



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA

**CORSO DI DOTTORATO IN BIOTECNOLOGIE IN MEDICINA
TRASLAZIONALE (XXXIII CICLO)**

**“L’anticorpo monoclonale Trastuzumab (Tz) modula il
contenuto proteico delle Vescicole Extracellulari (EVs)
rilasciate da cellule di carcinoma mammario ErbB2
positive”**

Dottoranda: Dott.ssa Silvia Marconi

Tutors: Prof.ssa Katia Cortese

Dott. Patrizio Castagnola

Coordinatore: Prof. Rodolfo Quarto

ANNO ACCADEMICO: 2020-2021

Introduzione

Il carcinoma mammario

Il carcinoma mammario, neoplasia epiteliale della ghiandola mammaria, è il tumore più comunemente diagnosticato nelle donne e seconda causa di morte correlata al cancro¹; dovuta principalmente alla diffusione e colonizzazione, da parte delle cellule tumorali, di organi distanti dal tumore primario. I principali siti metastatici del carcinoma mammario sono: ossa, polmoni, fegato e cervello². Si tratta di una patologia estremamente complessa ed eterogenea, caratterizzata da alterazioni biologiche che mostrano eterogeneità a livello molecolare, istopatologico e clinico che determinano decorsi clinici e risposte al trattamento, variabili e diversificate³. Al fine di organizzare questa disomogeneità e standardizzare la nomenclatura, sono stati sviluppati sistemi di classificazione sia istologica che molecolare.

La classificazione istologica si basa esclusivamente sulla morfologia e sull'istologia del tumore. L'Organizzazione Mondiale della Sanità permette di fare una duplice distinzione: carcinoma mammario non infiltrante (in situ) e infiltrante. Il carcinoma in situ comprende lesioni cancerose o precancerose di basso grado e circoscritte al di sopra della lamina basale dell'epitelio, senza che vi sia quindi un interessamento dei tessuti circostanti. A questa categoria appartengono il carcinoma duttale in situ e il carcinoma lobulare in situ. Il carcinoma invasivo, o infiltrante, al contrario, ha superato la lamina basale e invaso il tessuto sottostante. Esso comprende diversi fenotipi tumorali come il carcinoma infiltrante tubulare, lobulare, midollare, mucinoso, papillifero, apocrino e quello non altrimenti specificato o NAS (sottocategoria che non è riconducibile a particolari varianti morfologiche)⁴.

La classificazione su base molecolare riflette invece lo stato recettoriale (presenza o assenza di tre tipi di recettori: il recettore per gli estrogeni, il recettore per il progesterone e il recettore HER2 appartenente alla famiglia HER/ErbB di recettori tirosino-chinasi). Più del 60% delle forme di carcinoma mammario risulta positivo per l'espressione di questi recettori mentre una minore percentuale non esprime nessuno di essi e quindi definiti "tripoli negativi". Studi basati sull'analisi dei profili

di espressione genica, hanno consentito di effettuare un'ulteriore classificazione che ha permesso di riconoscere tre sottotipi di carcinomi mammari invasivi:

- “Luminali”, suddivisi ulteriormente in “luminali A” e “luminali B”. Il sottotipo “luminale A” si caratterizza generalmente per tumori di basso grado, buona prognosi, elevata sensibilità alla terapia ormonale ed una minore sensibilità alla chemioterapia. Presentano positività per recettori ormonali estrogeno (ER) e progesterone (PR), negatività per HER2 e bassa positività per Ki67 (marcatore correlato alla proliferazione cellulare).
- Il sottotipo "luminale B” si caratterizza per un fenotipo più aggressivo rispetto ai luminali A, comprendendo più frequentemente tumori di alto grado e associati ad una prognosi peggiore. Il trattamento cardine è rappresentato dalla chemioterapia. Si suddividono ulteriormente per la positività o negatività al recettore HER2. “Luminali B/HER2 positivi”: recettori ormonali positivi, HER2 sovraespresso o amplificato. “Luminali B/HER2 negativi”: recettori ormonali positivi con HER2 negativo ed alta attività proliferativa legata ad un rischio elevato di recidiva.
- HER2 positivi (non luminali): sovraesprimenti HER2, ma negativi per i recettori per estrogeni e progesterone.
- “Triplo-negativi”: caratterizzati da mancata espressione dei recettori ormonali e di HER2⁵.

La famiglia dei recettori HER/ERBB

La famiglia delle proteine HER/ErbB è costituita da quattro membri, i quali condividono un alto grado di omologia: EGFR (ErbB1/HER1), HER2 (Neu/ErbB2), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4). Questa classe di recettori tirosin-chinasici transmembrana, è all'origine di una complessa cascata di segnali intracellulari che modula la proliferazione, l'adesione, la migrazione e la differenziazione cellulare.

Tutti i membri della famiglia mostrano una struttura simile, costituita da quattro domini:

Il dominio extracellulare, di circa 620 amminoacidi, che coincide con l'estremità N-terminale della proteina, contiene il sito di legame per uno specifico ligando: è la

porzione meno conservata degli ErbB e per questo motivo i quattro recettori mostrano affinità diverse per i vari ligandi. E' caratterizzato dall'aver quattro subunità (domini I-IV): i domini II e IV sono ricchi in cisteine, e legati tra loro da ponti disolfuro; mentre i domini I e III sono direttamente coinvolti nel legame con il ligando.

Il dominio transmembrana idrofobico, costituito da una singola alfa-elica, ha diverse funzioni regolatrici come la modulazione dell'internalizzazione del recettore, la sua distribuzione nelle cellule polarizzate e la sua associazione con altre proteine quali la calmodulina .

Il dominio intracellulare, di circa 550 amminoacidi, contiene il sito catalitico con attività tirosin-chinasica (ad eccezione di ErbB3, privo di attività chinasica), responsabile della cascata del segnale intracellulare; e una coda carbossi-terminale con attività regolatoria⁶. Studi cristallografici hanno rivelato che ErbB3 ed ErbB4 esistono in una conformazione chiusa, quindi come monomeri inattivi, con il dominio di dimerizzazione (dominio II) legato al dominio IV che impedisce la formazione di dimeri con altri recettori della famiglia ErbB⁷. Questa conformazione rende inaccessibile il braccio di dimerizzazione e blocca l'attivazione del recettore, impedendo la formazione della tasca di legame per il ligando. L'attivazione dei recettori si ottiene in seguito alla formazione di interazioni intramolecolari tra i domini I e III e contemporanea perdita di legame tra i domini II e IV della porzione extracellulare del recettore; ciò determina un riarrangiamento conformazionale con conseguente esposizione del braccio dimerizzante precedentemente nascosto e la formazione della tasca per il ligando. Questa conformazione permette la dimerizzazione (omo o eterodimerizzazione) del recettore e conseguente attivazione^{8,9}.

Anche il recettore ErbB1 esiste in una conformazione chiusa, quindi come monomero inattivo, con il dominio di dimerizzazione (dominio II) che interagisce con una tasca o "modulo C1" all'estremità C-terminale del sottodominio IV determinando una conformazione "auto-inibita" e impedendo in questo modo la formazione di dimeri con altri recettori della famiglia ErbB⁶. Questa conformazione rende inaccessibile il braccio di dimerizzazione e blocca l'attivazione del recettore,

impedendo la formazione della tasca per il ligando. Recenti studi hanno però dimostrato che l'attivazione di ErbB1 è differente rispetto a quella di ErbB3 ed ErbB4.

L'attivazione del recettore si ottiene in seguito al legame del ligando al dominio extracellulare non legato. A seguito di questo evento, i domini assumono una conformazione estesa, stabilizzata attraverso l'interazione di due "forcine beta" esposte (Fig. 1). Questo cambiamento conformazionale, da legato a esteso, è probabile che induca una rotazione di circa 140° dei domini transmembrana, che riorienta il dominio della chinasi inattiva simmetrica alla configurazione attiva asimmetrica¹⁰. Questa serie combinata di eventi determina un'esposizione del braccio dimerizzante precedentemente nascosto e la formazione della tasca di legame per il ligando. Questa conformazione permette la dimerizzazione (omo o eterodimerizzazione) del recettore e conseguente attivazione⁷.

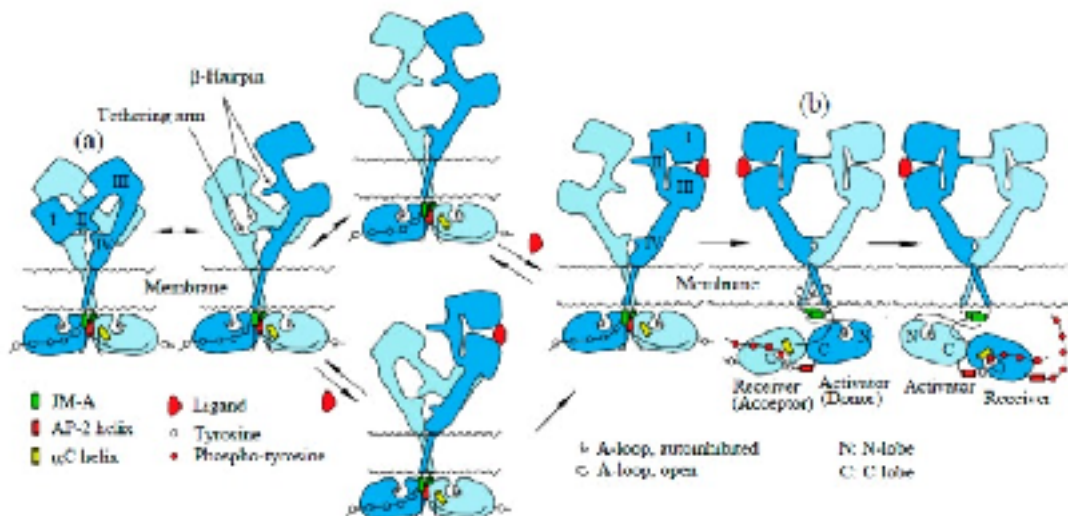


Fig 1: Modello di attivazione di ErbB1 mediante legame con il ligando. Pannello A: dimero EGFR legato e inattivo; pannello B: dimero EGFR esteso e attivo.

Differenti ligandi impiegano strategie diverse per raggiungere la conformazione stabile del dimero: un ligando può infatti legarsi a due molecole di recettore, oppure due ligandi si legano simultaneamente a due recettori e solo in un secondo momento si avrà la dimerizzazione. Questo permette la trans-fosforilazione dei residui

tirosinici di ciascun recettore ad opera del recettore partner: in questo modo si avvia una cascata di segnali biochimici intracellulari che porta all'attivazione di vari geni e definisce quindi la risposta biologica. I ligandi dei recettori ErbB mostrano differenti gradi di affinità per i vari recettori: l'EGF (epidermal growth factor), il TGFalfa (fattore di crescita trasformante) e l'anfiregulina (AR) si legano specificamente all'ErbB1; una seconda categoria si lega sia a ErbB1 che a ErbB4 e comprende EPR (epiregulina), BTC (betacellulina) e HB-EGF (Heparin-binding epidermal growth factor). La terza categoria comprende tutte le neureguline (NRG1-NRG4); tra queste, NRG1 e NRG2 si legano a ErbB3 ed ErbB4, mentre NRG3 e NRG4 si legano solo a ErbB4 ⁸.

Il recettore ErbB2 o HER2 è noto anche come Neu in quanto identificato per la prima volta in una linea di cellule di glioblastoma (tumore neurale) di roditore. E' una glicoproteina transmembrana di 185 KDa, codificata dal gene HER2, un proto-oncogene situato sul braccio lungo del cromosoma 17q21-q-22. Dei quattro recettori ErbB, solo ErbB2 è soggetto ad un ulteriore livello di regolazione postraduzionale, mediata da chaperoni molecolari, principalmente Hsp90; il cui ruolo nella regolazione di ErbB2 è stato attribuito alla stabilizzazione del recettore sulla superficie cellulare ⁹. ErbB2 è normalmente espresso a bassi livelli in cellule adulte sane di numerosi tessuti tra cui quelle dell'epitelio mammario. La funzione di ErbB2 nei tessuti adulti sani sembra avere un ruolo nella proliferazione e differenziazione delle cellule epiteliali¹¹ e nella protezione dei cardiomiociti dall'apoptosi¹². L'amplificazione e la sovraespressione di ErbB2 sono state riportate in diversi tumori umani, tra cui il carcinoma mammario, il carcinoma ovarico, polmonare, della vescica e altri¹³. Il 20-30% dei carcinoma mammari presenta una sovraespressione del recettore di membrana ErbB2¹⁴ con livelli da 10 a 100 volte superiori rispetto ai tessuti sani. La sovraespressione di ErbB2 è associata a prognosi sfavorevole anche nella maggior parte degli altri tumori, dovuta a chemioresistenza, sviluppo di metastasi, minor tasso di sopravvivenza e comparsa di recidive¹⁴. La sovraespressione di ErbB2 nel cancro al seno è principalmente causata dall'amplificazione genica con conseguente aumento del numero di

trascritti e dell'espressione proteica ma può anche derivare da una deregolazione post-trascrizionale come una maggior traduzione proteica^{15,16}.

Al contrario degli altri membri della famiglia, ErbB2 è un “recettore orfano” in quanto non ha ligandi noti, tuttavia esso si trova in una forma costitutivamente attiva, in quanto il dominio II e il dominio IV non sono mai associati e il braccio dimerizzante è costantemente esposto sul lato extracellulare^{17,18}. Questa conformazione aperta rende ErbB2 il partner di dimerizzazione preferenziale per gli altri membri della famiglia, promuovendo un suo ruolo chiave nella trasduzione di segnali.

Le reti di segnalazione dei recettori ErbB sono costituite da diversi moduli interconnessi e sovrapposti; l'attivazione di questi recettori (omodimeri o eterodimeri) porta alla formazione di complessi proteici di segnalazione tra cui Ras/ERK, PI3K/Akt, PLC- γ 1, Src e STAT¹⁹.

Tra le principali vie di segnalazione a valle di ErbB2 troviamo la via della PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) e la via delle MAPK (Mitogen Activated Proteine Kinase), coinvolte nei processi di crescita e differenziamento cellulare, sopravvivenza, migrazione, invasione cellulare e di inibizione dell'apoptosi (Fig. 2).

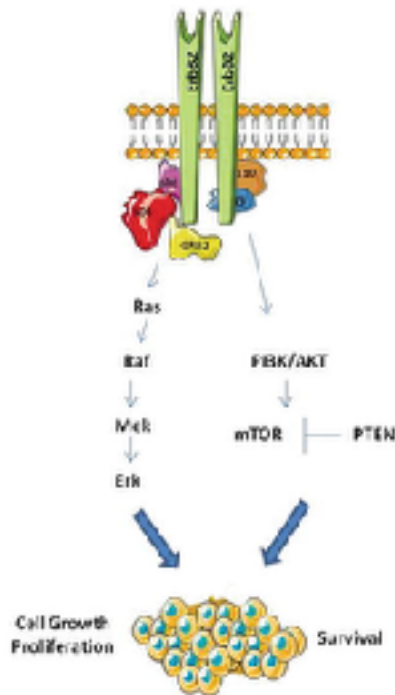


Fig. 2: Rete di segnalazione del recettore ErbB2. L'attivazione di ErbB2 porta all'attivazione delle vie della fosfoinositide-3-chinasi (PI3K) / AKT e della MAP chinasi (RAS / RAF / MAPK) che innescano la proliferazione, la crescita e la sopravvivenza delle cellule.

Via di segnalazione PI3K/Akt/mTOR

La via di segnalazione PI3K/Akt/mTOR è una via cruciale in molti processi fisiologici, tra i quali la progressione del ciclo cellulare, la trascrizione, la traduzione, il differenziamento, l'apoptosi e la motilità²⁰. Questa via molecolare coinvolta nella sopravvivenza cellulare viene spesso deregolata in diverse neoplasie maligne andando così a contribuire alla patogenesi tumorale e alla resistenza alle terapie.

In presenza di un ligando specifico per un recettore tirosin-chinasico avviene l'attivazione, tramite fosforilazione, della PI3K. Questo enzima comprende tre diverse classi: I, II, III e ognuna presenta caratteristiche diverse sia nella struttura molecolare che nella specificità di substrato. In seguito al legame con il recettore di membrana, le PI3K di classe I fosforilano il substrato fosfatidil inositolo 4,5 bifosfato (PIP2) a fosfatidil inositolo 3,4,5 trifosfato (PIP3) il quale rimane sulla

membrana plasmatica ed attiva l'enzima AKT²¹. AKT contiene un dominio PH (pleckstrin homology) tramite il quale interagisce con i prodotti lipidici fosforilati di PI3K, principalmente con il PIP3, sintetizzati a livello della membrana. Il legame di AKT con il PIP3 induce un cambiamento conformazionale di AKT che ne permette l'attivazione grazie alla fosforilazione del residuo Thr308, da parte di PDK1, e del residuo Ser473, da parte della chinasi PDK2. E' necessaria la fosforilazione di entrambi questi residui per ottenere la completa attivazione di AKT, ma la sua attività è però modulata da una complessa rete di proteine regolatrici che interagiscono con i diversi domini coinvolti nell'attivazione²².

mTOR (mammalian target of rapamycin) è una chinasi di 289 kDa, che possiede un dominio catalitico COOH-terminale con un'alta omologia di sequenza con PI3K²². mTOR gioca un ruolo centrale nella regolazione della crescita e della proliferazione cellulare e nella progressione del ciclo cellulare. E' costituito da due complessi multiproteici, mTORC1 sensibile alla rapamicina e mTORC2 insensibile alla rapamicina, se non in seguito a trattamento prolungato²³. AKT regola il complesso mTORC1 fosforilando e inibendo TSC-2 (tuberous sclerosis 2) che è una proteina GAP (GTP-ase activating protein) che si lega a TSC-1 (tuberin) formando un complesso che determina il blocco della proteina G chiamata Rheb. L'inibizione di TSC-2 permette alla proteina Rheb di accumularsi in uno stato legato a GTP e di attivare mTORC1²³. mTOR attivato determina angiogenesi e crescita cellulare.

