR. Come dimostrato in Fig. 5, lo schema d'espressione delle due RNA nelle colture cellulari di melanoma è stato quasi parallelo a quello osservato per le proteine fosfolipasi A₂.

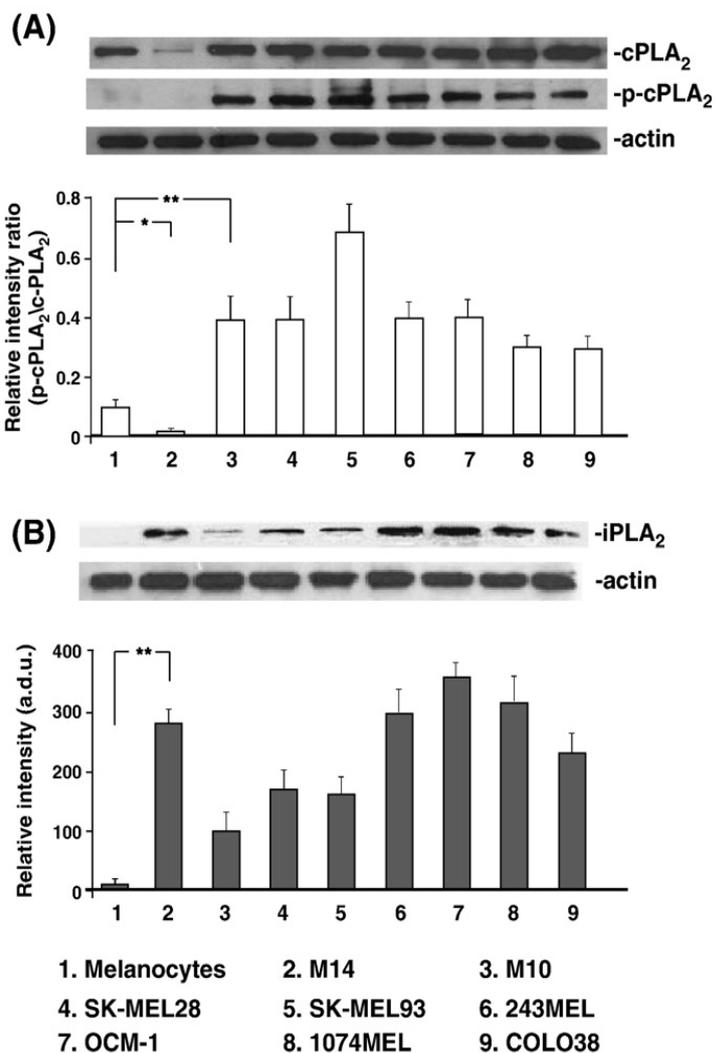


Fig. 4. Analisi Western blot di PLA₂ nei melanociti umani e nelle otto colture cellulari. La proteina totale delle colture cellulari cresciute nel medium RPMI, supplementate con 10% FCS, è stata analizzata utilizzando anticorpi specifici per cPLA₂ e per la sua forma (panel A) o iPLA₂ (panel B). Tutti i blot sono stati controllati per "equal loading" dall'anticorpo monoclonale Actin. I rapporti d'intensità di bande (fosfo-cPLA₂/ cPLA₂ totale) sono stati indicati nel grafico. I blot sono stati esaminati con il sistema d'individuazione ECL Western blot ed esposti al film (Kodak) per lo stesso periodo di tempo. Nella tavola B, le sbarre rappresentano l'intensità netta di bande di proteina utilizzando Scion Image Program.

Ogni sbarra è la media ± SEM. Per entrambe le PLA₂ è stato mostrato uno di tre esperimenti indipendenti con risultati simili.

*P<0,05, **P<0,01, confrontando la coltura cellulare M10 (panel A) o M14 (panel B) con melanociti (t test Studente). Lo stesso livello di significanza è associato ad altre colture cellulari di melanoma.

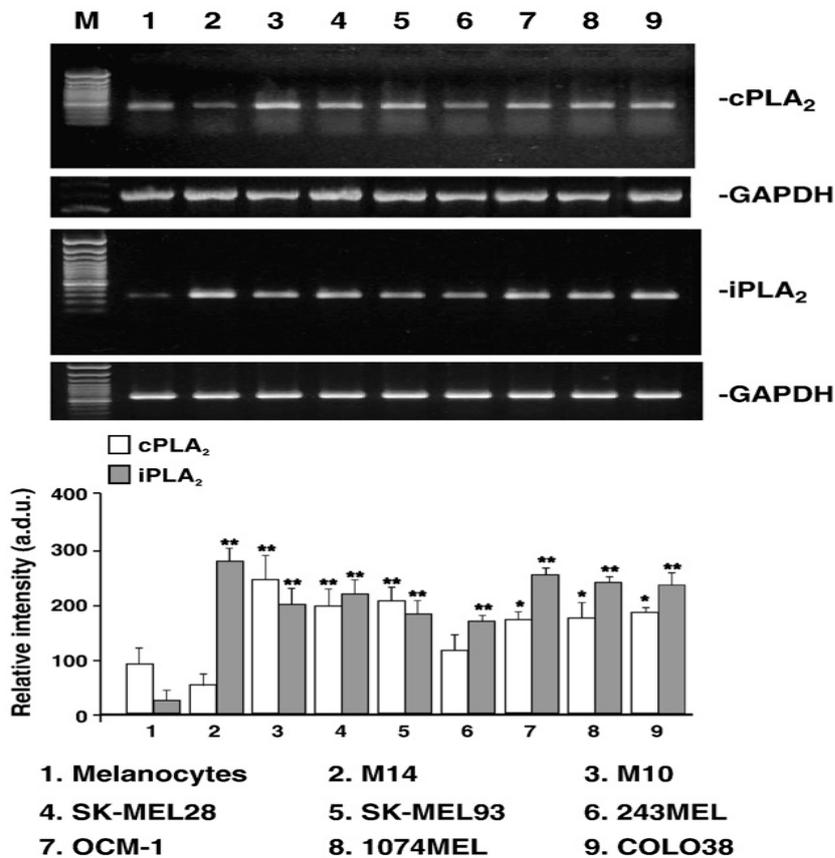


Fig. 5. L'espressione di cPLA₂ e iPLA₂ mRNA in melanociti e colture cellulari di melanoma è stata identificata dalle analisi semi-quantitative RT-PCR, come descritto in Materiale e metodi. L'espressione di GAPDH è stata utilizzata come un controllo di carico per normalizzazione. Ogni sbarra è la media \pm SEM. E' mostrato uno di tre esperimenti indipendenti con risultati simili. *P<0,05, **P<0,01, confrontando la coltura cellulare M10 (panel A) o M14 (panel B) con melanociti (t *test Studente*).

E' stata osservata un'espressione differenziale del gene prodotto dalla coltura cellulare di melanoma, particolarmente per cPLA₂ mRNA, con i livelli più bassi per le linee M14 e 243MEL, questa non ha dimostrato differenze statisticamente significative dai valori trovati nei melanociti,

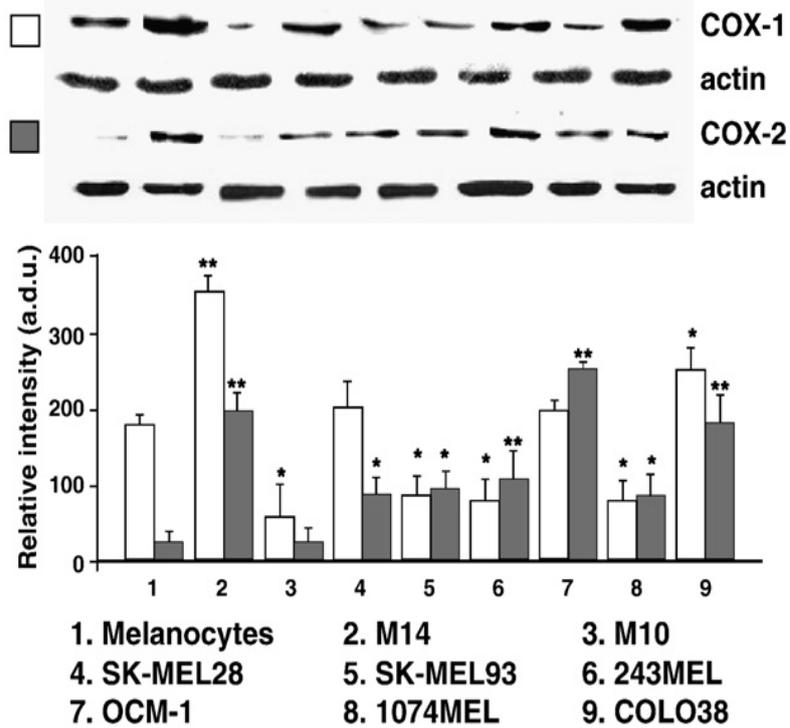


Fig. 6. Espressione di COX-1 e COX-2 melanociti umani normali e colture cellulari tumorale. Tutti i lisi di proteina della coltura cellulare sono stati separati da SDS-PAGE e trattati dallo immunoblotting con anticorpi contro COX-1 o COX-2. Tutti i blot sono stati controllati per "equal loading" dall'anticorpo monoclonale Actin. Ogni sbarra è la media \pm SEM. E' stato mostrato uno di tre esperimenti indipendenti con risultati simili. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, confrontando la coltura cellulare M10 (panel A) o M14 (panel B) con melanociti (*t test Studente*).

in accordo con l'espressione di proteina. Le analisi hanno confermato che melanociti umani normali hanno significativamente espresso i livelli più bassi di ambedue RNA (1,2-2,5 per cPLA2 e 7,0-9,0 per iPLA2).