Via di segnalazione Ras/Raf/MEK/ERK

Questa via di segnalazione influenza molte funzioni cellulari ed è anch'essa implicata nei fenomeni di proliferazione cellulare, migrazione, inibizione dell'apoptosi. L'attivazione della cascata delle MAP chinasi avviene in seguito al legame di ligandi a livello dei recettori tirosin-chinasi localizzati sulla membrana, che dimerizzano e interagiscono con la proteina G monomeric Ras. Questa proteina è dotata di attività GTP-asica e promuove la fosforilazione di proteine a valle, tra cui la chinasi Raf che viene reclutata a livello della membrana plasmatica. A sua volta Raf fosforila MEK, che è in grado di attivare la MAP chinasi ERK

mediante fosforilazione. Quest'ultima può attivare numerosi fattori trascrizionali, tra cui c-Myc e CREB coinvolti nella proliferazione e nell'inibizione dell'apoptosi. Un'altra importante funzione di ERK è quella di fosforilare alcune molecole regolatrici dell'apoptosi localizzate sulla membrana mitocondriale esterna, tra cui Bim, Bax, Bcl-2, Bad²⁴.

Alcuni studi dimostrano che la via della PI3K e la via delle MAPK sono strettamente correlate tra loro, soprattutto a livello dei loro mediatori AKT ed ERK; infatti è stato dimostrato che l'inibizione di ERK determina una maggiore fosforilazione di AKT²⁵.

Il trattamento del carcinoma mammario ErbB2 positivo può ricadere sia a favore di un trattamento chemioterapico, sia di una strategia terapeutica che preveda l'utilizzo di farmaci anti-ErbB2 (oppure un regime di associazione di entrambi, in considerazione delle caratteristiche clinico-patologiche relative ad ogni singolo caso). La chemioterapia è spesso basata sull'utilizzo di antracicline (soprattutto Doxorubicina ed Epirubicina) che determinano un'inibizione della sintesi del DNA e formazione di radicali liberi, con conseguente aumento dello stress ossidativo. Questo trattamento è però spesso legato all'insorgenza di fenomeni di tossicità, in particolare la cardiotossicità. A seguito di tale fenomeno, si è quindi registrato un incremento dell'utilizzo dei taxani nelle fasi più precoci della malattia, da solo o in combinazione con le antracicline stesse^{26,27}.

I trattamenti con bersaglio ErbB2 rappresentano le terapie cardine per il carcinoma mammario ErbB2 positivo in quanto permettono di ottenere un trattamento diretto esclusivamente alle cellule positive per il recettore. A queste molecole appartengono gli anticorpi monoclonali quali Trastuzumab, Pertuzumab e gli inibitori della attività della tirosin chinasi del recettore quali Lapatinib e Neratinib. Oltre all'anticorpo Trastuzumab come tale, è stato sviluppato un farmaco costituito dalla coniugazione dell'anticorpo monoclonale Trastuzumab con la citotossina emtansina (T-DM1), in grado di legarsi selettivamente alle cellule tumorali ErbB2+ e rilasciare al loro interno la citotossina che agisce come agente chemioterapico, massimizzando così il beneficio clinico e riducendo l'incidenza di effetti collaterali.

Trastuzumab: meccanismo d'azione

Il Trastuzumab (Tz), comunemente noto con il nome commerciale di Herceptin, è un anticorpo monoclonale ricombinante (mAb) umanizzato appartenente alla classe delle IgG1 e diretto contro il dominio extracellulare IV della proteina ErbB2²⁸. Il Tz è utilizzato in terapia dal 1998 ed è stato inoltre il primo farmaco antitumorale diretto contro ErbB2 approvato sia negli USA che in Europa. Sebbene la sua azione antitumorale non sia stata ancora completamente compresa, diversi effetti molecolari e cellulari sono noti essere alla base del meccanismo di funzionamento di questa molecola. Legandosi al dominio extracellulare, il Trastuzumab inibisce l'attivazione recettoriale e la successiva trasmissione del segnale a valle (via delle PI3K e MAPK), l'induzione dell'arresto del ciclo cellulare, l'inibizione dell'angiogenesi e l'interferenza con la riparazione del DNA. Oltre a tali meccanismi d'azione citostatici, esplica anche un'azione citotossica cellulo-mediata dall'anticorpo (ADCC, antibody-dependent-cell-mediated cytotoxicity)²⁹. Le cellule natural killer (NK), un tipo di cellule immunitarie principalmente coinvolte nell'ADCC, esprimono il recettore Fc, a cui si lega il dominio Fc del Tz, attivando così la lisi della cellula a cui l'anticorpo è legato³⁰.

Studi clinici hanno dimostrato che la combinazione di Trastuzumab con la chemioterapia standard produce tassi di risposta migliori rispetto alla sola chemioterapia^{31,32}. Pertanto, le combinazioni che includono Trastuzumab sono considerate lo standard di cura per i pazienti affetti da carcinoma mammario ErbB2 iperesprimente³³.

Tra i meccanismi citostatici, l'effetto più noto di Tz è l'inibizione delle vie MAPK e PI3K/Akt, che porta come risultato finale ad arresto del ciclo cellulare e alla soppressione della crescita e proliferazione cellulare. Il meccanismo con cui Tz induce una diminuzione della segnalazione del recettore è ancora oggetto di controversie. Secondo alcuni studi, Tz può bloccare la regolazione di PI3K tramite l'attivazione del suo inibitore PTEN (phosphatase and tensin homolog)³⁰. L'ipotesi più accreditata è che il trattamento con Tz inibisca l'attività della chinasi Src (proteina adattatrice che si lega ad ErbB2) non permettendone più il legame con ERBB2 e determinando così una fosforilazione della tirosina PTEN ed una sua

maggior localizzazione in membrana³⁴. PTEN così attivata defosforila Akt inibendo in questo modo la via di segnalazione PI3K. Inoltre è stato dimostrato che Tz determina un arresto del ciclo cellulare durante la fase G1 ripristinando i livelli dell'inibitore delle chinasi dipendenti da ciclina chiamato p27Kip, il quale inibisce i complessi ciclina E/CDK2 e impedisce l'avanzamento del ciclo cellulare in fase S. Altri due effetti importanti del Tz, che concorrono a ridurre le dimensioni della massa tumorale, sono l'induzione di morte cellulare tramite apoptosi e l'inibizione dell'angiogenesi mediata da diminuzione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), diminuzione della densità dei microvasi e riduzione della migrazione di cellule endoteliali, accompagnati da una riduzione di fattori pro-angiogenici (TGF alfa, Ang1, PAI1) ed un aumento dei fattori anti-angiogenici (TSP1). Inoltre, Tz media i suoi effetti tramite l'inibizione del taglio del dominio extracellulare di ErbB2. Infatti il recettore ErbB2 a lunghezza intera subisce un taglio proteolitico producendo un dominio extracellulare (ECD) di 110 kDa e un frammento troncato N-terminale di 95 kDa, che rimane associato alla membrana plasmatica. E' stato osservato che alti livelli sierici di ErbB2 ECD sono correlati a prognosi sfavorevole, aumento delle metastasi e diminuzione della sensibilità alle terapie. Infine, questo anticorpo monoclonale ha la capacità di inibire i meccanismi di riparo del DNA modulando negativamente molecole coinvolte in questo processo.

Sicuramente, il meccanismo d'azione più oscuro è quello relativo alla diminuzione della segnalazione del recettore in seguito ad una sua degradazione. Alcuni studi sostengono che Tz sia in grado di innescare l'internalizzazione e la successiva degradazione di ErbB2, promuovendo l'attività della tirosin chinasi-ubiquitina ligasi c-Cbl; ma il meccanismo mediante cui c-Cbl media la degradazione di ErbB2 rimane in gran parte da chiarire³⁵. Altri studi sostengono la tesi opposta, ovvero che Tz non solo non sia un mediatore della degradazione di ErbB2, ma che non abbia neppure effetti sulla formazione di omo- ed eterodimeri di ErbB2 quando questo recettore risulta iper-espresso^{36,37}.

Trastuzumab: meccanismi di resistenza

Nonostante Tz rappresenti ad oggi il farmaco d'elezione per il trattamento del carcinoma mammario ErbB2 positivo e abbia rivoluzionato l'approccio nell'ambito delle terapie mirate, la risposta al farmaco, da parte delle pazienti, risulta essere limitata nel tempo e generalmente circoscritta all'anno. La resistenza al farmaco e la comparsa di recidive rappresentano oggi la maggiore limitazione della terapia con questo anticorpo. Nonostante siano stati compiuti molti sforzi per comprendere e aggirare l'ostacolo della resistenza, diversi studi dovranno ancora essere condotti su quest'aspetto per poter ottenere risultati soddisfacenti. Esistono meccanismi di resistenza primaria, o innata, e secondaria, o acquisita in seguito a prolungata esposizione al farmaco. Circa il 65% delle pazienti possiede una resistenza primaria al Tz; della restante percentuale di pazienti che inizialmente rispondono, circa il 70% va incontro ad una resistenza secondaria al farmaco con formazione di metastasi nel giro di un anno³⁶. Uno dei meccanismi di resistenza è la presenza di mutazioni geniche di ErbB2 nella regione che codifica per il dominio extracellulare, sito di legame per il Tz, impedendo in questo modo il legame tra recettore e anticorpo. La mutazione favorisce il taglio proteolitico del dominio extracellulare di ErbB2 e la formazione del frammento troncato da 95 kDa³⁸. Un secondo meccanismo di resistenza è dovuto al fatto che il Tz risulta efficace nei confronti di ErbB2 ma non degli altri recettori della famiglia ErbB; in questo modo viene a crearsi una sorta di attivazione compensatoria da parte degli altri componenti della famiglia in seguito all'eterodimerizzazione con ErbB2. Pertanto, anche in presenza di Tz, gli eterodimeri di ErbB2 con gli altri recettori tirosin-chinasici sono funzionali e determinano l'attivazione della cascata di segnali delle vie PI3K/Akt e MAPK che porta a proliferazione e sopravvivenza cellulare³⁰. Un ulteriore meccanismo di resistenza è dovuto ad un mascheramento e ad un'inaccessibilità dell'epitopo di ErbB2 da parte della Mucina 4 (MUC 4). Si tratta di una proteina di membrana altamente glicosilata che ha una funzione protettiva per le cellule epiteliali. Essa interferisce con il farmaco in quanto maschera il suo sito di legame ad ErbB2³⁹. Anche la perdita di PTEN o la diminuzione della sua espressione, riveste un importante ruolo nel determinare l'inefficacia del farmaco. In cellule

resistenti al Tz, sono stati osservati bassi livelli di PTEN: in questo modo non si ha più l'interruzione del legame della chinasi Src a ErbB2 e la proteina PTEN non è più in grado di inibire la via PI3K/Akt. Oltre il 50% dei carcinomi mammari in stadio avanzato presenta una mutazione di PTEN che porta ad una riduzione dei suoi livelli³⁹.

Uno dei meccanismi di resistenza al Tz più studiati è l'autofagia, processo catabolico che consiste nella degradazione lisosomiale di materiale citoplasmatico e organuli che rende di nuovo disponibili costituenti fondamentali come lipidi e aminoacidi, importanti per il mantenimento dell'omeostasi cellulare e per la regolazione del turnover di proteine e di organuli citoplasmatici⁴⁰. Nelle cellule eucariotiche esistono tre tipi principali di autofagia: microautofagia, autofagia chaperone-mediata e macroautofagia⁴⁰. Nella microautofagia il citoplasma viene inglobato direttamente nei lisosomi attraverso un riarrangiamento dinamico della membrana lisosomiale, la quale si invagina verso il lume interno, finché non si stacca come vescicola nel lume lisosomiale. Diversamente, l'autofagia chaperone-mediata (CMA) permette la traslocazione di proteine solubili non ripiegate, direttamente attraverso la membrana limitante dei lisosomi.

La macroautofagia (chiamata semplicemente autofagia) avviene in maniera ubiquitaria in tutte le cellule eucariotiche e riveste importanti ruoli fisiologici⁴¹. Il termine "autofagia" deriva dalle parole greche "fagia" (mangiare) e "auto" (se stesso) ed è stato coniato da Christian de Duve (premio Nobel per la medicina e la Fisiologia nel 1974). L'autofagia è costitutivamente attiva nelle cellule, ma viene fortemente indotta da situazioni di stress metabolico, come in caso di privazione di nutrienti o fattori di crescita, stress ossidativo, ipossia, etc. In condizioni di stress, l'autofagia agisce primariamente come meccanismo protettivo volto al ripristino dell'omeostasi cellulare tramite la degradazione di organuli danneggiati o lo smaltimento di proteine mal ripiegate e/o aggregate che potrebbero risultare dannose per la cellula. Questo processo adattativo si verifica in risposta a stress cellulare come carenza di nutrienti, ipossia, infezioni⁴².

L'autofagia svolge due importanti processi nella cellula: fornisce l'energia necessaria alla sopravvivenza cellulare, attraverso la degradazione di vari componenti cellulari ed elimina organelli danneggiati e non più funzionanti⁴³.

Regolazione molecolare dell'autofagia

L'autofagia è un percorso a tappe che prevede la degradazione, lisosoma mediata, del materiale trasportato nell'autofagosoma ed è caratterizzata da una prima fase di induzione che prevede la formazione della porzione di membrana iniziale, detta fagoforo, e dell'intervento di proteine del complesso ULK-ATG13-FIP200. Le chinasi ULK (ULK 1/2) sono regolate da mTOR che, in condizioni di abbondanza di nutrienti, fosforila ed inattiva le proteine ULK; inibendo l'autofagia. Durante privazione di nutrienti, invece, mTOR è inattivato causando defosforilazione e attivazione di ULK1 e 2 e loro localizzazione nei pressi del fagoforo⁴⁴. Le proteine ATG (Autophagy-related gene) determineranno poi la successiva espansione del fagoforo⁴⁵.

La tappa successiva di allungamento e maturazione del fagoforo richiede l'attivazione del complesso multimerico ATG5-ATG12-ATG16L il quale facilita inoltre l'attività di ATG3 e ATG7, due proteine che cooperano per mediare la coniugazione della forma citosolica di LC3 (LC3-I) con la fosfatidiletanolamina (PE), portando alla sintesi della forma lipidata (LC3-II) che si localizza sul fagoforo in allungamento, sia sulla membrana interna che su quella esterna. Prima che si formi il legame, LC3 è tagliato, da parte di ATG4B, in LC3-I (forma non coniugata di LC3). La conversione di LC3-I in LC3-II (LC3 coniugato ai lipidi di membrana) indica l'avvenuta formazione dell'autofagosoma. Il completamento della maturazione consiste nella fusione dell'autofagosoma con la membrana del lisosoma, generando così un autofagolisosoma. Durante questa ultima fase, LC3-II interagisce con la proteina p62 ed è riconvertito in LC3-I. Questo ultimo processo è gestito dalle proteine LAMP⁴⁶. La degradazione del contenuto lisosomiale viene operata dalle idrolasi acide presenti nel lume dell'organello e le componenti

elementari che ne derivano, sono esportate nel citoplasma grazie alle permeasi e infine riutilizzate dalla cellula.

Autofagia e rilascio di EVs come meccanismi di resistenza nel cancro

Il contributo dell'autofagia nel cancro è estremamente complesso; molti dati bibliografici supportano l'evidenza che tale processo può avere sia la funzione di promotore che di soppressore tumorale. Questo paradosso può essere spiegato con i distinti ruoli che l'autofagia può assumere durante la progressione tumorale, che dipendono dal tipo di tumore, dal contesto e dalla stadiazione. L'autofagia è quindi considerata, nel contesto tumorale, un'arma a doppio taglio: mentre alcune evidenze suggeriscono una sua funzione come soppressore tumorale negli stadi iniziali della patologia, ci sono altrettante prove che l'autofagia può essere utilizzata dalle cellule tumorali come meccanismo di sopravvivenza durante particolari momenti di stress; condizioni che si presentano durante il trattamento farmacologico, la progressione tumorale e la metastasi^{47,48}.

Inizialmente si pensava che l'autofagia svolgesse unicamente un meccanismo di soppressione tumorale dal momento che deficienze in questo processo portano all'accumulo di macromolecole e organuli danneggiati (soprattutto mitocondri), inducendo conseguentemente un incremento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) causando stress ossidativo, danno al DNA e instabilità genomica; pertanto difetti nell'autofagia sono stati associati con l'accumulo di mutazioni oncogeniche e incremento di suscettibilità ai tumori^{49,50}.

Accanto al suo importante ruolo nella soppressione tumorale, l'autofagia può rappresentare un meccanismo per garantire la sopravvivenza delle cellule tumorali durante la loro crescita e nella formazione di metastasi. Diversi studi hanno dimostrato l'esistenza di una connessione tra il cuore ipossico del tumore e l'autofagia. Il fattore inducibile dell'ipossia HIF- α è, infatti, un regolatore positivo del processo autofagico e lo innesca con lo scopo di indurre una risposta di sopravvivenza nella cellula, a seguito di una condizione di stress⁵¹. E' inoltre stato osservato che l'autofagia interviene nella promozione dello sviluppo tumorale

favorendo la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e quindi la migrazione e l'invasività cellulare, attraverso un'alterazione nell'espressione di molecole di adesione⁴⁰.