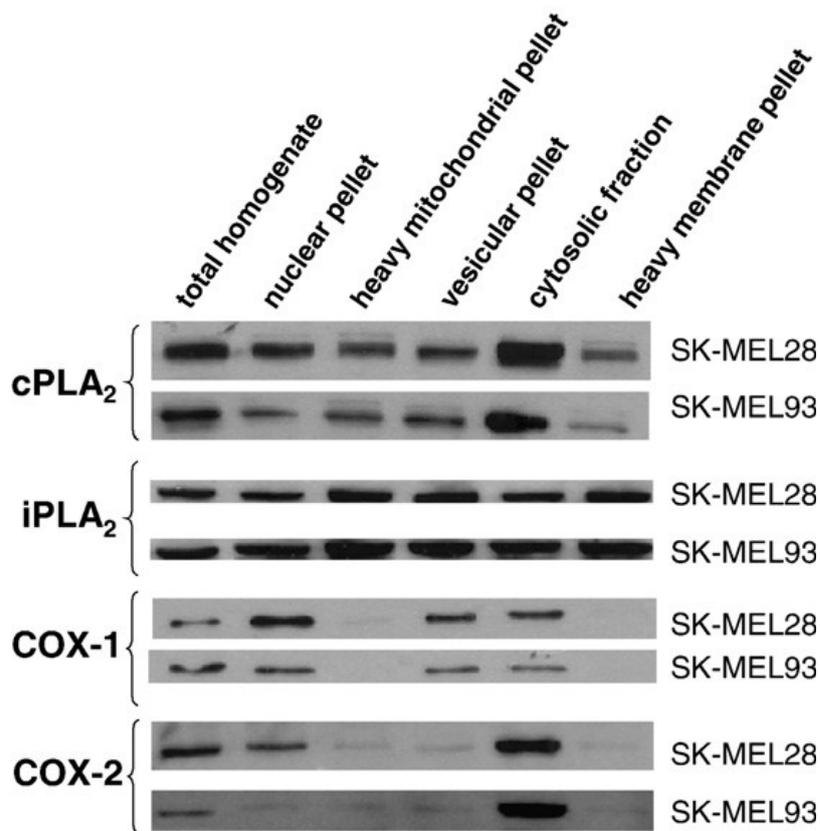


Fig. 7. Distribuzione subcellulare di cPLA₂, iPLA₂, COX-1 e COX-2 in due culture cellulari di melanoma. Le culture cellulari sono state omogeneizzate e frazionate in cinque preparazioni come riportato in Materiale e metodi. E' stato mostrato uno di due esperimenti indipendenti con risultati simili.

L'espressione della proteina sPLA₂ IIA è stata saggiata per analisi Western blot. Confermiamo che la presenza di sPLA₂ IIA nei melanociti e in SK-MEL28 e nelle culture cellulari di melanoma OCM-1 non è stata rintracciabile [26]. Poiché è stato utilizzato fluido sinoviale positivo di controllo proveniente da pazienti che soffrono di osteoartrite infiammatoria o di versamenti traumatici articolari.

III dati in Fig. 6 dimostrano l'espressione di ciclossigenasi-1 e -2 nei melanociti e nelle colture cellulari di melanoma. Mentre COX-1 è stato ben espresso nei melanociti così come in tutte le cellule esaminate, tranne che nella linea M10, COX-2 è stato quasi assente (sotto il livello di rilevamento) nei melanociti e nelle cellule M10. I livelli di COX-2 sono stati tipicamente e significativamente elevati nei melanomi (3,8-8,2 in confronto ai melanociti). L'espressione di COX-1 è stata molto più variabile in confronto a quella di COX-2. E' apparso che quattro su dieci colture cellulari hanno ridotto i livelli di COX-1 in confronto alle cellule primarie con due invariabili e due aumentate, in confronto al controllo.

Successivamente abbiamo esaminato la localizzazione subcellulare di cPLA₂, iPLA₂, COX-1 e COX-2 in due colture cellulari paradigmatiche di melanoma utilizzando Western blots. Nella coltura metastatica SK-MEL28 e in SK-MEL93 i risultati dimostrano uno schema di distribuzione simile (Fig. 7), cioè l'iPLA₂ è stata localizzata alle frazioni: nucleare, citosolica, membrana pesante e mitocondri pesanti. A paragone, una quantità abbondante di iPLA₂ è stata individuata per lo più nella frazione citoplasmica. COX-1 è stata localizzata nel pellet nucleare e vescicolare oltre che nella frazione citosolica.

Per confermare la distribuzione subcellulare descritta sopra, abbiamo cercato di localizzare i segnali immunocomplessi nei melanociti e nelle stesse cellule di melanoma macchiate con anticorpi riconoscendo rispettivamente cPLA₂, iPLA₂, COX-1 e COX-2, (Fig. 8). I melanociti sembrano come cellule fusiformi o dendritiche (a,c) privi dei segnali di iPLA₂ e COX-2 (b,d). Nelle cellule subconfluenti di melanoma, cPLA₂ è stata trovata distribuita attraverso il corpo cellulare e nella zona perinucleare (ivi compreso l'involucro nucleare) (Fig. 8a', SK-MEL28; Fig. 8a'', SK-MEL93). Similmente, le proteine iPLA₂ e COX-1 sono state osservate espresse nel citoplasma, nella membrana (reticulum endoplasmico) e nella regione nucleare (Fig. 8b',c', SK-MEL28; Fig. 8b'', c'', SK-MEL93). COX-2 è stata osservata espressa solamente nel citoplasma (Fig. 8d', d'') e nessuna macchia nucleare è stata reperibile con facilità, ciò è

specialmente evidente nelle cellule binucleari (Fig. 8d'). iPLA₂ e COX-1 sembrano localizzate nel nucleoplasma nel SK-MEL93.

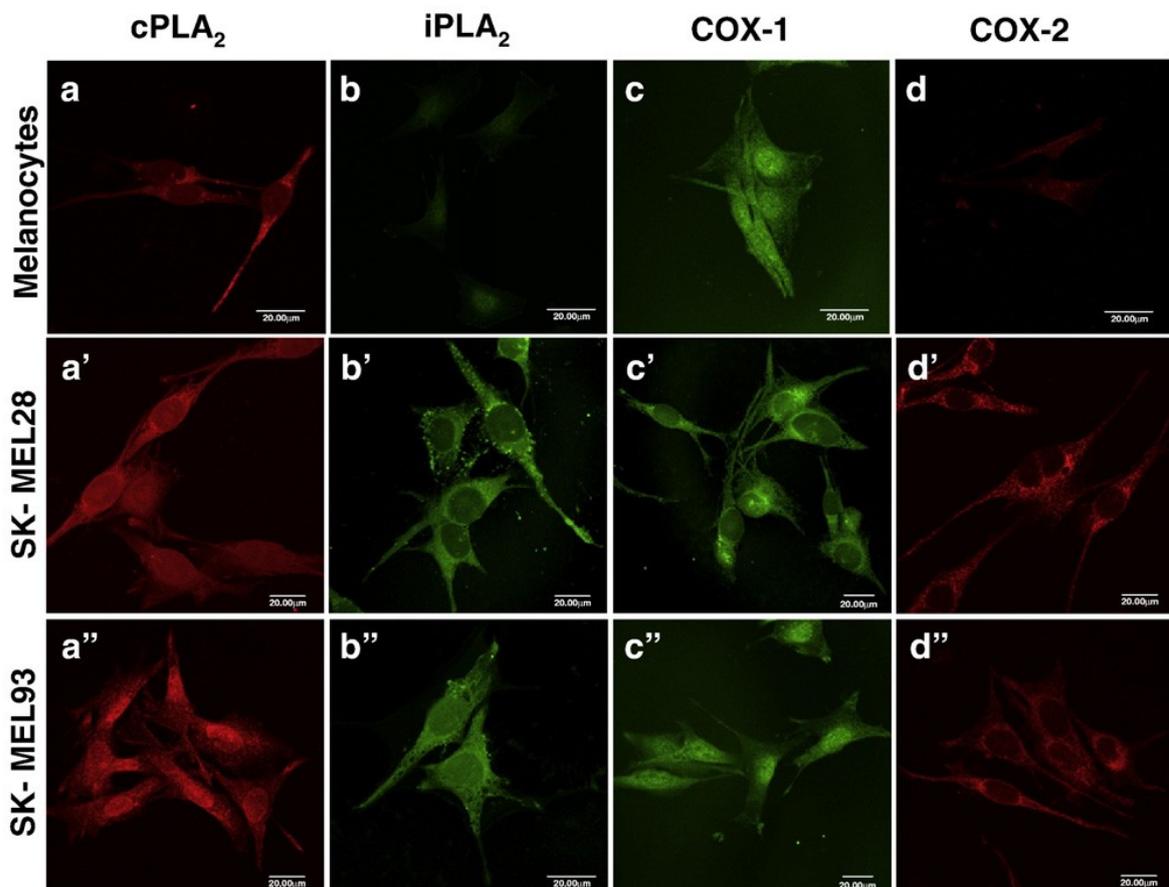


Fig. 8. Distribuzione subcellulare di CPLA₂, iPLA₂, COX-1 e COX-2 in melanociti umani e colture cellulari di melanoma, SK-MEL28 o SK-MEL93, verificata per immunofluorescenza confocale. Gli immunocomplessi associati con le cellule subconfluenti sono stati indentificati utilizzando anticorpi. I segnali per cPLA₂ e COX-2 sono mostrati con il colore rosso (anticorpo secondario Cy3; etichettato proteina; fluorescente rosso); i segnali di iPLA₂ e COX-1 sono mostrati con il colore verde (anticorpo secondario; etichettato proteina; fluorescente verde) (magnificazioni 60x). Ogni pannello rappresenta un esempio tratto da almeno quattro esperimenti separati.