Un ulteriore meccanismo di resistenza al Tz è rappresentato dal rilascio di vescicole extracellulari (EVs). Da alcuni anni è stato dimostrato che le EVs, oltre ad essere parte integrante del microambiente intercellulare, rappresentano un importante meccanismo di comunicazione cellulare. Per molto tempo si è pensato che queste vescicole extracellulari fossero detriti cellulari inerti, che si potevano riscontrare nel sangue o negli spazi interstiziali, derivanti da cellule danneggiate o dal normale turnover delle membrane plasmatiche⁵². La loro presenza nello spazio extracellulare è stata descritta per la prima volta nel 1946 da Chargaff e West⁵³ nel plasma, come particelle procoagulanti di derivazione piastrinica, e identificate come “polvere piastrinica” da Wolf nel 1967⁵⁴. Solo successivamente, nel 1977, De Broe e collaboratori hanno suggerito un ruolo, da parte di queste vescicole, nella fisiologia cellulare ed in particolare che il loro rilascio potesse derivare da uno specifico meccanismo, dato che esse veicolavano enzimi di membrana funzionali e analoghi a quelli presenti nelle cellule da cui erano stati generati⁵⁵. Nel 1983, studi riguardo all'ultrastruttura hanno dimostrato che le vescicole venivano rilasciate dai corpi multivescicolari (MVB) dopo la loro fusione con la membrana plasmatica, durante il differenziamento degli eritrociti⁵⁶. Oltre un decennio più tardi, Raposo e colleghi hanno dimostrato che queste vescicole, poi chiamate esosomi, isolate dai linfociti B trasformati dal virus Epstein-Barr, erano particelle in grado di presentare l'antigene e indurre una risposta nelle cellule T⁵⁷. Nel decennio 2006-2007, la scoperta che le EVs contengono RNA, ed in particolare microRNA, ha rinnovato e accresciuto l'interesse per queste vescicole, identificandole come mediatori della comunicazione cellula-cellula⁵⁸. In seguito a questi studi pionieristici, le EVs sono state isolate dal terreno condizionato della maggior parte di linee cellulari e dai fluidi biologici quali saliva, urina, liquido amniotico, liquido di lavaggio bronco alveolare, latte materno, plasma, siero e liquido seminale^{59,60}.

Classificazione delle EVs

Un passo importante nello studio delle EVs è stato compiuto nel 2011 dalla Società Internazionale di Vescicole Extracellulari (ISEV), con l'obiettivo di unificarne la nomenclatura. I dati ottenuti hanno suggerito che le dimensioni, il contenuto e la composizione della membrana delle EVs sono eterogenee tra loro e strettamente connesse alla cellula d'origine. Ad oggi, nonostante siano state proposte caratteristiche peculiari per ogni classe di vescicole, non esiste un'identificazione specifica dei marcatori di ogni sottopopolazione che sia universalmente accettata dalla comunità scientifica. A questa problematica, si aggiunge la limitazione dovuta alla mancanza di procedure di purificazione e di caratterizzazione standardizzate. Inoltre, le tecniche di isolamento non permettono di ottenere una popolazione pura, ma una miscela composta da diverse sottopopolazioni di EVs. Considerate queste difficoltà, attualmente non vi è un consenso univoco sulla nomenclatura da utilizzare per indicare le diverse popolazioni di vescicole e la nomenclatura di queste ultime ha spesso un riferimento dovuto alla cellula di origine, esempio: dexosomi (esosomi derivati da cellule dendritiche)⁶¹ e prostasomi (vescicole derivate dalla prostata)⁶². Secondo la classificazione maggiormente riconosciuta, le EVs sono classificate in sei distinti tipi: due di questi sono riconosciuti all'unanimità, cioè esosomi e microvescicole; a queste si aggiunge la classe dei corpi apoptotici (o vescicole apoptotiche)^{63,64}. Vengono inoltre distinti gli ectosomi (rilasciati dai leucociti polimorfonucleati), le particelle di membrana e le vescicole exosome-like, distinte sulla base delle caratteristiche chimico-fisiche delle vescicole, tra cui la densità, le dimensioni, la morfologia in microscopia elettronica, la sedimentazione, la composizione lipidica, i marcatori di superficie e l'origine cellulare⁶⁵. Le EVs, secondo una classificazione meno complessa e più semplicistica, possono essere considerate in tre sottopopolazioni principali: le microvescicole, i corpi apoptotici e gli esosomi.

Le microvescicole

Le microvescicole (MV) sono vescicole che vengono rilasciate dalla membrana plasmatica in condizioni di stress cellulare e sono state trovate in diversi liquidi biologici. Sono particelle con un diametro compreso tra 100 nm e 1 μm ⁶³ e si formano come risultato della gemmazione della membrana plasmatica, con un meccanismo calcio dipendente. Poiché le MV si formano come estroflessione della membrana cellulare, la loro composizione lipidica riflette molto quella della cellula di origine, ma la distribuzione dei lipidi nel bilayer di membrana è differente. Uno degli aspetti più caratteristici è la presenza della fosfatidilserina sul versante esterno della membrana che delimita le vescicole, nonché la presenza di proteine associate ai *ruffles* lipidici, microdomini di membrana ricchi in colesterolo, sfingolipidi e proteine deputate alla traduzione del segnale, al traffico di membrana o alla riorganizzazione del citoscheletro⁶⁶. Le MV hanno la capacità di trasferire, alla cellula bersaglio, proteine, RNA messaggeri, microRNA e piccoli RNA non codificanti, in grado di alterare l'espressione genica, la proliferazione e il differenziamento nelle cellule riceventi^{67,68}.

I corpi apoptotici

I corpi apoptotici sono vescicole con un diametro compreso tra 1 e 4 μm . Esse contengono acidi nucleici, organelli cellulari e porzioni citoplasmatiche o di membrana, che vengono rilasciati dalle cellule durante i processi di apoptosi, per essere fagocitati dai macrofagi ed evitare la dispersione del contenuto cellulare all'esterno, con il rischio di innescare un processo infiammatorio^{69,70}.

Gli esosomi

Gli esosomi sono vescicole extracellulari presenti in molti liquidi biologici, tra cui urina, sangue, ascite, liquido cerebrospinale e in fluidi corporei come siero e plasma. Sono inoltre rilasciati dalle cellule nelle colture in vitro e quindi presenti nel terreno di coltura cellulare.

Hanno un diametro compreso tra i 30 e i 100-120 nm e la loro morfologia osservata mediante microscopia elettronica a trasmissione è definita tipicamente *cup-shaped*. La membrana che delimita gli esosomi contiene fosfolipidi con livelli relativamente alti di colesterolo, sfingomieline, ceramidi e il loro contenuto è variabile ed è correlato al tipo cellulare da cui originano. Il contenuto proteico è rappresentato da proteine di membrana come integrine e tetraspanine, tra cui CD9, CD63 e CD81; proteine coinvolte nel traffico di membrane come Rab, GTPasi, annexina e flotillina; proteine del citoscheletro e proteine coinvolte nella formazione degli esosomi stessi quali componenti del complesso ESCRT come Alix, Tsg 101, heat shock protein (HSP). Oltre a lipidi e proteine, negli esosomi sono anche presenti molecole di DNA e di RNA come miRNA e lunghi RNA non codificanti (lncRNA)⁷¹.

Percorsi di formazione e rilascio degli esosomi

Il percorso di formazione degli esosomi inizia nel sistema endosomiale: gli endosomi precoci maturano in endosomi tardivi/MVB e, durante questo processo, l'invaginazione della membrana endosomiale comporta la formazione di vescicole intraluminali (ILVs) nel lume dei MVB⁷². A loro volta, i MVB, possono seguire due destini "classici": o fondersi con la membrana plasmatica liberando le ILV sottoforma di esosomi nell'ambiente extracellulare o fondersi con il lisosoma per la degradazione del loro contenuto. Esistono diversi pathway intracellulari di sorting che indirizzano le proteine verso la formazione degli esosomi o alla loro degradazione, implicando quindi l'esistenza di diversi tipi di MVB. Uno studio del 2018 sottolinea la presenza di una terza possibilità di fusione da parte del MVB con l'autofagosoma e la formazione di un organulo ibrido, l'anfisoma, che rappresenterebbe l'organulo di congiunzione tra la via autofagica e la via rappresentata dal rilascio di esosomi⁷³.

Per molto tempo si è pensato che i MVB rappresentassero esclusivamente una fase tardiva nel processo di maturazione degli endosomi a lisosomi e che, quindi, gli esosomi fossero esclusivamente dei rifiuti cellulari. In realtà, come precedentemente anticipato, i MVB possono evolvere in lisosomi oppure essere

veicolati verso la membrana plasmatica dove, in seguito alla fusione con essa, rilasciano il loro contenuto nello spazio extracellulare.

Un ruolo importante nella biogenesi dei MVB e nello smistamento delle proteine endosomiali all'interno degli stessi, è svolto dai complessi proteici ESCRTs (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), mediante un processo ubiquitina-dipendente⁷⁴; gli ESCRTs comprendono una ventina di proteine che si assemblano a formare quattro complessi (ESCRT-0, -I, -II e -III) insieme ad altre componenti proteiche ad esse associate, quali il complesso VPS4 (Vacuolar Protein Sorting 4), VTA1 (Vacuolar Protein Sorting- Associated Protein VTA1 homolog), Alix (ALG-2 Interacting Protein X)⁷⁵.

Dal punto di vista molecolare, la proteina HRS (Hepatocyte growth factor-Regulated tyrosine kinase substrate), facente parte del complesso ESCRT-0, riconosce le proteine monoubiquitinate e le sequestra a livello della membrana endosomiale. HRS recluta inoltre la proteina TSG101 del complesso ESCRT-I, che lega quindi le proteine ubiquitinate e favorisce, insieme al complesso ESCRT-II ed alla proteina Alix, la successiva oligomerizzazione del complesso ESCRT-III, che pare avere un ruolo nella concentrazione delle proteine all'interno dei MVB. ESCRT-III recluta a sua volta l'enzima deubiquitinante Doa4, che rimuove l'ubiquitina dalle proteine prima che queste vengano internalizzate nei MVB. Infine, l'ATPasi Vps4 lega il complesso ESCRT-III disassemblandolo in maniera ATP-dipendente⁷⁶. I complessi proteici ESCRT-I -II e -III, coinvolti nel sorting delle proteine all'interno dei MVB, sono reclutati transientemente sul lato citologico della membrana dell'endosoma. Nonostante alcune proteine associate ai complessi ESCRT (quali Alix e TSG101) siano costitutivamente presenti negli esosomi, nella cellula sono attivi anche meccanismi implicati nella biogenesi degli esosomi ESCRT-indipendenti, come dimostrato dal fatto che il concomitante silenziamento delle subunità ESCRT non abolisce la formazione dei MVB⁷⁶. Uno di questi meccanismi potrebbe coinvolgere i metaboliti della sfingomieline, come la ceramide che è presente, insieme ai suoi derivati, negli esosomi ad alte concentrazioni⁷⁷. Un altro meccanismo di biogenesi ESCRT-indipendente, potrebbe

coinvolgere l'acido fosfatidico (PA), che agirebbe nell'indurre la curvatura interna dei MVB favorendo la formazione delle ILV⁷⁸.

I meccanismi coinvolti nella migrazione dei MVB verso la periferia cellulare e nella loro successiva fusione con la membrana plasmatica, richiedono le componenti proteiche del citoscheletro, le proteine motrici ad esso associate (kinesina e miosina), le piccole GTPasi della famiglia Rab (Rab 27 e Rab 27b) ed il macchinario di fusione rappresentato dai complessi proteici della famiglia SNARE (Soluble NSF Attachment protein REceptor)⁷⁹. Il processo di rilascio degli esosomi può essere costitutivo o inducibile, a seconda della tipologia cellulare e dello stato di attivazione delle cellule secernenti. Ad esempio cambiamenti nella concentrazione del calcio intracellulare possono indurre la secrezione di esosomi da parte di mastociti e la depolarizzazione indotta dagli ioni potassio sembra favorire la fusione dei MVB con la membrana plasmatica in cellule neuronali⁸⁰. Inoltre, anche la proteina p53 ha un ruolo nella regolazione del rilascio di esosomi, contribuendo a supportare il possibile ruolo di queste vescicole nella comunicazione intercellulare, in condizioni di stress⁸¹.

E' stato ormai ampiamente dimostrato che gli esosomi giocano un ruolo nella comunicazione intercellulare e sono associati a numerose funzioni fisiologiche e patologiche. Gli esosomi derivati da cellule tumorali hanno mostrato di promuovere l'angiogenesi, modulare il sistema immunitario e rimodellare il tessuto parenchimale circostante, tutti fattori che supportano la progressione del tumore⁸². In particolare, è stato dimostrato che gli esosomi partecipano alla generazione della nicchia pre-metastatica, in virtù della loro capacità di raggiungere siti distanti grazie al torrente circolatorio. Inoltre, grazie alla loro capacità di mediare la comunicazione cellula-cellula, gli esosomi possono trasferire, da una cellula all'altra, DNA, RNA e proteine causando una modificazione di sintesi proteica ed espressione genica, nella cellula ricevente⁷¹. Inoltre, gli esosomi possono contribuire all'insorgenza di resistenza a terapie antitumorali. Essi, ad esempio, sembrano essere implicati nella resistenza al Trastuzumab in cellule di carcinoma mammario, in seguito al trasferimento di un RNA non codificante, attraverso gli esosomi stessi. Un altro meccanismo con cui queste vescicole impediscono l'azione

terapeutica dei farmaci antitumorali, è attraverso un loro “sequestro” dal citoplasma all’ambiente extracellulare, rendendoli di conseguenza inattivi^{83,84}.

I microRNA

I microRNA (miRNA), osservati per la prima volta in *Caenorhabditis elegans*⁸⁵, sono brevi RNA non codificanti (lunghi circa 22 nucleotidi) evolutivamente conservati e che funzionano da regolatori post-trascrizionali dell’espressione genica. Una volta prodotti, i miRNA si appaiano con RNA messaggeri (mRNA) specifici interferendo con il meccanismo traduzionale, impedendo o alterando la produzione della proteina. Oltre ad agire sulla repressione della traduzione, diversi studi hanno messo in evidenza che i miRNA, legandosi a sequenze bersaglio complementari di mRNA, sono in grado di attivare fattori che determinano la destabilizzazione e successiva degradazione dell’mRNA, con conseguente diminuzione dei livelli di espressione⁸⁶. La biogenesi dei miRNA, nell’uomo, segue un processo in due fasi, una nucleare e una citoplasmatica.

Nel nucleo, i trascritti che codificano i miRNA vengono inizialmente trascritti dalla RNA polimerasi II come miRNA primari (pri-miRNA) e possono avere una lunghezza che supera i 1000 nucleotidi. Si ripiegano generando una struttura a forcina (*stem-loop*) a doppio filamento e posseggono un cappuccio di guanosina in posizione 5’ e una coda poliadenilata in posizione 3’. Questa molecola subisce dei tagli catalizzati dalle endonucleasi Drosha e Dicer, entrambe le quali agiscono all’interno di complessi proteici contenenti domini in grado di legare molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA binding domains -dsRBDs). La prima reazione di taglio avviene nel nucleo ad opera di Drosha, che forma un complesso con la proteina Pasha (DGCR8). Il complesso Drosha/Pasha scinde il pri-miRNA generando una molecola con struttura a forcina di circa 70-120 nucleotidi, il miRNA precursore (pre-miRNA). Il nuovo miRNA viene poi trasportato nel citoplasma grazie all’azione dell’esportina-5 (Exp 5), dove viene ulteriormente processato da Dicer, con formazione di una piccola molecola di RNA duplex con appaiamenti imperfetti di dimensioni variabili tra 21 e 25 nucleotidi, contenente sia

il filamento maturo del miRNA che il suo filamento complementare^{87,88}. Nei mammiferi Dicer interagisce con le proteine Ago1-Ago4, le quali, assemblandosi con il miRNA maturo formano un complesso denominato miRISC (microRNA Induced Silencing Complex), il quale guiderà il miRNA nel riconoscimento del messaggero bersaglio. Le proteine Ago appartengono alla famiglia delle proteine Argonaute e sono dotate di specifici domini che svolgono determinate funzioni: i domini MID e PAZ per l'ancoraggio dell'RNA target al 3' e al 5' e il dominio PIWI per il taglio. Il complesso miRISC è inoltre costituito da diverse proteine appartenenti alla famiglia GW182 che sembrerebbero svolgere un ruolo nella repressione della trascrizione mediata dai miRNA⁸⁹ e come cofattori delle proteine Ago. I due filamenti formati in seguito all'azione di Dicer vengono quindi separati in seguito a diversi fattori, tra cui una stabilità differente da un punto di vista termodinamico a livello dell'estremità 5'. Sebbene il miRNA maturo possa essere localizzato indistintamente nell'uno o nell'altro filamento, esso si origina quasi sempre dal filamento che presenta l'estremità 5' più instabile, che funge quindi da filamento guida, mentre l'altro filamento, noto come filamento passeggero, verrà degradato⁹⁰. Tuttavia, nei rari casi in cui le due estremità 3' e 5' presentano una stabilità paragonabile, ognuno dei due filamenti può avere la stessa probabilità di andare a costituire il miRNA maturo dotato di attività biologica⁹¹. Il filamento guida dirige il complesso verso l'mRNA target in base alla complementarità provocandone la repressione traduzionale. Diversi sono stati i meccanismi proposti sul funzionamento dei miRNA che si traducono nella repressione post-trascrizionale di mRNA target. Questa repressione può essere il risultato di una ridotta efficienza traduzionale o di una reale diminuzione dei livelli di mRNA. A questo livello, è essenziale il grado di complementarità tra il miRNA e le regioni target dell'mRNA: la complementarità tra i due trascritti porta alla degradazione dell'mRNA mentre una minore complementarità conduce ad una inibizione della traduzione. E' stato proposto anche un meccanismo d'azione alternativo in cui il legame con il miRNA porta alla deadenilazione dell'mRNA con conseguente degradazione dello stesso, a causa di una aumentata instabilità dell'mRNA⁹².

I miRNA risultano quindi implicati in diversi processi cellulari quali il controllo del ciclo cellulare, il differenziamento e l'apoptosi. Alterazioni nei livelli di espressione dei miRNA sono state documentate in diversi tipi di cancro, tra cui il carcinoma mammario.

A seconda del tipo di funzione biologica in cui quel determinato miRNA è implicato (determinata dalle proteine che regola) si possono distinguere miRNA oncogeni o miRNA onco-soppressori^{93,94}. I miRNA oncogeni si trovano codificati in regioni del genoma amplificate o sovraespresse del tumore determinando così angiogenesi, proliferazione cellulare ed interferendo con il processo di apoptosi; viceversa i miRNA onco-soppressori si trovano codificati in regioni delete o silenziate del tumore determinando effetti biologici contrapposti ai precedenti.

Alcuni studi hanno dimostrato che i miRNA non sono impacchettati in modo casuale all'interno delle vescicole extracellulari e che alcuni miRNA entrano in maniera preferenziale negli esosomi⁹⁵; inoltre alcuni studi dimostrano che i livelli di espressione dei miRNA esosomiali sono alterati in diverse condizioni patologiche^{67,96}.

Questi studi dimostrano che le cellule d'origine possiedono diversi meccanismi che selezionano e guidano l'ingresso di specifici miRNA nelle vescicole extracellulari:

1. Percorsi che dipendono dalla sfingomielinasi neurale 2 (nSMase2), prima molecola identificata per essere correlata alla secrezione dei miRNA mediante gli esosomi. Gli studi di Kosaka *et al.* suggeriscono che l'iper espressione di nSMase2 aumenti il numero di miRNA esosomiali e, viceversa, l'inibizione della sua espressione ne riduca la quantità.

2. Percorsi dipendenti da hnRNPs (heterogeneous nuclear Ribonucleoproteins). Villarroya-beltri *et al.* hanno dimostrato che hnRNPsB1 sumoilata è in grado di riconoscere il motivo GGAG in posizione 3' sulla sequenza del miRNA e determinare così l'impacchettamento dei miRNA specifici all'interno degli esosomi. Inoltre, altre due proteine della famiglia hnRNPs sono in grado di legare i

miRNA esosomiali, suggerendo che potrebbero essere coinvolte nel sorting dei miRNA.

3. Percorsi dipendenti dalla sequenza al 3'-terminale dei miRNA. La posizione terminale in posizione 3' del miRNA potrebbe contenere una sequenza cruciale nella determinazione dei miRNA che verranno indirizzati all'interno degli esosomi. Gli studi di Koppers-Lalic *et al.* hanno evidenziato che miRNA con l'estremità 3' uridilata vengono principalmente dirottati negli esosomi derivati da cellule B o nelle urine, mentre i miRNA con l'estremità 3' adenilata restano principalmente all'interno di cellule B.

4. Percorsi dipendenti da miRISC, complesso generato dall'interazione tra i miRNA maturi e alcune proteine tra cui Ago-2. Alcuni studi hanno osservato una possibile correlazione tra la proteina Ago-2 e il sorting dei miRNA all'interno degli esosomi.

Scopo della tesi

Le vescicole extracellulari rappresentano un meccanismo adottato dalle cellule per la comunicazione intercellulare e intervengono sia in processi fisiologici che patologici. Esse sono infatti coinvolte nella formazione e nello sviluppo del tumore partecipando ai meccanismi di migrazione, invasione, angiogenesi, ipossia ed evasione dal sistema immunitario. Sfruttando la loro capacità di mediare la comunicazione cellula-cellula e quindi di permettere il trasferimento del fenotipo canceroso, le vescicole extracellulari rappresentano un importante meccanismo biologico che si pone alla base della disseminazione tumorale e della resistenza ai farmaci. Questo meccanismo si esplica attraverso il trasferimento di diverse molecole, tra cui proteine e miRNA specifici che contribuiscono alla crescita e all'invasività tumorale. La comprensione molecolare di questi processi può rappresentare una chiave importante per decifrare i meccanismi di resistenza alla base delle terapie anti ErbB2, di cui l'anticorpo monoclonale Trastuzumab rappresenta il *gold standard*. In particolare, l'obiettivo di questo studio è stato quello di chiarire se il Tz fosse in grado di modificare la genesi e la composizione molecolare delle EVs esercitando quindi un effetto antitumorale non solo sul tumore ma anche a distanza.

Per raggiungere questo obiettivo abbiamo scelto di caratterizzare le vescicole extracellulari (EVs) prodotte da tre linee di carcinoma mammario over-esprimenti il recettore ErbB2, in condizioni di controllo e dopo trattamento con Tz. Nello specifico, abbiamo focalizzato l'attenzione su tre aspetti principali. Il primo riguarda l'analisi strutturale e morfologica delle EVs mediante *imaging* (microscopia elettronica a trasmissione), il secondo aspetto riguarda la loro composizione mediante analisi biochimica e proteomica e il terzo aspetto indagato riguarda i profili di espressione di miRNA.

Il processo di autofagia è un *pathway* degradativo e di riciclo dipendente dai lisosomi le cui funzioni sono alterate in vari tipi di cancro. Studi recenti hanno

rivelato un *crosstalk* molecolare e cellulare tra la biogenesi degli exosomi, che avviene nel *multivescicular body* (MVB) e il processo di autofagia.

Nell'ultima parte di questa tesi abbiamo indagato, mediante tecniche ultrastrutturali e biochimiche, le variazioni del processo autofagico in seguito al trattamento delle cellule con Tz.

Materiali e metodi

Colture cellulari e trattamenti farmacologici

Per tutti gli esperimenti in vitro di biochimica, microscopia a fluorescenza e microscopia elettronica a trasmissione (TEM) sono state utilizzate tre linee di carcinoma mammario positive per il recettore ErbB2 (SKBR-3, BT474 e MDA-MB-361), ottenute dalla Banca Biologica e Cell Factory dell'IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova. Le cellule sono state mantenute in coltura in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), supplementato con 1% di L-glutamina 1% di Penicillina/Streptomicina (Eurocolone S.p.a., Milano, Italia), 10% FBS (Fetal Bovine Serum) per le linee SKBR-3 e BT474 e 20% FBS per la linea MDA-MB-361. Le cellule sono state incubate ad una temperatura di 37°C in un'atmosfera umidificata contenente una concentrazione di CO₂ pari al 5%. Al raggiungimento della confluenza, le cellule sono state lavate con DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) e staccate in Tripsina-EDTA e successivamente piastrate ad una concentrazione appropriata. Il Trastuzumab (Genetech-Roche, South San Francisco, USA) (21 mg/ml) è stato donato dall'UFA (Unità Farmaci Antiblastici di IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova). Tutte le linee cellulari utilizzate per la purificazione delle EVs destinate all'analisi proteomica e al Western Blot sono state seminate in piastre Petri da 100 mm di diametro alla densità di 2.5×10^4 cellule/cm². Mentre le linee cellulari destinate alla purificazione delle EVs per l'analisi dei miRNA e l'analisi morfologica mediante la microscopia elettronica, sono state seminate ad una densità pari a 4.5×10^4 cellule/cm². Dopo 24 ore dalla semina, quando la confluenza cellulare era al 70% circa, è stato aspirato il terreno di coltura, le cellule sono state lavate per tre volte con DPBS 1X sterile, e infine aggiunto terreno con siero privo di EVs (precedentemente sottoposto a ultracentrifugazione a 100.000g over-night a 4°C, usando il rotore SW28 Beckman Coulter). Ove indicato, al terreno è stato aggiunto Tz (o IgG umane come controllo) alla concentrazione di 10 µg/ml. Le cellule sono state incubate a 37°C e in presenza di CO₂ al 5% per 72 ore.

Purificazione delle vescicole extracellulari da terreno di coltura

La purificazione delle EVs da terreno, è stata effettuata seguendo le linee guida riportate da Ciravolo et al⁹⁶ (Fig. 3). Le vescicole extracellulari sono state isolate mediante centrifugazioni sequenziali a partire da piastre che presentavano una confluenza attorno al 95% e dopo 72 ore dal trattamento con l'anticorpo monoclonale Tz. Il terreno di coltura nel quale sono state rilasciate le vescicole è stato recuperato e sottoposto ad una prima centrifugazione a 300 rcf per 10' a 4°C. I sopranatanti così ottenuti sono stati nuovamente centrifugati a 2000 rcf per 30 min a 4°C allo scopo di eliminare detriti ed eventuali cellule in sospensione. Al termine delle centrifugazioni, il sopranatante è stato filtrato (maglie da 0.22 µm) e trasferito in tubi da ultracentrifuga (Beckman) per essere ultracentrifugato mediante dispositivo Optima XPN-100 Ultracentrifuge Beckman Coulter a 100.000 rcf per 2 ore a 4°C (rotore SW28, Beckman Coulter). Conclusa questa fase il sopranatante è stato eliminato e il pellet risospeso in 4.5 ml di PBS 1X filtrato e sottoposto ad una seconda ultracentrifugazione a 100.000 rcf per un'ora e trenta minuti a 4°C (rotore SW55ti). Infine le vescicole extracellulari sono state risospese in DPBS 1X filtrato e fissate in PFA 3.7% in DPBS 1X-2% saccarosio e conservate a 4°C se utilizzate per la microscopia elettronica; in DPBS 1X filtrato e congelate a -80°C se dedicate all'analisi dei miRNA e in TRIS pH7.4 e conservate a -80°C se dedicate alla proteomica.

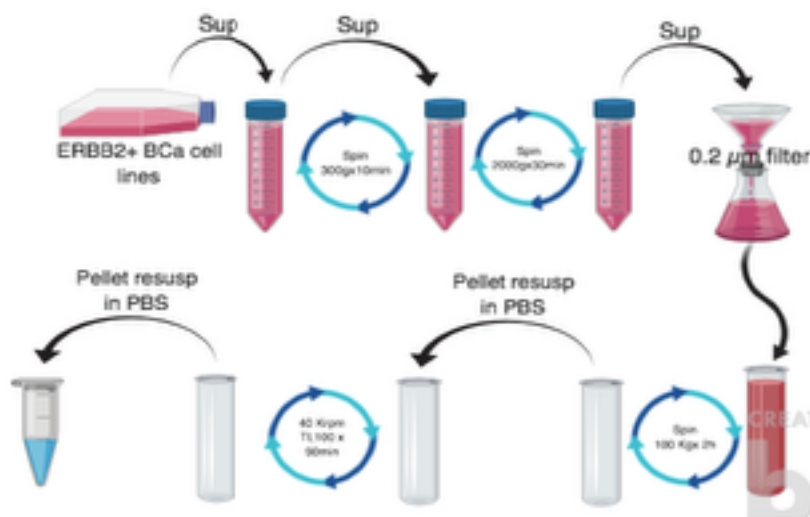


Fig. 3: Rappresentazione schematica del protocollo di estrazione di EVs, basato su centrifugazioni/ultracentrifugazioni seriali, utilizzato in questo studio.

Tecniche di microscopia elettronica a trasmissione

Inclusione di cellule in resina e taglio di sezioni ultrafini

Le cellule sono state seminate in chamber-slides (2 well Permanox Slide-Lab-Tek) nel numero prestabilito e trattate con Tz 10 µg/ml o IgG umane (controllo) per 72 ore. Alla scadenza dei trattamenti, il terreno di coltura è stato aspirato e le cellule sono state lavate in DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline); successivamente sono state fissate in modo da preservarne la struttura durante i successivi passaggi di disidratazione, inclusione, taglio e contrasto. La fissazione proteica è stata effettuata con 2.5% Gluteraldeide ($C_5H_8O_2$) in Sodio Cacodilato 0.1 M pH 7.4 per 10' a temperatura ambiente. Dopo rapido lavaggio in Sodio Cacodilato 0.1 M, le cellule sono state fissate in 1% Tetrossido di Osmio (OsO_4 in Sodio Cacodilato 0.1 M pH 7.4) per 10' a temperatura ambiente, che colora i lipidi delle membrane e permette di aumentare il contrasto delle immagini. Dopo rapido lavaggio in acqua demineralizzata, le cellule sono state incubate con una soluzione 1% Acetato di Uranile in acqua per un'ora (al buio e a temperatura ambiente). Segue la disidratazione del campione tramite alcoli a concentrazione crescente: etanolo al 70% per 4', etanolo al 95% per 4' e infine tre passaggi in etanolo al 100%

da 5' ciascuno. Le cellule sono state successivamente incluse in resina epossidica Epon (EMBed-812 Embedding Kit – Electron Microscopy Sciences) con tre passaggi da 30' - 45' ciascuno, ottenendo uno spessore finale della resina che ricopre le cellule, di 3 mm. Sullo strato di resina sono state capovolte delle Eppendorf da 1 cm riempite di resina in modo da creare una sorta di cilindro che verrà successivamente staccato dalla chamber-slide e inserito nell'ultramicrotomo (questo passaggio permette il sezionamento delle cellule, che rimangono adese alla base del cilindro). Le chamber-slide così ottenute sono state messe in stufa a 60°C per una notte affinché la resina polimerizzi. I campioni così ottenuti sono stati conservati a temperatura ambiente fino al successivo utilizzo.

Dai campioni sono state ottenute sezioni ultrafini dello spessore di 50 nm (ultramicrotomo Leica Ultracut), depositate su retini di rame (3.05 mm di diametro) a maglia esagonale (Agar Scientific) e contrastate con una soluzione di Acetato di Uranile al 5% in etanolo al 25% per 5'. Le sezioni sono state quindi osservate e analizzate al microscopio elettronico a trasmissione (TEM HT7800, HITACHI High Tech). Le immagini sono state acquisite mediante telecamera digitale Megaview 3 e analizzate mediante il software RADIUS, EMSIS, Germany.

Negative staining e immunomarcatura di esosomi

Per poter osservare le vescicole extracellulari al microscopio elettronico a trasmissione e svolgere un'analisi basata su caratteristiche morfologiche, le vescicole purificate e provenienti dal terreno di coltura, sono state depositate su retini di rame (3.05 mm di diametro) a maglia esagonale (200 mesh Agar Scientific) precedentemente rivestiti con *Formwar*. Una volta depositate su retino, le vescicole vengono marcate con anticorpi specifici al fine di poter valutare l'espressione di determinate molecole. In particolare, sono stati depositati 5µl di soluzione concentrata di EVs su retino di rame trattato e incubati per 20' a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio in PBS per 5', le EVs sono state fissate in Glutaraldeide 1% per 5'. Sono stati poi eseguiti un secondo lavaggio in PBS e due passaggi in Glicina 0.2% in PBS per 5' ciascuno allo scopo di saturare i siti reattivi aspecifici. Si

è proceduto con un passaggio in BSA 1% in PBS per 5' e i retini sono stati incubati con un anticorpo primario diluito in BSA 1% in PBS per 30' a temperatura ambiente. Trascorso il tempo di incubazione nell'anticorpo, sono stati eseguiti quattro lavaggi in BSA 1% da 2' ciascuno e proceduto all'incubazione con la proteina A oro (PAG) per 20'. La PAG riconosce tutti gli anticorpi primari tranne quelli prodotti in topo, per cui quando è stato utilizzato un anticorpo primario di topo si è reso necessario l'utilizzo di un anticorpo rabbit anti-mouse che si coniuga all'anticorpo primario che ha permesso il riconoscimento delle due componenti. Dopo l'incubazione con la PAG, si sono ripetuti i quattro lavaggi in BSA 1% da 2' ciascuno ed effettuato un ulteriore passaggio in Glutaraldeide 1% per 5' a cui è seguito un lavaggio in PBS per 5' e due lavaggi in acqua distillata da 5' ciascuno. I campioni, a questo punto, sono stati contrastati con Acetato di Uranile 2% in acido Ossalico 0.15 M per 5' a temperatura ambiente. La procedura è stata terminata con un passaggio in Metilcellulosa 1.8% in Acetato di Uranile 4% per 5' a temperatura ambiente, che permette un ulteriore contrasto e la formazione di una patina protettiva sul retino. I campioni così depositati, sono stati conservati e successivamente osservati con il microscopio elettronico a trasmissione Hitachi 7800 120 KV.

Western Blot

Terminato il periodo di incubazione con i trattamenti, le cellule sono state lisate meccanicamente in piastra mediante l'utilizzo di uno *scraper* e tramite 500 µl di Buffer di Lisi (Hepes pH 7.4 20mM, NaCl 150mM, glicerolo 10%, Triton X-100 1%) addizionato con inibitore di fosfatasi e inibitore di proteasi e i lisati così ottenuti sono stati raccolti in tubi *ependorf* e conservati in ghiaccio per 40' con agitazione su vortex ogni 10'. Infine i lisati cellulari sono stati caricati su colonnine *qiasredder* (Qiagen) e centrifugati per 5' a 13000 rpm a 4°C ottenendo così la separazione tra la porzione di nostro interesse contenente una miscela di proteine cellulari (sopranatante) dal *pellet* contenente invece il DNA e i residui cellulari insolubili. La componente proteica così ottenuta è stata trasferita in nuovi tubi e congelata a -20°C fino al successivo utilizzo. Al momento dell'utilizzo dei

campioni, questi ultimi sono stati sottoposti a dosaggio proteico utilizzando il kit Pierce BCA Proteine Assay, Thermo Scientific e lettura ad una lunghezza d'onda di 562 nm. Le concentrazioni proteiche dei campioni sono state determinate mediante interpolazione di una retta di taratura costruita a partire da campioni a concentrazione proteica nota (BSA). A questo punto i lisati cellulari sono stati preparati per essere sottoposti a corsa elettroforetica unendo a questa soluzione di proteine, Sample Buffer 4% (Tris pH 6.8 372mM, SDS 12%, β mercaptoetanololo 30%, glicerolo 60%, blu di bromofenolo 0.006%- Invitrogen), Reducing Buffer 10% (ditiotreitolo 500 nM (DTT)- Invitrogen). Le proteine sono state separate in base al loro peso molecolare utilizzando MES SDS Running Buffer (MES 50mM, Tris Base 50mM, SDS 0.1%, EDTA 1mM, pH 7.3- Invitrogen) e fatte migrare su un gel di poliacrilammide in SDS (SDS-PAGE) (NW04120box, BOLT Bis-Tris plus 4-12%, Invitrogen). I campioni e i *markers* a peso molecolare noto (SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard- Thermofischer Scientific; Prestained Molecular Weight Marker- Sigma-Aldrich) sono stati caricati su gel e sottoposti ad elettroforesi ad un voltaggio di 160V finché si è avuta la completa separazione dei pesi molecolari. Le proteine separate sono state trasferite dal gel ad una membrana di nylon (Immobilon P, Millipore) usando un tampone di trasferimento (glicina 192 mM, Tris 0.0250 M, metanolo 20%). L'efficienza del trasferimento è stata valutata attraverso incubazione della membrana con Rosso Ponceau per 2-3'; la membrana è stata poi saturata mediante un'incubazione di 30' in BSA al 5% in TBST (Tris-buffered saline e Tween). Gli anticorpi primari utilizzati sono stati incubati *overnight* a 4°C e mantenuti in agitazione costante; successivamente è stato aggiunto l'anticorpo secondario coniugato con HRP (horseradish peroxidase). Il rilevamento delle proteine è stato fatto tramite reazione con il substrato chemiluminescente Clarity Western ECL Substrate (BioRad). Le immagini vengono acquisite con il software UVITEC-Cambridge.