4. Discussione

Il metabolita dell'acido arachidonico, i leucotrieni e le prostaglandine, chiamate eicosanoidi, sono biologicamente lipidi che possono agire come potenti mediatori infiammatori o partecipare nella trasduzione del segnale intracellulare. Quest'ultima partecipazione che include, fra le altre funzioni, la regolazione della crescita e la differenziazione cellulare oltre che il rimodellamento osseo e delle membrane, è poco capita. Gli studi recenti su cellule d'epatoma umano dimostrano un ruolo diretto degli eicosanoidi nella regolazione dell'espressione di gene nel nucleo [27].

Il melanoma è una delle forme di cancro più aggressive, che metastatizza in qualsiasi sito del corpo. Quindi i nostri risultati ci tentano nel suggerire che l'espressione di fosfolipasi A₂ può contribuire a questo straordinario potenziale metastatico. La presenza dell'attività enzimatica di cPLA₂ nelle colture

cellulari di melanoma è stata dimostrata direttamente solo una volta [28]. Il pannello di cellule esaminate comprendeva due colture cellulari di murini, sei colture cellulari di melanoma umano differente da quelle esaminate da noi, due campioni di tessuto tumorale di melanoma recentemente espianati ed una coltura di melanociti epidermali normali, contenente il livello più basso d'attività enzimatica. In questa sede confermiamo tale presenza in altre colture cellulari di melanoma umano. Il ruolo di cPLA₂ nella trasduzione di segnali intracellulari è sostenuto dalle caratteristiche di questo enzima, ivi compreso la sua selettività per il substrato dell' AA e la sua regolazione per fosforilazione, la concentrazione fisiologicamente rilevante di calcio, e le proteine G [29]. La traslocazione di cPLA₂ all' involucro nucleare sull' attivazione potrebbe risultare nella produzione d'eicosanoidi nei nuclei che potrebbero legare direttamente, e, modulare le attività di diversi fattori di trascrizione.

Gli esperimenti che utilizzano modelli cellulari hanno rivelato che, in generale, più di un tipo di PLA₂ è coinvolto nella regolazione cellulare e la formazione dei lipidi messaggeri [30]. È stato proposto che cPLA₂ e iPLA₂ possono contribuire al rilascio di ormoni, di citochine, e di AA pro-ossidante e alla produzione di eicosanoidi, e quindi entrambi gli enzimi possono potenzialmente giocare ruoli importanti nella trasduzione di segnali intracellulari [22,31]. Comunque, non ci sono dati per quanto riguarda il ruolo di iPLA₂ nella patogenesi del melanoma. Per questa ragione, abbiamo indagato non solo lo status di iPLA₂ ma anche la relazione possibile fra la sovraespressione di iPLA₂ e cPLA₂ nei melanomi umani.

I risultati non hanno dimostrato l'espressione di iPLA₂ nei melanociti normali. Questo fatto non è una sorpresa perché la generalità della proposta funzione di "housekeeping" è stata messa in dubbio per iPLA₂p in omeostasi di fosfatidilcolina e rimodellamento [32]. I livelli ridotti di iPLA₂, che non indicano uno squilibrio nel turnover dei fosfolipidi, possono essere legati ad un livello ridotto di proliferazione e migrazione, ad una suscettibilità dei melanociti pigmentati alla lisi, all'effetto citotossico TNF o alla resistenza ai danni ambientali quali UVB o le specie reattive all'ossigeno.

Comunque, iPLA₂ è stata ben espressa nei melanomi metastatici o nel melanoma uveale (OCM-1). Uno schema simile d'espressione è stato individuato per quanto riguarda la cPLA₂ o la sua forma fosforilata. Questi risultati suggeriscono che la sovraespressione di entrambe le PLA₂, insieme all'espressione aumentata di COX-2, può essere funzionale, o collaborare, nella produzione massimale d'eicosanoidi facilitando in questo modo la progressione del tumore e dell'angiogenesi. Inoltre, la iPLA₂ può rappresentare un obiettivo terapeutico potenziale per il controllo di tumori invasivi.

In questo studio, abbiamo esaminato il ruolo della via cPLA₂/COX-2 nel tasso di proliferazione basale nelle colture cellulari di melanoma per l'inibizione di enzimi coinvolti nella produzione dell'AA ed eicosanoidi e la valutazione degli effetti consequenziali nella

crescita cellulare. Come passo preliminare, abbiamo valutato il tasso proliferativo confrontando diverse colture cellulari di melanoma con i melanociti umani. Il passo seguente è stato di indagare gli effetti dell'inibizione di cPLA₂ e COX-2, gli enzimi principali che rilasciano e metabolizzano AA i quali, nelle forme di eicosanoidi, mediano gli eventi mitogenici della cellula. Sono state osservate riduzioni specifiche e significative o utilizzando inibitori chimici incubati con le cellule o incorporando anticorpi in modo intracellulare contro i due enzimi.