Per gli esperimenti di Western Blot sono stati impiegati i seguenti anticorpi:

- Anti-CD63, rabbit polyclonal antibody (sc-15363, Santa Cruz)
- Anti-CD9, rabbit polyclonal antibody (PA5-85955, Invitrogen)
- Anti-ALIX, mouse monoclonal antibody (sc-271975, Santa Cruz)
- Anti-HSP90, mouse monoclonal antibody (sc-13119, Santa Cruz)
- Anti-ErbB2 (Ab20), mouse monoclonal antibody contro il dominio extracellulare di ErbB2 (120911C, Thermo Scientific)
- Anti-pErbB2 (Tyr1248), rabbit polyclonal antibody (2247, Cell Signaling)
- Anti-GAPDH, rabbit polyclonal antibody (14C10, Cell Signaling)
- Anti-vinculina, mouse monoclonal antibody (V9131, Sigma-Aldrich)
- Anti-LC3, rabbit polyclonal antibody (100-2220, Novus Biologicals)

Analisi morfologica mitocondriale

Le cellule sono state coltivate in condizioni di controllo (IgG) o in presenza di Tz per 72 ore e successivamente sono state marcate con MitoTracker Red (ThermoFisher Scientific) seguendo le istruzioni del produttore. Le cellule sono state fissate e le immagini fluorescenti sono state acquisite utilizzando il microscopio Axio Imager A2M (Carl Zeiss, Jena, Germania). La dimensione e l'area mitocondriale sono state misurate utilizzando lo strumento di analisi degli oggetti Huygens Professional versione X11 (Scientific Volume Imaging, Paesi Bassi).

Spettrometria di massa e analisi dei dati

La composizione proteica delle EVs purificate dalle tre linee di carcinoma mammario ErbB2+ è stata determinata mediante spettrometria di massa (MS).

I campioni sono stati elaborati applicando il metodo in-StageTip (iST) con due dischi di estrazione SDB-RPS (resina stirene-divinilbenzene-solfonato a fase inversa). I pellet contenenti le vescicole extracellulari sono stati risospesi in una soluzione contenente 10 mM Tris (2-carbossietil)fosfina, 40 mM chloroacetamide,

100 mM Tris (pH 8,5) e 2% desossicolato di sodio. La lisi, la riduzione e l'alchilazione dei campioni sono state effettuate in un unico passaggio e poi caricate nello Stage Tip. In seguito i campioni sono stati diluiti con un tampone contenente 25 mM Tris (pH 8.5) e 1 µg di tripsina. Dopo la fase di acidificazione con acido trifluoroacetico (TFA) all'1%, i campioni sono stati lavati per tre volte con TFA allo 0.2%. Le proteine sono state diluite in 60 µl di idrossido di ammonio 5% contenente 80% di acetonitrile. I peptidi dissalati sono stati concentrati mediante essiccazione in un vuoto veloce e risospesi in acetonitrile 2% contenente acido formico (FA) allo 0.2% e successivamente separati su colonna EASY-Spray HPLC (diametro interno 75-µm × 50 cm; 2 µm/100 Å C18) con dispositivo Ultimate 3000 RSLC nano device (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) con un sistema tampone binario comprendente tampone A (0,1% FA) e tampone B (80% acetonitrile, 5% dimetilsolfossido, 0,1% FA). Il programma comprende un gradiente di 70 minuti (2-45% tampone B) ad una velocità di flusso di 250 µl/min ed il mantenimento di temperatura della colonna a 60°C. Il sistema cromatografico è stato collegato allo spettrometro di massa Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) acquisendo dati in modalità CHOPIN (CHarge Ordered Parallel Ion aNalysis). I precursori sono stati ionizzati utilizzando una sorgente EASY-spray mantenuta a +2.2 kV e la temperatura del capillare iICNet è stata mantenuta a 300°C.

Estrazione RNA e RT-PCR

Le frazioni totali di RNA e i miRNA sono stati estratti dalle vescicole extracellulari delle tre linee cellulari di carcinoma mammario utilizzando il kit miRNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Germania) seguendo il protocollo del produttore e risospese in un volume finale di 30µl di acqua priva di RNase. La concentrazione e la purezza dei campioni di RNA è stata determinata spettroscopicamente usando Nanodrop 1000, Thermo Scientific.

Una quantità pari a 30 ng della frazione di miRNA di ciascun campione è stata sottoposta a retrotrascrizione in un volume di 10 µl finali utilizzando il kit

miRCURY LNA SYBR Green (Qiagen)/ MiScript II RT kit (Qiagen) seguendo le istruzioni del produttore. Per controllare l'efficienza della retrotrascrizione (RT) sono stati aggiunti alla soluzione i seguenti *spike-in*: 2-4-5 e 6 (substrati di controllo di trascrizione). I livelli di espressione dei miRNA sono stati valutati utilizzando specifici *primer*. Sette miRNA sono stati selezionati in base alla loro espressione in cellule di carcinoma mammario ErbB2+ e valutati mediante qPCR: miR7-5p, miR613, miR489-3p, miR152-3p, miR130a-3p, miR27a-3p e miR181a-5p.

L' U6 *spliceosomal* RNA è stato utilizzato per normalizzare ciascun campione per l'analisi dei dati. L'amplificazione mediante PCR è stata rilevata dal livello di fluorescenza emesso da SYBR Green, intercalante del DNA a doppio filamento. Il metodo ΔC_t è stato utilizzato per l'analisi dell'espressione dei miRNA. Innanzitutto, è stato determinato il numero di cicli al quale ha avuto inizio la fase di amplificazione esponenziale dell'amplicone corrispondente ad un determinato RNA in ciascun campione. Questo numero equivale al ciclo in cui il valore di fluorescenza dell'amplicone supera il valore soglia di *background* (C_t). Successivamente, il valore ΔC_t è stato calcolato per mostrare la differenza tra il valore C_t dei miRNA analizzati e il valore C_t di U6: $\Delta C_t = C_t (\text{U6 RNA}) - C_t (\text{miRNA})$.

Risultati

Analisi dell'espressione di ErbB2 nei modelli sperimentali adottati nello studio

Per condurre lo studio sono stati scelti dei modelli sperimentali in vitro di carcinoma mammario. Questo al fine di evitare la complessità di sistemi in vivo e per avere un maggior controllo delle condizioni sperimentali. Al tempo stesso, con l'intento di raggiungere risultati il più possibile generalizzabili ai diversi tipi di carcinomi mammari sovraesprimenti ErbB2, abbiamo scelto di utilizzare le seguenti linee cellulari: SKBR-3 sovraesprimente HER2 e proveniente da metastasi pleurica, BT474 esprime HER2, recettore per estrogeni, e recettore per progesterone derivata da carcinoma intraduttale e la linea MDA-MB-361, anch'essa esprime HER2, recettore per estrogeni, e recettore per progesterone ma proveniente da metastasi pleurica. L'espressione del recettore ErbB2 in queste linee è stata verificata mediante immunoblot (Fig. 4).

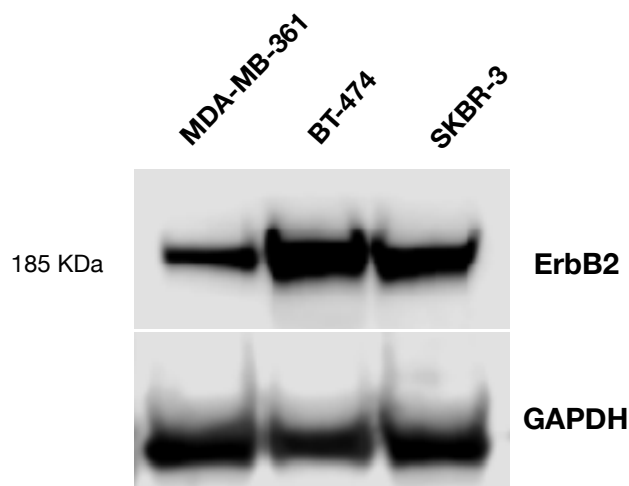


Fig. 4: Analisi dell'espressione del recettore ErbB2 nelle tre linee di carcinoma mammario utilizzate nel nostro modello sperimentale: MDA-MB-361, BT-474 e SKBR-3 mediante Western Blot. Per ogni linea sono stati analizzati 30 μ g di proteine da lisati cellulari totali. Il segnale è stato normalizzato con GAPDH.

Identificazione ultrastrutturale degli organelli coinvolti nel rilascio delle EVs

Al fine di identificare, a livello ultrastrutturale, gli organelli coinvolti nel rilascio delle EVs (multivesicular body, MVBs) da parte di cellule di carcinoma mammario, è stata usata come tracciante la BSA-gold 5 nm (BSA coniugata con particelle di oro di 5 nm del diametro). Le cellule delle tre linee sono state seminate in chamber-slide alla concentrazione di 400000 cellule in 1.5 ml di terreno di coltura e dopo 24 ore sono state trattate con 10 µg/ml Trastuzumab o di IgG umane (come controllo) per 72 ore. Alla scadenza dei trattamenti, le cellule sono state incubate per un'ora a 37°C con BSA-gold (alla concentrazione di 5 OD) e successivamente processate tramite inclusione in resina epossidica Epon e tagliate in sezioni ultrafini di 50 nm al fine di osservarle e analizzarle tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Nel pannello (Fig. 5) sono mostrate immagini dei MVBs, organelli elettrondensi a singola membrana contenenti al loro interno vescicole intraluminali (ILVs) (generalmente da 5 a 10) che verranno poi secrete nell'ambiente extracellulare, in seguito alla fusione del MVBs con la membrana plasmatica, come EVs. Il MVB, se non destinato alla secrezione di EVs, può avere altri due destini: fondersi con un lisosoma o fondersi con un autofagosoma creando un organello ibrido chiamato anfisoma. Dall'analisi ultrastrutturale è emerso che i MVBs risultano eterogenei nella forma, nella dimensione che è compresa tra i 300 e i 600 nm e nel numero di ILVs che possono contenere (>7 vescicole per MVB).

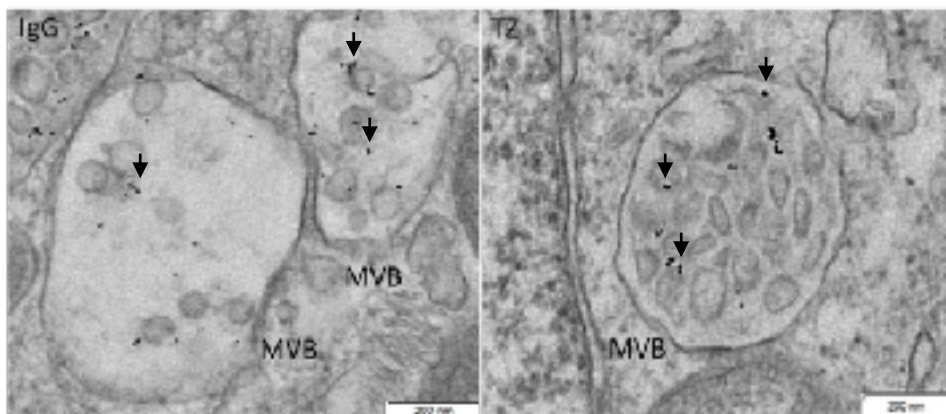


Fig. 5: MVBs in cellule SKBR-3, identificati mediante l'internalizzazione di BSA-gold (indicata con frecce) per 1 ora a 37°C usata come tracciante endocitico e osservati al TEM.

Tz inibisce il processo autofagico e determina un accumulo dei MVBs in presenza di Bafilomicina

Considerato che il MVB può rilasciare direttamente EVs fondendosi con la membrana plasmatica, oppure può seguire il destino degradativo fondendosi con il lisosoma o con l'autofagosoma, è stato eseguito il saggio biochimico di “flusso autofagico” al fine di indagare se il Tz ha un effetto sull'autofagia. In particolare ci siamo avvalsi della Bafilomicina A1 (Baf), sostanza che ha come bersaglio la pompa protonica presente sulla membrana dei lisosomi (vacuolar H⁺-ATPase), per impedire l'acidificazione del lume lisosomiale e la fusione dell'autofagosoma con il lisosoma, e bloccare il flusso autofagico allo stadio più tardivo. Questa inibizione si rivela con un accumulo della proteina LC3I/II che identifica gli autofagosomi. Abbiamo valutato quindi l'effetto del Tz sull'espressione della proteina LC3I/II in presenza o meno di Bafilomicina A1 (Baf) dopo 72h di trattamento. Come riportato in Fig. 6, il Tz induce una riduzione dell'espressione della proteina LC3I/II in presenza di Tz (C vs Tz) e, in presenza di Tz+Baf (Ba vs Ba+Tz), indicando quindi un'inibizione del processo autofagico nella sua fase iniziale.

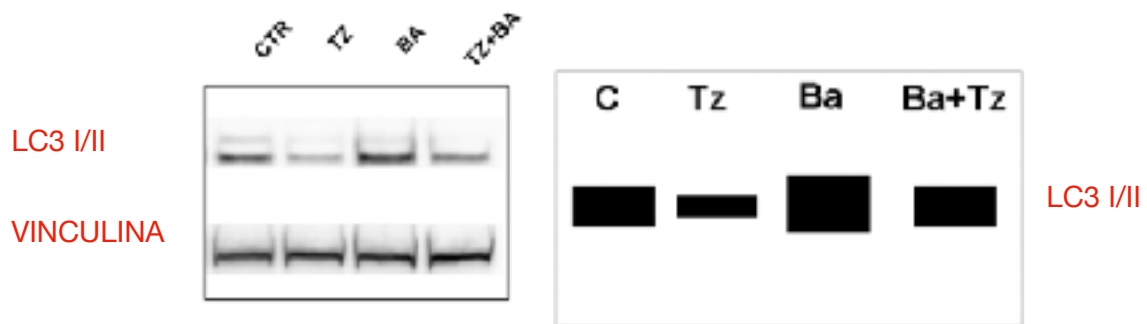


Fig. 6: Analisi dell'espressione di LC3I/II, dopo trattamento con Tz, in cellule SKBR-3 mediante Western Blot (pannello di sinistra); sono stati analizzati 30 μg di proteine da lisati totali. Il segnale è stato normalizzato con la vinculina. A destra è mostrata una rappresentazione schematica del rapporto LC3I/LC3II ottenuto dal blot a sinistra.

Allo scopo di verificare se ci fosse qualche alterazione indotta dal Tz anche a livello ultrastrutturale e in particolare sui MVBs e sui lisosomi, sono stati condotti anche esperimenti di microscopia elettronica, sulle tre linee cellulari. Le cellule sono state seminate in *chamber-slide* (400000 cellule/1.5 ml di terreno di coltura) e trattate con IgG umane o Tz 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ per 72h. Alla scadenza del trattamento è stata aggiunta Baf per 2 h alla concentrazione 200 nM (per valutarne l'efficacia). I campioni sono stati inclusi in resina epossidica e tagliati in sezioni ultrafini per poterli osservare al TEM. Come mostrato in Fig. 7, la Baf determina un aumento delle dimensioni dei lisosomi e del materiale non degradato al loro interno con un aumento dimensionale di circa 1.5 μm .

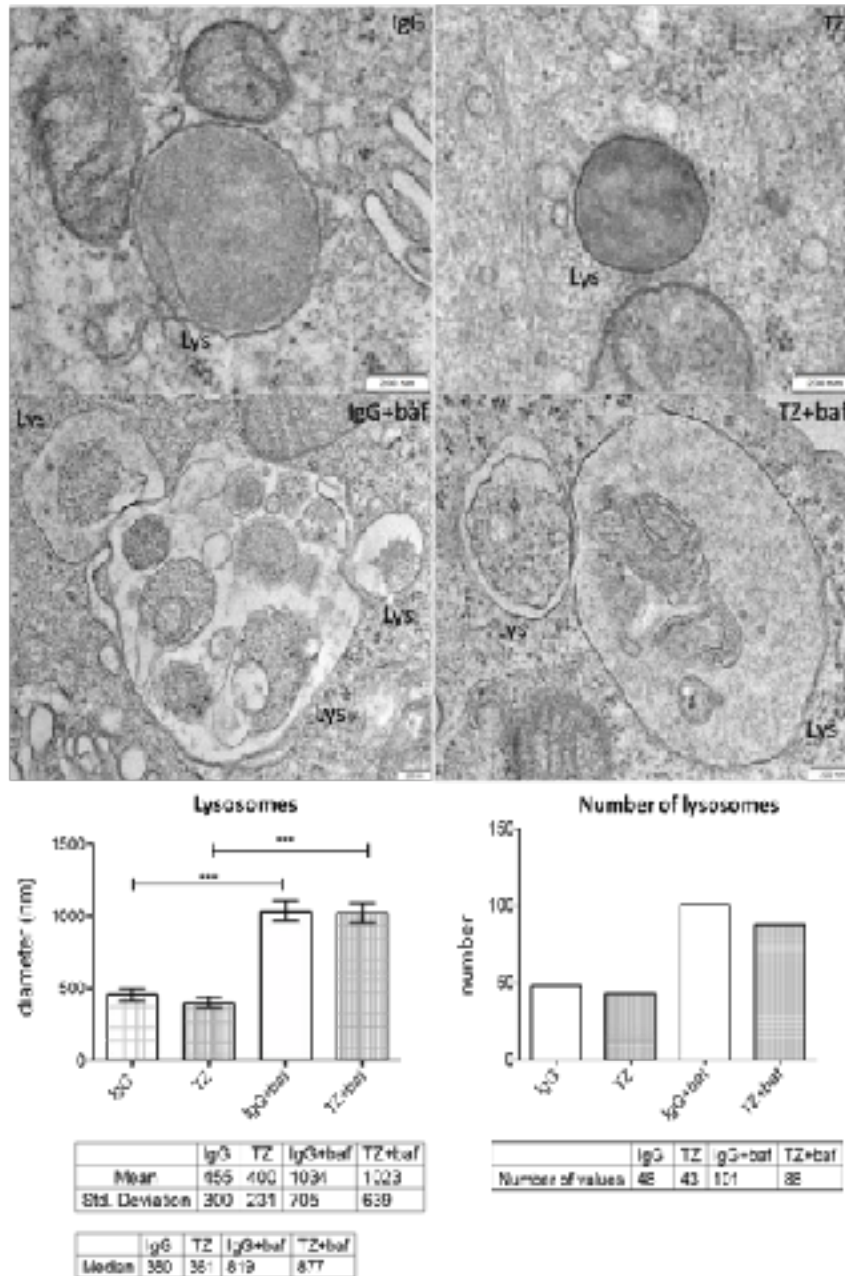


Fig. 7: Analisi al TEM della variazione dimensionale e numerica dei lisosomi in cellule SKBR-3 di controllo o trattate Tz in presenza o meno di Baf

E' stato inoltre osservato che il Tz non determina una riduzione significativa del numero di lisosomi e della loro dimensione, nonostante l'effetto inibitorio sul processo autofagico, dimostrato dalla riduzione di LC3I/II.