Tutti questi esperimenti dimostrano indirettamente che le derivate dell'AA giocano un ruolo critico nell'alto tasso di proliferazione per colture cellulari di melanoma; inoltre forniscono un'evidenza diretta che la proliferazione di melanoma richiede che le attività enzimatiche complete di cPLA₂ e COX-2 siano operative.

Anche se le differenze fra le colture cellulari sono state notate per quanto riguarda l'espressione di iPLA₂ e COX-2, abbiamo trovato che non esiste una correlazione fra il livello d'espressione di iPLA₂ e il tipo istopatologico del melanoma; ad esempio, OCM-1 non-metastatica e la coltura cellulare M14 hanno espresso lo stesso livello di entrambe iPLA₂ e COX-2. Questo risultato indica che gradi variabili di sovraespressione di iPLA₂ e COX-2 nei melanomi maligni umani possono essere tutti capaci di sostenere la loro proliferazione, almeno *in vitro*. A differenza della diversità individuata per quanto riguarda la sovraespressione di iPLA₂ nei melanomi maligni umani in confronto ai melanociti, i dati qui presentati dimostrano un'espressione piuttosto uniforme di cPLA₂ nei melanomi umani metastatici e non-metastatici (Fig. 4A). Questo schema d'espressione potrebbe indicare che la sovraespressione di cPLA₂ è più cruciale (maggiore se non l'unico fattore che limita il tasso) per la proliferazione di cellule maligne che l'espressione stimolata di iPLA₂ o COX-2. Questo è coerente con i dati che dimostrano che i livelli di PGE₂ sono variati ad notevolmente fra differenti colture cellulari maligne di melanomi [33].

E' piuttosto sorprendente ed interessante il fatto che la coltura cellulare M14 non ha sovraespresso la cPLA₂ e la sua forma fosforilata. Queste cellule sembrano principalmente richiedere iPLA₂ per la loro proliferazione *in vitro*. Si sarebbe potuto predire che la iPLA₂ avrebbe condotto la maggior parte dell'idrolisi di fosfolipasi metabolica, com'è confermato dal più alto livello di iPLA₂ mRNA trovato fra le colture cellulari di melanoma (Fig. 5). Gli studi futuri saranno concentrati sulla determinazione dell'attività enzimatica e sulla struttura del gene cPLA₂ confrontando M14 con le colture cellulari di melanoma che esprimano un livello alto di cPLA₂.

Recentemente, è stato dimostrato come le cellule maligne umane di melanoma esprimano ciclossigenasi- 2, la forma inducibile di COX che è l'enzima che limita il tasso nella produzione di prostanoidei [33-35]. L'espressione aumentata di COX-2 è stata legata allo sviluppo ed alla progressione di cancro epiteliali maligni, aumentando la possibilità che le prostaglandine prodotte per cellule melanotiche abbiano un ruolo funzionale nella carcinogenesi della pelle [36, 37]. Le cellule che sovraesprimono COX-2 resistono all'apoptosi, hanno un' interazione cellula a cellula anormale, acquisiscono fenotipi invasivi e promuovono l'angiogenesi del tumore [38, 39]. In questo studio abbiamo trovato che i melanociti umani non hanno rivelato l'espressione di nessuna delle due COX regolatorie conosciute, mentre i melanomi primari e metastatici hanno dimostrato un'espressione alta di ciclossigenasi costitutive tipo 1.

La localizzazione citoplasmatica di COX-2 che abbiamo trovato in due colture cellulari di melanoma è in accordo con i risultati precedentemente ottenuti in altre cellule di cancro [40, 41]. È interessante notare che abbiamo trovato iPLA₂ in frazione mitocondriale isolata, frazione microsomale isolata e frazione citosolica isolata, mentre un livello più basso è stato individuato in frazione nucleare. Questo suggerisce che, anche se iPLA₂ è anche localizzata a citosol dove una alta attività specifica potrebbe essere raggiunta, la maggioranza di questo

enzima non è accoppiato topologicamente a COX-2 nelle colture cellulari di SK-MEL93 e SK-MEL28. Al contrario, cPLA₂ colocalizza con COX-2 costitutiva nel citosol dove sono accoppiate funzionalmente per generare AA e prostanoidi.