E' stata infine valutata, nelle stesse condizioni precedenti, la variazione del numero e delle dimensioni dei MVBs ed è emerso che i trattamenti con Tz e Tz+Baf non inducono variazioni significative nella dimensione dei MVBs

mentre il doppio trattamento Tz+Baf mostra un *trend* di aumento del numero (Fig. 8). Saranno necessarie indagini più approfondite ed un conteggio basato su più immagini per poter stabilire se il doppio trattamento Tz+Baf possa fornire un dato statisticamente significativo sull'aumento del numero di MVBs.

In conclusione, la Baf determina un aumento delle dimensioni dei lisosomi mentre non ha effetto sul numero; il doppio trattamento Tz+Baf induce invece un accumulo del numero dei MVBs suggerendo un blocco nella loro maturazione.

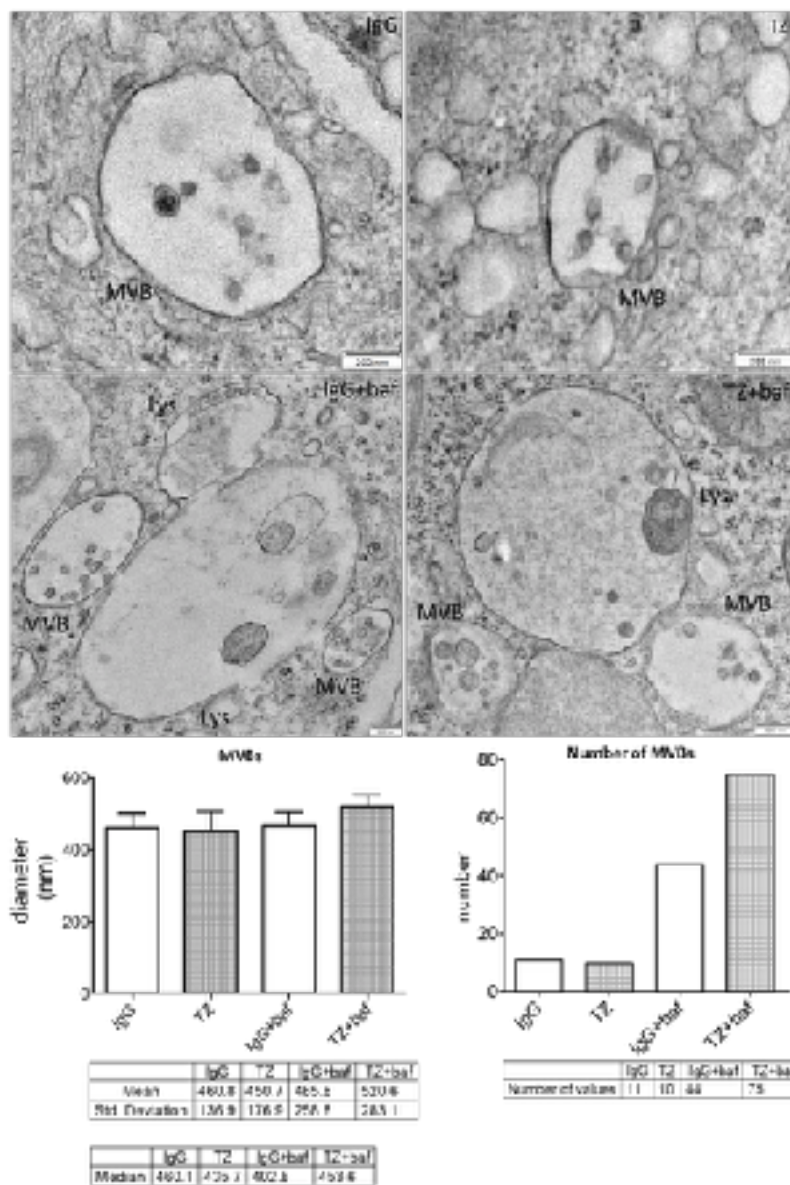


Fig. 8: Analisi al TEM della variazione dimensionale e numerica dei lisosomi in cellule SKBR-3 di controllo o trattate Tz in presenza o meno di Baf.

Poiché il MVBs può essere secreto e rilasciare nell'ambiente extracellulare le vescicole intraluminali, è stata effettuata un'analisi ultrastrutturale per comprendere la loro localizzazione intracellulare e avere informazioni sulla loro funzione. E' stato osservato che i MVBs, in seguito al trattamento con Tz e al doppio trattamento Tz+Baf hanno una posizione prevalentemente perinucleare (Fig. 9).

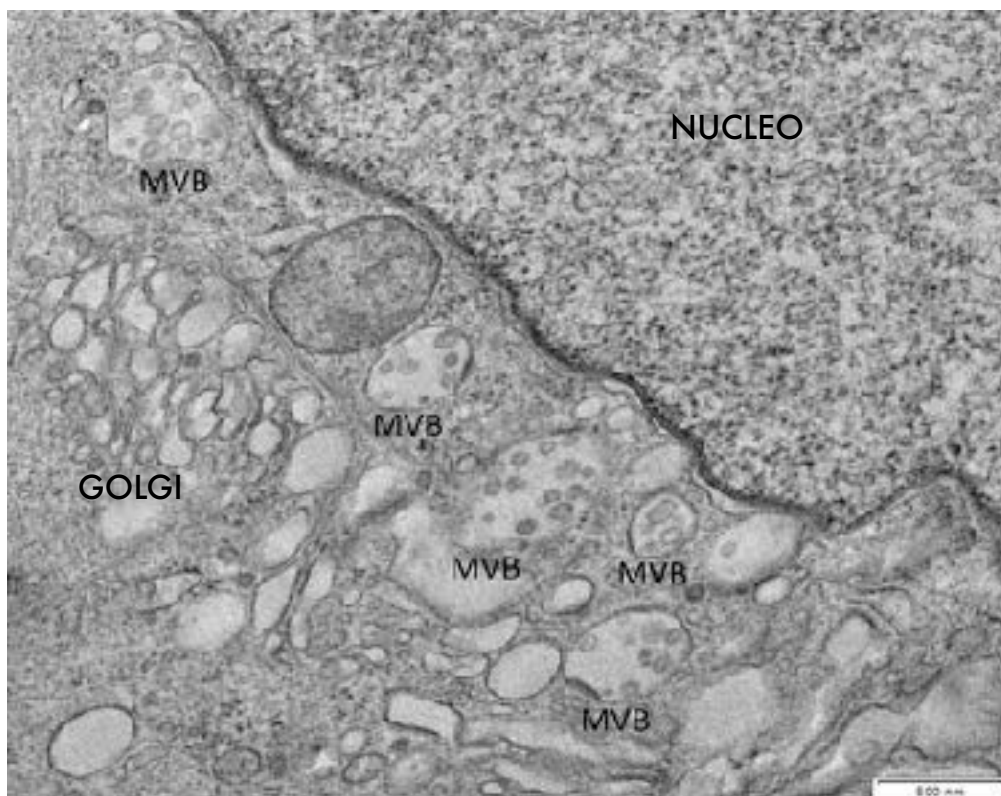


Fig. 9: I MVBs sono localizzati principalmente vicino al nucleo e all'apparato del Golgi nelle cellule SKBR3.

Caratterizzazione ultrastrutturale delle vescicole extracellulari (EVs)

Con l'obiettivo di effettuare un'analisi morfologica delle EVs rilasciate dalle linee cellulari prese in esame ed escludere la presenza di contaminazioni da altre particelle e frammenti cellulari, le vescicole sono state contrastate (con Acetato di Uranile 2% in acido Ossalico 0.15 M) e infine osservate al TEM. Dall'analisi ultrastrutturale ne deriva che le EVs ottenute dalla linea cellulare ErbB2+ SKBR-3 sono costituite da una popolazione eterogenea composta da vescicole differenti per forma e per dimensione. In particolare, sono state individuate tre classi di EVs,

come è riportato in Fig. 10. Una prima classe (denominata tipo A) costituita da vescicole con un diametro molto eterogeneo compreso tra 30 e 300 nm e un aspetto definito a coppa, che rappresenta la classe più numerosa; una seconda categoria è composta da vescicole di dimensioni comprese tra i 30 e i 200 nm di diametro e caratterizzata da un anello chiaro alla periferia della vescicola e la porzione interna che appare di colore molto scuro al TEM (tipo B) e infine una terza sottopopolazione costituita da EVs con un diametro più omogeneo, compreso tra i 30 e gli 80 nm, che all'analisi al TEM appaiono di un grigio uniforme (tipo C).

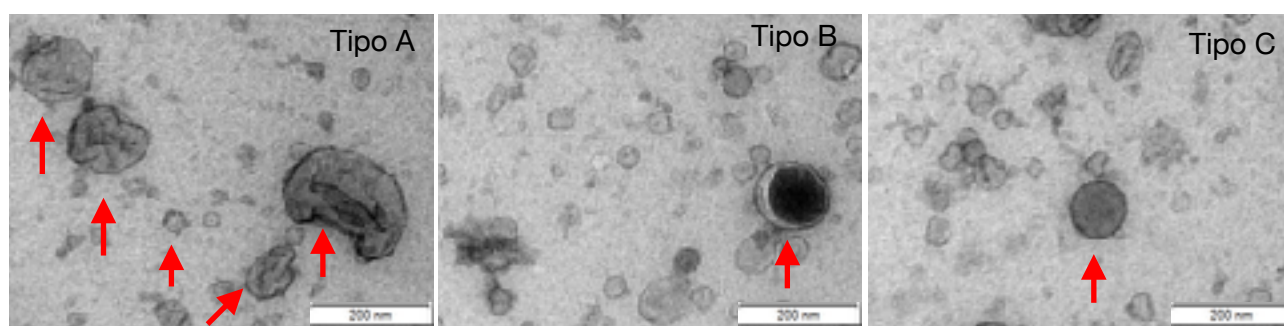


Fig. 10: Le frecce indicano le tre tipologie di EVs (tipo A, B e C) rilasciate dalle cellule SKBR-3, analizzate al TEM. La barra di misura si riferisce ad una lunghezza nota di 200 nm.

Tre linee di carcinoma mammario ErbB2+ producono EVs positive per il recettore ErbB2 e per i marcatori specifici di EVs

Le EVs sono secrete fisiologicamente nei liquidi corporei, ma in condizioni patologiche si possono osservare cambiamenti significativi del loro numero, tipologia e contenuto e diventare in questo modo dei biomarcatori di malattia. Nei modelli sperimentali in vitro, le cellule rilasciano EVs nel terreno di coltura, da dove è possibile isolarle attraverso diverse centrifugazioni e ultracentrifugazioni (vedi materiali e metodi). Il contenuto proteico delle EVs è caratterizzato da proteine essenziali per la biogenesi, struttura e veicolo delle vescicole stesse e da proteine che riflettono la funzione biologica della cellula di origine. L'insieme delle proteine necessarie a svolgere le sopracitate funzioni, costituisce i tipici marcatori utili per l'identificazione e la purificazione delle EVs. Al fine di verificare se le linee cellulari utilizzate nel nostro modello sperimentale producono e rilasciano

EVs positive per i classici marcatori di vescicole extracellulari, il terreno di coltura delle cellule è stato recuperato e sottoposto a ultracentrifugazioni seriali al termine delle quali si ottiene un pellet di EVs. Per ciascuna linea cellulare sono stati effettuati tre replicati biologici indipendenti.

Per il saggio sono stati utilizzati 30 µg di proteine ottenute da EVs lisate. Sono stati testati marcatori comunemente utilizzati nell'identificazione delle vescicole extracellulari e, come è mostrato in Fig. 11, dall'immunoblot risulta che le EVs isolate dalle 3 linee cellulari di carcinoma mammario sono positive per il recettore ErbB2 ed esprimono classici marcatori di vescicole come le tetraspanine CD9 e CD63, Heat Shock Protein 90 e Alix, proteina correlata con ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport). E' interessante notare come l'unico marcatore che appare modulato dal Tz è l'isoforma di peso molecolare di 50 KDa della tetraspanina CD63, che appare espressa solo nei campioni trattati con Tz; risultando invece assente nei controlli. Da notare è che le altre numerose isoforme di glicosilazione di CD63 non appaiono significativamente regolate dal Tz (dato non mostrato).

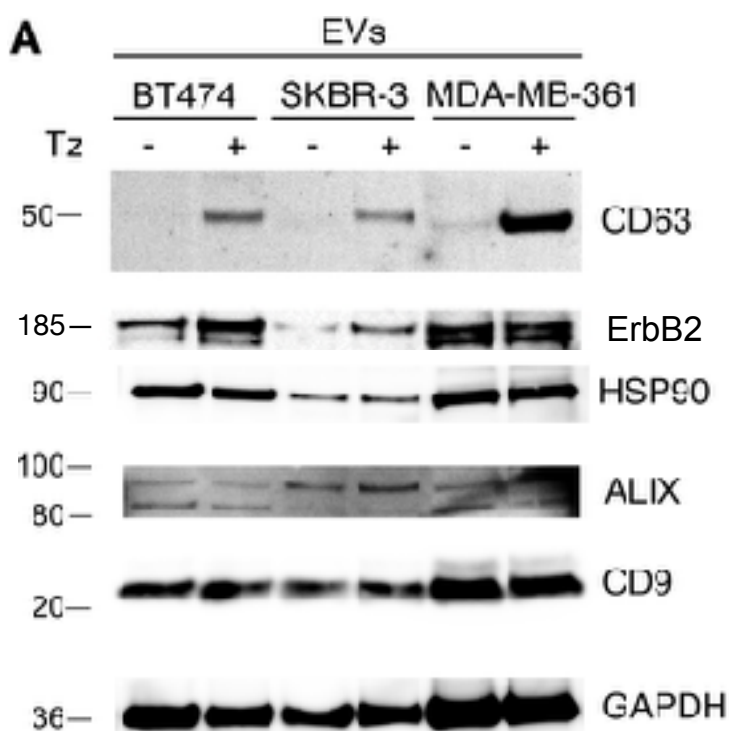


Fig. 11: Analisi mediante Western Blot dell'espressione di proteine associate ai classici marcatori di EVs in presenza o in attesa di trattamento con Tz. Per il saggio sono stati analizzati 30 µg di proteine da lisati totali. Il segnale è stato normalizzato con GAPDH.

Il recettore ErbB2 si localizza su EVs di grandi dimensioni e la sua espressione diminuisce in seguito al trattamento con Tz

Per valutare se tutte le EVs prodotte da cellule esprimenti ErbB2, o solo una sottopopolazione di esse, esprimono questo recettore, è stata effettuata una immunomarcatura dei campioni con l'anticorpo 9G6 (che riconosce la porzione N-terminale di ErbB2). La marcatura è stata rilevata con particelle di oro (Protein A gold) del diametro di 10 nm, che riconoscono l'anticorpo anti-ErbB2. Dalle analisi effettuate tramite microscopia elettronica e riportate in Fig. 12, è emerso che le EVs positive per ErbB2 corrispondono a quelle identificate come "tipo A". In particolare, è possibile suddividere la categoria A, in base alla marcatura per ErbB2, in due ulteriori sottocategorie: una prima categoria costituita da vescicole extracellulari positive per il recettore ErbB2, la maggior parte delle quali ha un diametro compreso tra i 50 e i 200 nm e una seconda categoria, di dimensioni minori, comprese tra i 30 e gli 80 nm e negative per ErbB2. Le EVs appartenenti al sottotipo B presentano raramente la marcatura per ErbB2, mentre questa risulta totalmente assente sulle EVs di tipo C (dato non mostrato).

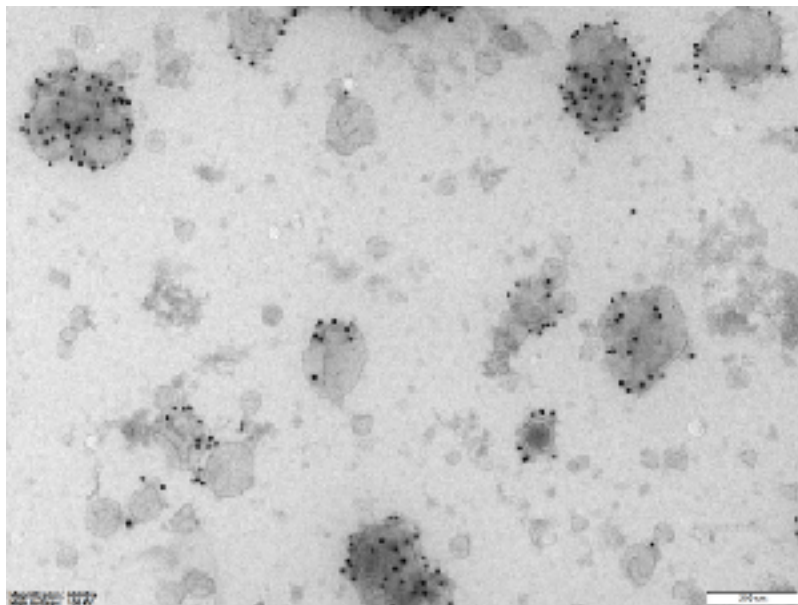


Fig. 12: Le EVs prodotte da cellule SKBR3 positive alla marcatura con ErbB2 (9G6) hanno dimensioni maggiori rispetto a quelle non marcate.