BIBLIOGRAFIA

- [1] D.G. Tang, C.A. Diglio, K.V. Honn, Activation of microvascular endothelium by eicosanoid 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid leads to enhanced tumor cell adhesion via up-regulation of surface expression of alpha v beta 3 integrin: a posttranscriptional, protein kinase C- and cytoskeleton-dependent process, *Cancer Res.* 54 (1994) 1119–1129.
- [2] E. Olaso, C. Salado, E. Egilegor, V. Gutierrez, A. Santisteban, P. Sancho-Bru, et al., Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis, *Hepatology* 37 (2003) 674–685.
- [3] R. Reich, G.R. Martin, Identification of arachidonic acid pathways required for the invasive and metastatic activity of malignant tumor cells, *Prostaglandins* 51 (1996) 1–17.
- [4] D. Nie, M. Lamberti, A. Zacharek, L. Li, K. Szekeres, K. Tang, et al., Thromboxane A (2) regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267 (2000) 245–251.
- [5] I. Winer, D.P. Normolle, I. Shureiqi, V.K. Sondak, T. Johnson, L. Su, D.E. Brenner, Expression of 12-lipoxygenase as a biomarker for melanoma carcinogenesis, *Melanoma Res.* 12 (2002) 429–434.
- [6] J.D. Clark, A.R. Schievella, E.A. Nalefski, L.L. Lin, Cytosolic phospholipase A2, *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 12 (1995) 87–117.
- [7] S. Chakraborti, Phospholipase A2 isoforms: a perspective, *Cell Signal.* 15 (2003) 637–665.
- [8] M.V. Winstead, J. Balsinde, E.A. Dennis, Calcium-independent phospholipase A2: structure and function, *Biochim. Biophys. Acta* 1488 (2000) 28–39.
- [9] Z. Ma, J. Turk, The molecular biology of the group VIA Ca²⁺-independent phospholipase A2, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 67 (2001) 1–33.
- [10] T. Sanchez, J.J. Moreno, Calcium-independent phospholipase A2 through arachidonic acid mobilization is involved in Caco-2 cell growth, *J. Cell Physiol.* 193 (2002) 293–298.
- [11] J. Balsinde, E.A. Dennis, Bromoenol lactone inhibits magnesium-dependent phosphatidate phosphohydrolase and blocks triacylglycerol biosynthesis in mouse P388D1 macrophages, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 31937–31941.
- [12] P.K. Larsson Forsell, B.P. Kennedy, H.E. Claesson, The human calcium-independent phospholipase A2 gene multiple enzymes with distinct properties from a single gene, *Eur. J. Biochem.* 262 (1999) 575–585.
- [13] S. Akiba, S. Ohno, M. Chiba, K. Kume, M. Hayama, T. Sato, Protein kinase C α -dependent increase in Ca²⁺-independent phospholipase A2 in membranes and arachidonic acid liberation in zymosan-stimulated macrophage-like P388D1 cells,

Biochem. Pharmacol. 63 (2002) 1969–1977.

[14] S.A. Steer, K.C. Wirsig, M.H. Creer, J. Ford, D.A. McHowat, Regulation of membrane-associated iPLA2 activity by a novel PKC isoform in ventricular myocytes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283 (2002) C1621–1626.

[15] C.D. Anfuso, G. Assero, G. Lupo, A. Nicotra, G. Cannavò, R.P. Strosznajder, et al., Amyloid beta(1–42) and its beta(25–35) fragment induce activation and membrane translocation of cytosolic phospholipase A2 in bovine retina capillary pericytes, *Biochim. Biophys. Acta* 1686 (2004) 125–138.

[16] S.D. Williams, R.A. Gottlieb, Inhibition of mitochondrial calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2) attenuates mitochondrial phospholipid loss and is cardioprotective, *Biochem. J.* 362 (2002) 23–32.

[17] M.E. Gadd, K.M. Broekemeier, E.D. Crouser, J. Kumar, G. Graff, D.R. Pfeiffer, Mitochondrial iPLA2 activity modulates the release of cytochrome c from mitochondria and influences the permeability transition, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 6931–6939.

[18] D.J. Mancuso, C.M. Jenkins, R.W. Gross, The genomic organization, complete Mrna sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 9937–9945.

[19] G. Zambruno, P.C. Marchisio, A. Melchioni, S. Bondanza, R. Cancedda, M. De Luca, Expression of integrin receptors and their role in adhesion, spreading and migration of normal human melanocytes, *J. Cell Sci.* 105 (1993) 179–190.

[20] S. Orsulic, Y. Li, R.A. Soslow, L.A. Vitale-Cross, J.S. Gutkind, H.E. Varmus, Induction of ovarian cancer by defined multiple genetic changes in a mouse model system, *Cancer Cell* 1 (2002) 53–62.

[21] B.N. Desai, B.R. Myers, S.L. Schreiber, FKB12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction, *PNAS* 99 (2002) 4319–4324.

[22] G. Lupo, A. Nicotra, G. Giurdanella, C.D. Anfuso, L. Romeo, G. Biondi, et al., Activation of phospholipase A2 and MAP kinases by oxidized low-density lipoproteins in immortalized GP8.39 endothelial cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1753 (2005) 135–150.

[23] M.L. Nystrom, D. McCulloch, P.H. Weinreb, S.M. Violette, P.M. Speight, J.F. Marshall, I.R. Hart, G.J. Thomas, Cyclooxygenase-2 inhibition suppresses alpha6beta6 integrin-dependent oral squamous carcinoma invasion, *Cancer Res.* 66 (2006) 10833–10842.

[24] C.D. Anfuso, G. Lupo, L. Romeo, G. Giurdanella, C. Motta, A. Pascale, C. Tirolo, B. Marchetti, M. Alberghina, Endothelial cell-pericyte cocultures induce PLA2 protein expression through activation of PKC α and the MAPK/ERK cascade, *J. Lipid Res.* 48 (2007) 782–793.

[25] A. Nicotra, G. Lupo, G. Giurdanella, C.D. Anfuso, N. Ragusa, C. Tirolo, B. Marchetti, M. Alberghina, MAPKs mediate the activation of cytosolic phospholipase A2 by amyloid β (25–35) peptide in bovine retina pericytes, *Biochim. Biophys. Acta* 1733 (2005) 172–186.

- [26] F.G. Haluska, C. Thiele, A. Goldstein, H. Tsao, E.P. Benoit, D. Housman, Lack of phospholipase A2 mutations in neuroblastoma, melanoma and colon-cancer cell lines, *Int. J. Cancer* 72 (1997) 337–339.
- [27] C. Han, A.J. Demetris, G. Michalopoulos, J.H. Shelhamer, T. Wu, 85-kDa cPLA2 plays a critical role in PPAR-mediated gene transcription in human hepatoma cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282 (2002) G586–597.
- [28] C. Voelkel-Johnson, T.E. Thorne, S.M. Laster, Susceptibility to TNF in the presence of inhibitors of transcription or translation is dependent on the activity of cytosolic phospholipase A2 in human melanoma tumor cells, *J. Immunol.* 156 (1996) 201–207.
- [29] J. Balsinde, M.V. Winstead, E.A. Dennis, Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization, *FEBS Lett.* 531 (2002) 2–6.
- [30] Q. Dong, M. Patel, K.F. Scott, G.G. Graham, P.J. Russel, P. Sved, Oncogenic action of phospholipase A2 in prostate cancer, *Cancer Lett.* 240 (2006) 9–16.
- [31] J. Balsinde, M.A. Balboa, P.A. Insel, E.A. Dennis, Regulation and inhibition of phospholipase A2, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 (1999) 175–189.
- [32] S. Bao, A. Bohrer, S. Ramanadham, W. Jin, S. Zhang, J. Turk, Effects of stable suppression of Group VIA phospholipase A2 expression on phospholipid content and composition, insulin secretion, and proliferation of INS-1 insulinoma cells, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 187–198.
- [33] C. Denkert, M. Kobel, S. Berger, A. Siegert, A. Leclere, U. Trefzer, et al., Expression of cyclooxygenase-2 in human malignant melanoma, *Cancer Res.* 61 (2001) 303–308.
- [34] Y. Higashi, T. Kanekura, T. Kanzaki, Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression, *Int. J. Cancer* 86 (2000) 667–671.
- [35] A. Nicolaou, S.E. Estdale, M. Tsatmali, D.P. Herrero, A.J. Thody, Prostaglandin production by melanocytic cells and the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone, *FEBS Lett.* 570 (2004) 223–226.
- [36] A.C. Goulet, J.G. Einsphar, D.S. Alberts, A. Beas, C. Burk, A. Bhattacharyya, J. Bangert, J.M. Harmon, H. Fujiwara, A. Koki, M.A. Nelson, Analysis of cyclooxygenase 2 (COX-2) expression during malignant melanoma progression, *Cancer Biol. Ther.* 2 (2003) 713–718.
- [37] L. Kuzbicki, A. Sarnecka, B.W. Chwirot, Expression of cyclooxygenase-2 in benign naevi and during human cutaneous melanoma progression, *Melanoma Res.* 16 (2006) 29–36.
- [38] S. Tsuji, M. Tsujii, S. Kawano, M. Hori, Cyclooxygenase-2 upregulation as a perigenetic change in carcinogenesis, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 20 (2001) 117–129.

[39] C. Pisano, A. Ottaiano, F. Tatangelo, M. Di Bonito, M. Falanga, V.R. Iaffaioli, et al., Cyclooxygenase-2 expression is associated with increased size in human sporadic colorectal adenomas, *Anticancer Res.* 25 (2005) 2065–2068.

[40] L. Koumas, R.P. Phipps, Differential COX localization and PG release in Thy-1+ and Thy-1– human female reproductive tract fibroblasts, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283 (2002) C599–C608.

[41] J.P. Peng, C.Y. Su, H.C. Chang, C.Y. Chai, W.C. Hung, Overexpression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the hypopharynx, *Hum. Pathol.* 33 (2002) 100–104.