Come è riportato in Fig. 13, le dimensioni delle EVs appartenenti alle diverse categorie identificate, non variano in maniera significativa tra la condizione di controllo e quella trattata. Tuttavia, tra le EVs di categoria A ottenute dai campioni di controllo e quelle ottenute dai campioni trattati con Tz della stessa categoria è possibile notare una diminuzione significativa del numero totale di vescicole (**** $p < 0.0001$) (Fig. 14). Questo dato indica che Tz riduce il rilascio di vescicole di categoria A, corrispondenti alle EVs ERBB2+.

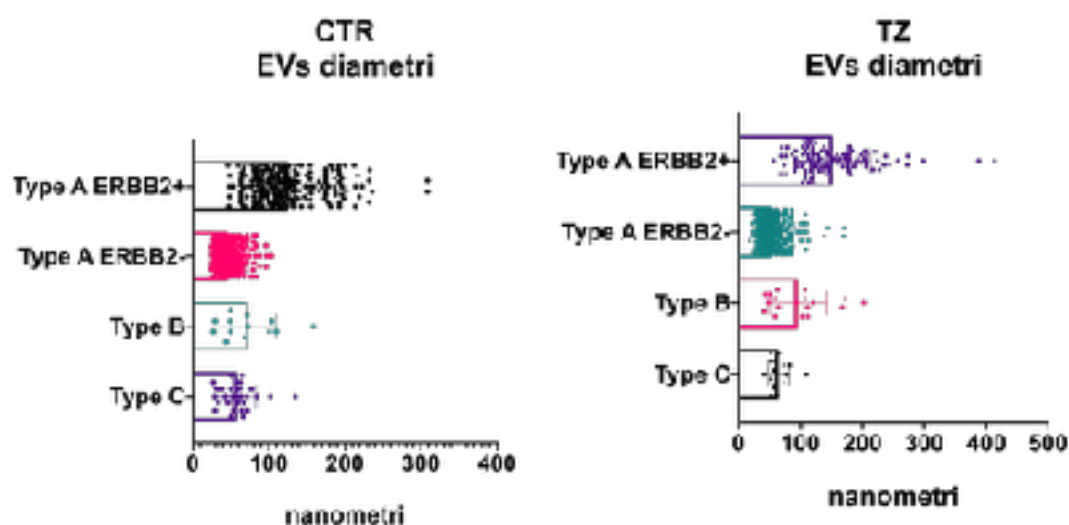


Fig. 13: Analisi dimensionale delle EVs in cellule SKBR-3 di controllo e trattate con Tz.

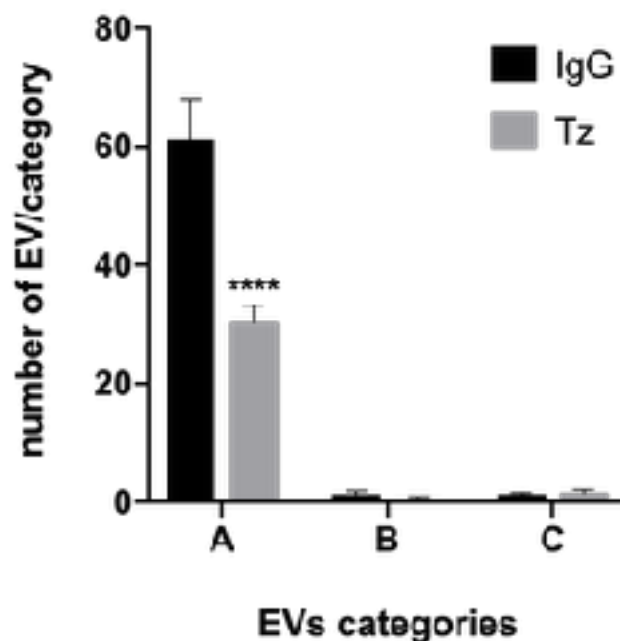


Fig. 14: Analisi numerica delle EVs in cellule SKBR-3 di controllo e trattate con Tz

E' stato inoltre valutato se il trattamento delle cellule con Tz determini una modificazione della quantità di recettore ErbB2 espressa nelle EVs da esse rilasciate, effettuando un conteggio della quantità di proteina A oro 10 nm legata all'anticorpo anti-ErbB2 all'interno di ogni vescicola. Come riportato in Fig. 15, è risultato che ErbB2 immunomarcato con l'anticorpo 9G6 (anti-ErbB2 N-terminale) e visualizzato con PA gold 10 nm, diminuisce in maniera statisticamente significativa (Fig. 16) in seguito al trattamento con Tz, ad indicare una riduzione del trasferimento del recettore dalle cellule alle EVs e da queste a possibili cellule bersaglio. Questo dato è in disaccordo con quanto ottenuto dall'analisi di ErbB2 tramite Western Blot (Fig. 11), in cui si nota un lieve incremento di ErbB2 sui lisati totali in seguito a trattamento con Tz.

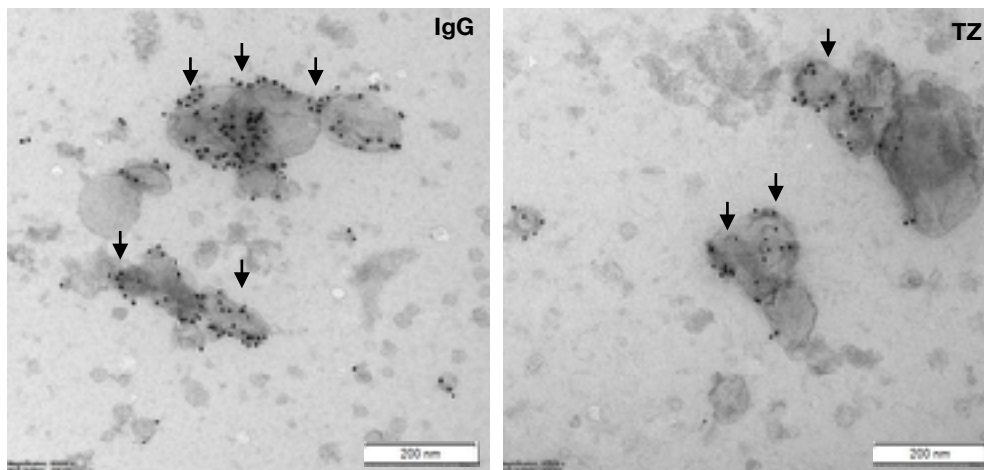


Fig. 15: Analisi al TEM della marcatura per ErbB2 (frece) su EVs rilasciate dalle cellule SKBR-3 in condizioni di controllo e trattate con Tz.

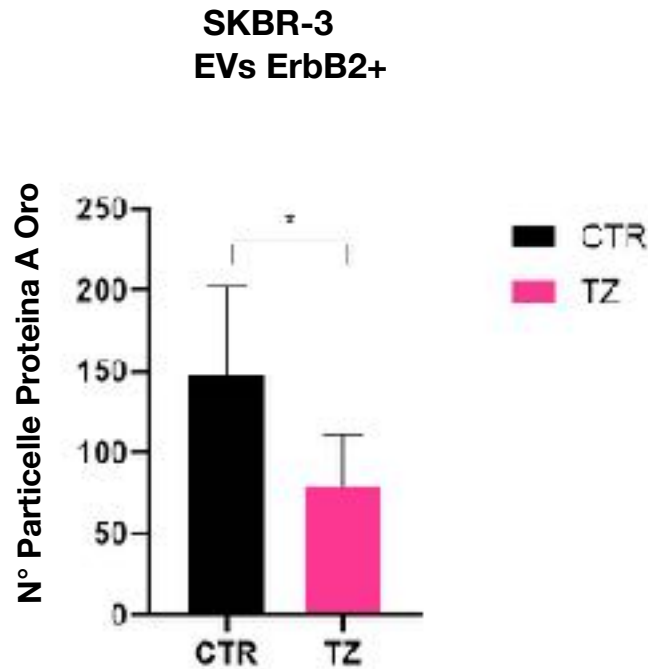


Fig. 16: Analisi numerica delle particelle di Proteina A Oro in cellule SKBR-3 di controllo e trattate con Tz.

CD63, marcatore di EVs, è modulato dal Tz in cellule ErbB2+

Dal punto di vista molecolare, la tetraspanina CD63 ha un cuore proteico il cui peso molecolare corrisponde a 17 KDa ma spesso la si ritrova in forme variamente glicosilate, a maggior peso molecolare, associate ad invasività tumorale. Basandoci sull'evidenza che Tz induce l'espressione di un'isoforma di 50 KDa di CD63 nelle EVs, abbiamo deciso di verificare se ciò riflettesse una diversa abbondanza di questa isoforma indotta dal Tz nei lisati delle tre linee cellulari. Abbiamo effettuato un esperimento di biochimica per Western Blot trattando le cellule con IgG umane 10 µg/ml (cellule di controllo) e con Tz 10 µg/ml per 72 ore. Come è mostrato in Fig. 17, il Tz modula l'espressione di CD63 anche nei lisati cellulari determinando una up-regolazione della banda corrispondente al peso molecolare di 50 KDa più evidente nelle linee BT474 e SKBR-3.

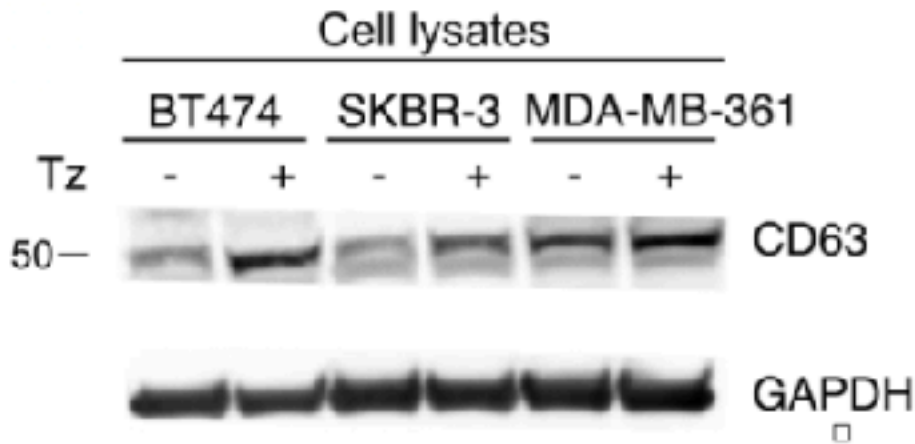


Fig. 17: Il trattamento con Tz induce una up-regolazione di CD63 (50 KDa) nei lisati totali delle tre linee di carcinoma mammario ErbB2 positive.

Tenendo conto del fatto che la glicosilazione rappresenta la principale modificazione post-traduzionale di CD63 e che è correlata ad aggressività tumorale ed alla resistenza ai farmaci, abbiamo verificato che la modulazione di CD63, riscontrata sia nelle EVs che nei lisati cellulari, fosse effettivamente correlata ad una glicosilazione della proteina. Per confermare questo dato abbiamo utilizzato la N-glicosidasi F, un enzima capace di rimuovere residui glucidici legati a proteine, permettendo così di individuare il peso molecolare del cuore della proteina. Abbiamo trattato le cellule SKBR-3 per 72 ore con Tz 10 µg/ml; al termine del trattamento abbiamo somministrato la N-glicosidasi F a temperatura ambiente, per tempi differenti (1, 6 e 24 ore) a due diverse concentrazioni (2.5 e 5 unità). Come mostrato in Fig. 18, nel campione trattato con solo Tz si conferma la presenza di CD63 a 50 KDa osservata negli esperimenti precedenti, mentre in seguito al trattamento con la glicosidasi il peso molecolare di CD63 scende a circa 17 KDa, confermando l'ipotesi che Tz induce l'espressione della forma glicosilata della tetraspanina.

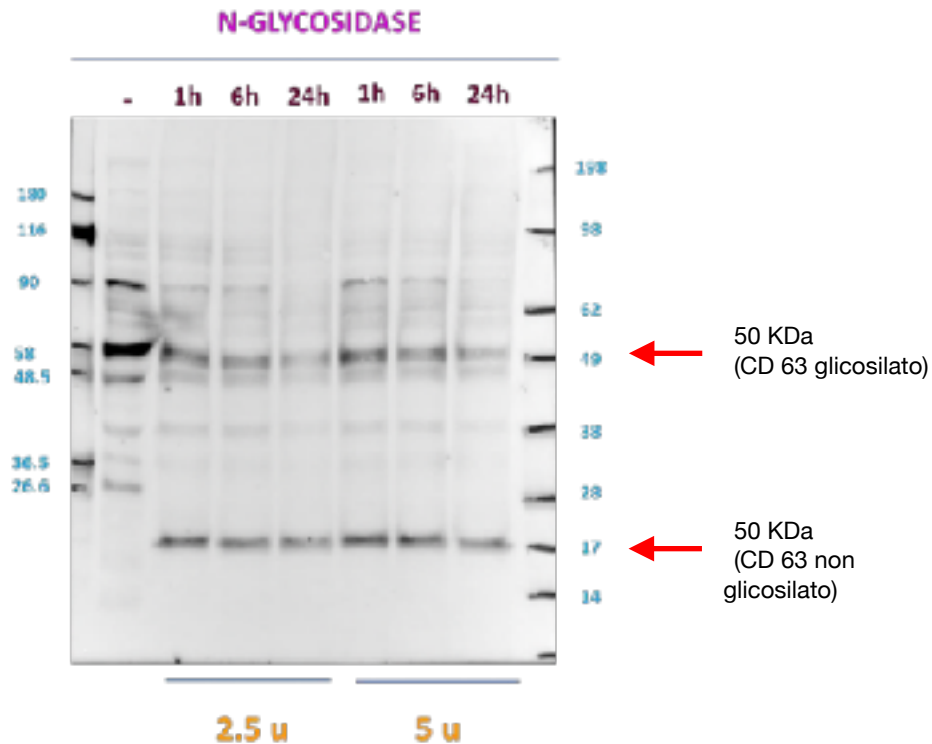


Fig. 18: La deglicosilazione di CD63, ad opera della N-glicodidasi, mostra che Tz induce una forma glicosilata di CD63

Espressione del microRNA 27a3-p in linee cellulari di carcinoma mammario ErbB2+ dopo trattamento con Tz

Ad oggi è noto che l'espressione dei microRNA è regolata durante lo sviluppo e per circa il 50% dei miRNA è tessuto specifica^{97,98}. Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato il loro coinvolgimento in diverse patologie, soprattutto quelle oncologiche. Nel cancro, i miRNA mostrano profili di espressione specifici per tipologia di tumore^{99,100} e fortemente dipendente dal livello di differenziamento della cellula.

Partendo da questo presupposto e per verificare se il farmaco determinasse qualche variazione nell'espressione e nell'abbondanza di alcuni miRNA, è stato valutato il profilo di espressione di diversi miRNA tramite l'utilizzo di microarray e di real time PCR nelle EVs prodotte da cellule di carcinoma mammario di controllo (trattate con

IgG umane) e in seguito a trattamento con Tz per 72 h. Nello specifico è stato effettuato uno *screening* iniziale, tramite microarray, su 80 diversi miRNA noti per essere espressi in maniera rilevante nel carcinoma mammario. In particolare, la tecnica del *microarray* consente di analizzare molti RNA contemporaneamente e utilizzando piccole quantità di campione permettendo così l'analisi anche su quantità limitate come nel caso delle vescicole extracellulari. Da questo insieme di miRNA, ne sono stati successivamente selezionati 7, i quali sono risultati essere particolarmente espressi nelle tre linee di carcinoma mammario ErbB2+ (SKBR-3, BT474 e MDA-MB-361) utilizzate in questo studio. I miRNA risultati essere più abbondanti e valutati mediante real time qRT-PCR sono i seguenti: miR7-5p, miR613, miR489-3p, miR152-3p, miR130a-3p, miR27a-3p e miR181a-5p, tutti implicati in diversi processi coinvolti nella sopravvivenza, nella crescita e nell'invasività delle cellule tumorali.

Sono stati eseguiti almeno tre replicati biologici indipendenti su ciascuna delle tre linee cellulari analizzate ed è emerso che di questi 7 miRNA, uno solo, il miR27a3-p, è risultato essere modulato dal Tz in maniera concorde nelle tre diverse linee cellulari studiate.

In particolare, dalle nostre analisi è emerso che il trattamento con Tz a 72 h tende a ridurre l'espressione del miRNA 27a3-p nelle EVs rilasciate dalle tre linee cellulari prese in esame, sebbene in maniera limitata. Come è possibile notare dal grafico riportato in Fig. 19, in tutti i campioni trattati con Tz si osserva un ΔC_t (ottenuto normalizzando i valori di espressione rispetto al ncRNA U6) maggiore rispetto alla controparte di controllo, che corrisponde quindi ad una minore abbondanza di miRNA. Sebbene questo *trend* in riduzione dell'espressione del miRNA 27a3-p sia presente in tutte le linee, non abbiamo osservato una significatività statistica del dato ottenuto.

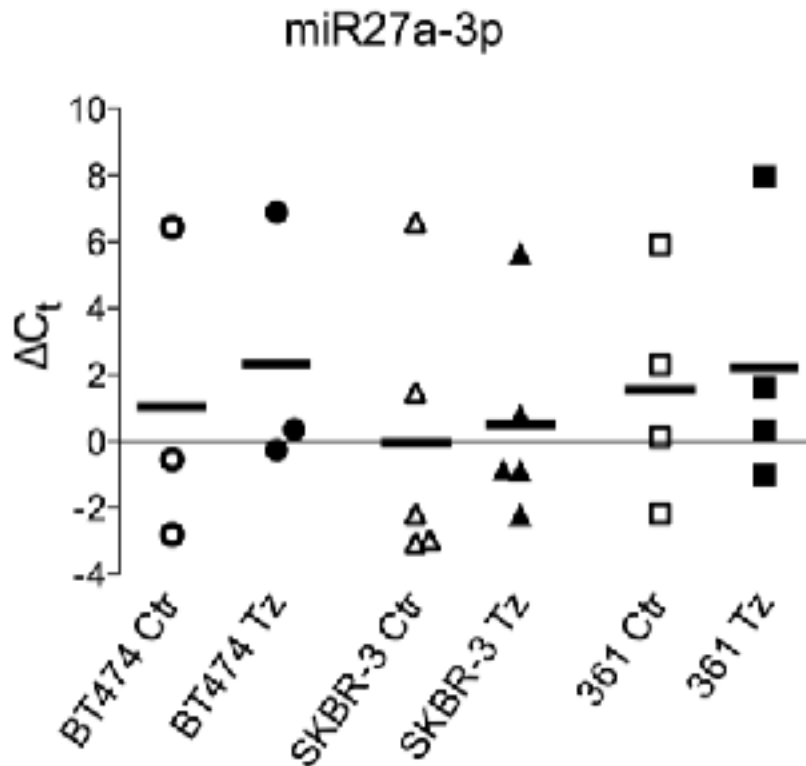


Fig. 19: Modulazione nell'espressione del miRNA 27a3-p (ΔC_t) in cellule di carcinoma mammario ErbB2+ in seguito al trattamento con Tz.

Analisi proteomica su EVs di cellule SKBR-3 in seguito a trattamento con Tz

Per valutare se il trattamento con Tz influisce sul contenuto e sull'espressione di proteine all'interno delle vescicole extracellulari, è stato utilizzato l'approccio di proteomica comparativa. Con l'impiego della spettrometria di massa applicata alla caratterizzazione dei profili di espressione proteica, sono stati condotti tre esperimenti biologici indipendenti su EVs derivate dalla linea SKBR-3 in condizione di controllo (trattamento con IgG umane) e trattate con Tz per 72 ore. In tabella 1 è riportato il numero di proteine totali identificate in ogni campione (CTR e Tz).

| Campione | Totale proteine identificate |
|-------------------------|------------------------------|
| EVs SKBR-3 CTR 1 | 1478 |
| EVs SKBR-3 CTR 2 | 1482 |
| EVs SKBR-3 CTR 3 | 1483 |
| EVs SKBR-3 TZ 1 | 1503 |
| EVs SKBR-3 TZ 2 | 1519 |
| EVs SKBR-3 TZ 3 | 1520 |

Tab. 1: Numero totale di proteine identificate nei 6 campioni di EVs (3 CTR e 3 trattati con Tz) tramite spettrometria di massa.

Come riportato in Fig. 20, l'analisi proteomica ha dimostrato che 51 proteine sono differenzialmente espresse in maniera significativa tra i campioni di controllo e i trattati con Tz ($p\text{-value} < 0.05$) nei tre replicati biologici. In particolare, 31 proteine sono up-regolate e 20 sono down-regolate dal Tz.

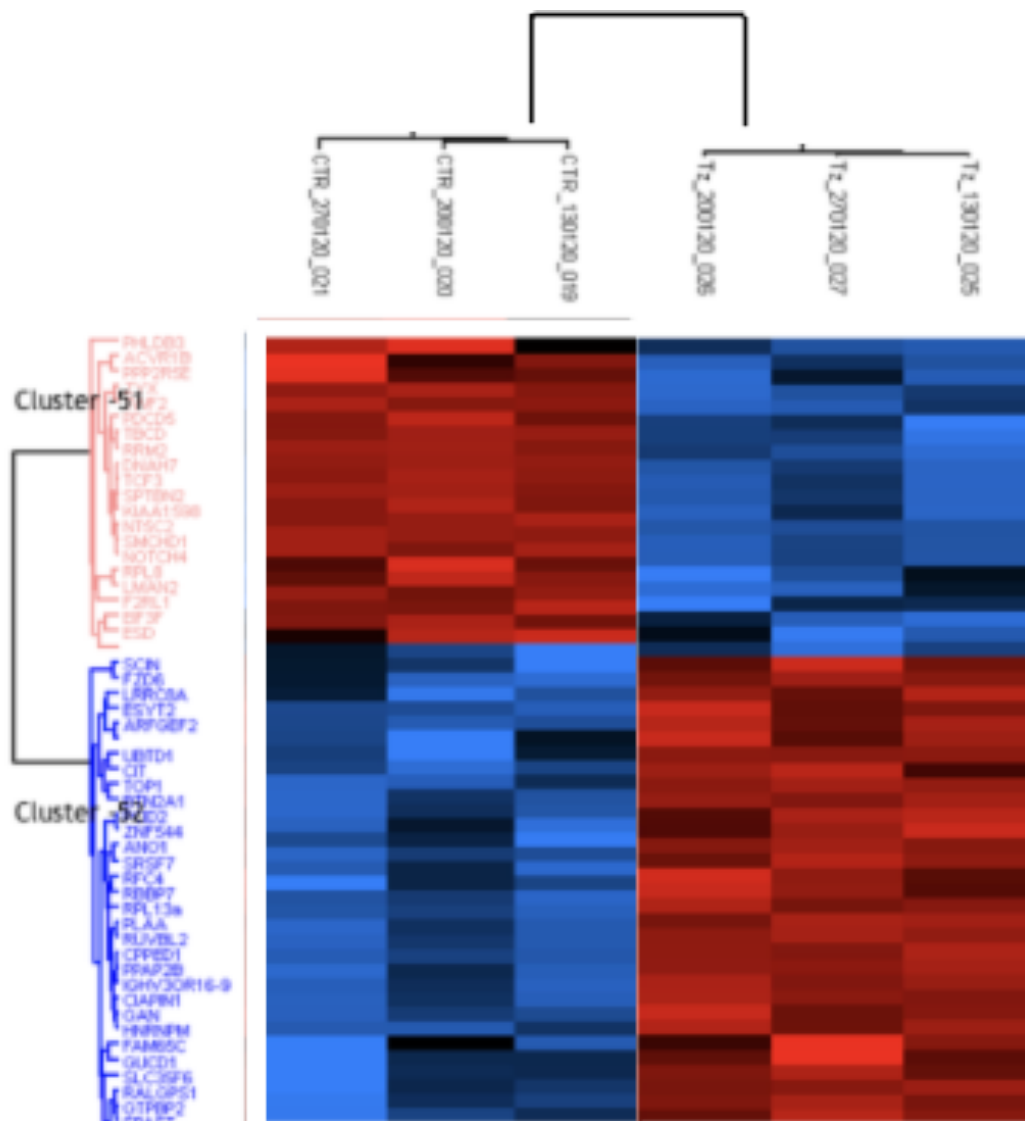


Fig. 20: Heatmap delle proteine identificate come significativamente regolate da t-test in modo differenziale ($p < 0.05$) nelle EVs di controllo (CTR) e nelle EVs trattate con Tz, per un totale di 51 proteine.

In tabella (2 e 3) sono riportate le principali funzioni, note in letteratura, svolte dalle diverse proteine coinvolte nella regolazione da parte del Tz e, come è possibile notare, queste proteine sono implicate nello svolgimento di molteplici funzioni. Nello specifico, in tabella 2 sono riportate le proteine iper-regolate in seguito a trattamento con Tz mentre in tabella 3 le proteine iper-regolate dopo trattamento con IgG umane. Per comprendere quali processi biologici possono essere influenzati dalle proteine associate alle EVs modulate dal Tz, è stato utilizzato l'algoritmo disponibile tramite la risorsa *online Human-Base*. In particolare, per l'analisi è stato selezionato un *database* di proteine specifico per l'epitelio mammario. In Fig. 21 sono riportati i 4

moduli proteici identificati. Il modulo 1 (M1) è costituito da proteine coinvolte nella regolazione dell'organizzazione mitocondriale (trasporto mitocondriale, organizzazione della membrana mitocondriale); il modulo 2 (M2) è rappresentato da proteine coinvolte nel processo di divisione cellulare ed in particolare nella citodieresi; il modulo 3 (M3) è coinvolto in processi che riducono la velocità, la frequenza e l'entità dei processi coinvolti nella formazione e degradazione degli organelli cellulari. Infine, il modulo 4 (M4) è costituito da proteine che sono in gran parte coinvolte nel sistema immunitario.

Tabella 2. Proteine iper-regolate dopo trattamento con Tz (10 µg/ml per 72 h) e principali funzioni.

| Abbreviazione della proteina | Funzione della proteina |
|------------------------------|--|
| ANO 1 | Anoctamina 1 (ANO1) è un canale voltaggio-dipendente attivato dal calcio, sovraespressa in diversi tipi di tumori tra cui quello a cellule squamose testa-collo, CRC, glioma e nel carcinoma mammario <i>Transcriptional repression of HER2 by ANO1 Cl⁻ channel inhibition in human breast cancer cells with resistance to trastuzumab</i> |
| ARFGEF2 | ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor-2 (ARFGEF2) è implicato nel trafficking vescicolare |
| BTN2A1 | Proteina coinvolta nel metabolismo dei lipidi, degli acidi grassi e degli steroli; può essere associata a diverse patologie tra cui la sindrome metabolica |
| CIAPIN 1 | Cytokine-induced apoptosis inhibitor-1 (CIAPIN 1) noto regolatore di apoptosi in diversi tipi cellulari. E' implicata nella proliferazione cellulare, nella progressione del ciclo cellulare ed è coinvolta nella multi resistenza ai farmaci attraverso la regolazione di MDR e p53 nel carcinoma mammario |
| CIT | Proteina chinasi Rho effettrice, associata a diverse tipologie di cancro. Nel carcinoma mammario, sovraespressione di CIT-K è associata a malattia in stadio avanzato, espressione di ErbB2 e Ki-67; una down-regolazione è invece associata ad una diminuita proliferazione, migrazione e invasione cellulare, ad un arresto del ciclo cellulare e apoptosi. <i>Citron kinase (CIT-K) promotes aggressiveness and tumorigenesis of breast cancer cells in vitro and in vivo: preliminary study of the underlying mechanism D. Meng, et al.</i> |
| CPPED 1 | Fosfatasi che defosforila la chinasi della famiglia AKT, -nella fattispecie la Ser 473- bloccando la progressione del ciclo cellulare e promuovendo l'apoptosi |

| | |
|----------|--|
| ESYT 2 | Coinvolta nei legami tra reticolo endoplasmatico e membrana plasmatica e nel trasporto dei lipidi cellulari |
| FAM65C | Più comunemente conosciuta come Ripor 3, è un inibitore dell'attività di RhoA |
| FZD6 | Recettore per proteine Wnt (implicate nella tumorigenesi), associata alla via di segnalazione canonica della beta-catenina—> sopravvivenza cellulare. Frequentemente iper-espresso in diversi tumori, tra cui il carcinoma mammario. Nel sottotipo triplo negativo FDZ6 è spesso iperespresso e regola la motilità, l'invasione e la crescita cellulare. In cellule MDA-MB-231 regola il deposito della fibronectina e il citoscheletro di actina. <i>Functional and prognostic significance of the genomic amplification of frizzled 6 (FZD6) in breast cancer Gabriele Corda et al.</i> |
| GAN | Proteina citoscheletrica coinvolta nell'architettura dei neurofilamenti; fondamentale per il mantenimento e la sopravvivenza neuronale |
| GTPB2 | GTP-binding protein 2 |
| GUCD1 | (Guanylyl cyclase domain containing 1). Spesso presente una iper-espressione di GUCD1 in tumore epatico. <i>NEDD4 controls the expression of GUCD1, a protein upregulated in proliferating liver cells Marina Maria Bellet et al.</i> |
| HNRNPM | (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M), coinvolta nello splicing, agisce come recettore per l'antigene carcioembrionario nelle cellule di Kupffer. |
| KIAA0196 | Appartenente al complesso WASH il quale regola l'assemblaggio dell'actina sulle vescicole extracellulari. Mutazioni di KIAA0196 sono implicate in alcune forme di paraplegia spastica ereditaria. |
| LRRC8A | Componente essenziale del canale ionico VRAC, necessario per mantenere un volume cellulare costante in risposta a cambiamenti osmotici intra-ed extracellulari. E' inoltre coinvolta in diversi processi biologici tra cui l'adesione cellulare, il traffico cellulare e le interazioni ormone-recettore. Può anche svolgere un ruolo nell'omeostasi dei lisosomi. |
| PCID2 | Proteina richiesta per la sopravvivenza delle cellule B attraverso la regolazione dell'espressione della proteina MAD2L1 (checkpoint del ciclo cellulare). Inoltre interagisce e stabilizza la proteina BRCA2 (coinvolta nel carcinoma mammario). |
| PLAA | E' coinvolta nell'ubiquitinazione e degradazione proteica attraverso associazione con VPC. E' anche coinvolta nel traffico di vescicole sinaptiche e nell'autofagia (tramite l'eliminazione di organuli danneggiati). |

| | |
|---------|--|
| PPAP2B | Glicoproteina coinvolta nella sintesi de novo dei glicerolipidi e nella trasduzione del segnale attivata dal recettore mediata dalla fosfolipasi D. |
| RALGPS1 | Può essere coinvolta nell'organizzazione del citoscheletro. |
| RBBP7 | Proteina ubiquitaria; può interagire con il gene oncosoppressore BRCA1 e ha avere un ruolo nella regolazione della proliferazione e differenziazione cellulare. |
| RFC4 | Replication factor C subunit 4. |
| RPL13A | Proteina ribosomiale ma non coinvolta nella canonica funzione ribosomiale. |
| RUVBL2 | Essenziale per la ricombinazione omologa e la riparazione della rottura del doppio filamento di DNA. |
| SCIN | Ha una funzione di regolazione nell'esocitosi influenzando l'organizzazione dei filamenti di actina. |
| SLC35F6 | (Solute Carrier Family 35 Member F6), è coinvolta nel mantenimento del potenziale della membrana mitocondriale in cellule di adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC); promuove la crescita di PDAC. |
| SPAT | Subtilin transport ATP-binding protein. |
| SPTBN1 | Spectrin Beta, Non-Erythrocytic 1. La spettina è una proteina citoscheletrica che riveste un ruolo importante nel mantenimento dell'integrità della membrana plasmatica e della struttura citoscheletrica. |
| SRSF7 | Serine/arginine-rich splicing factor 7. E' fondamentale nello splicing dell'mRNA, nella sua esportazione dal nucleo e nella traduzione. |
| TOP 1 | DNA Topoisomerasi 1 implicata nel grado di superavvolgimento del DNA. |
| UBTD1 | Ubiquitin domain-containing protein 1, può essere coinvolta nella regolazione della senescenza cellulare attraverso TP53 (tumor proteina 53). |
| ZNF544 | Zinco finger protein 544 coinvolto nella regolazione trascrizione. |

In rosso sono evidenziate le proteine, risultate iper-regolate nelle EVs in seguito al trattamento con Tz, che sono note per essere coinvolte in meccanismi di proliferazione / sopravvivenza cellulare, progressione del ciclo cellulare, inibizione di apoptosi e resistenza alle terapie.

In verde sono invece evidenziate le proteine, risultate iper-regolate nelle EVs in seguito al trattamento con Tz, riconosciute per avere un ruolo nell'attivazione di apoptosi, blocco del ciclo cellulare e riparazione del DNA.

Tabella 3. Proteine iper-regolate dopo trattamento con IgG umane (10 µg/ml per 72 h) e principali funzioni

| Abbreviazione della proteina | Funzione della proteina |
|------------------------------|---|
| ACVR1B | (Activin A receptor type IB) proteina di segnalazione implicata nella crescita e differenziamento cellulare. Mutazioni in questo gene sono state osservate in diversi tipi di cancro tra cui l'adenocarcinoma pancreatico e il carcinoma mammario. In quest'ultimo, rallenta la crescita delle cellule inducendo l'arresto del ciclo cellulare. |
| DNAH7 | E una componente della dineina, implicata nel movimento di ciglia e flagelli. |
| EIF3F | Componente del complesso del fattore 3 di inizio della traduzione eucariotica F, richiesto in diversi passaggi all'inizio della sintesi proteica. |
| ESD | (S-formylglutathione hydrolase), enzima attivo verso numerosi substrati inclusi gli acidi salici e può essere coinvolto nel loro riciclaggio. E' usato anche come marker genetico per il retinoblastoma e la malattia di Wilson. |
| F2RL1 | Protease-activated receptor 2, promuove la generazione di microvescicole dipendenti dall'actomiosina in cellule di carcinoma mammario. L'attivazione di questo recettore stimola il rilassamento della muscolatura liscia, dilata i vasi sanguigni aumentandone il flusso e diminuendone la pressione. |
| KIAA 1598 | proteina di fusione. |
| LMAN2 | Iper-espressa in carcinoma mammario metastatico al cervello. E' inoltre coinvolta nel trasporto e nello smistamento di glicoproteine . |
| NOTCH4 | Recettore che svolge un ruolo nello sviluppo vascolare, renale ed epatico. Può inoltre regolare l'attività delle cellule staminali di cancro al seno. |
| NT5C2 | Idrolasi che svolge un ruolo importante nel metabolismo cellulare delle purine. La presenza di mutazioni nel gene NT5C2 determina resistenza alla tiopurina (usati nel trattamento della leucemia linfoblastica acuta). |
| PDCD5 | Programmed cell death protein 5, iper-espressa durante il processo apoptotico. |

| | |
|---------|---|
| PHLDB3 | (Pleckstrin homology domain-containing protein) determina crescita tumorale tramite un ciclo di feedback negativo che coinvolge p53. <i>Pleckstrin homology domain-containing protein PHLDB3 supports cancer growth via a negative feedback loop involving p53 Tengfei Chao et al.</i> |
| PPP2R5E | Proteina fosfatasi implicata nel controllo negativo della crescita e della divisione cellulare. |
| RPL8 | Proteina ribosomiale, componente della subunità 60S. |
| RRM2 | Ribonucleotide reduttasi; catalizza la formazione di desossiribonucleotidi a partire dai ribonucleotidi. |
| SMCHD1 | (Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein) coinvolta nel silenziamento epigenetico, regolando l'architettura della cromatina. |
| SPTBN2 | Regola la via di segnalazione del glutammato stabilizzandone il trasportatore sulla membrana plasmatica. Mutazioni a carico di questo gene provocano atassia cerebrosspinale. |
| TBCD | Coinvolta nel corretto ripiegamento della beta-tubulina. |
| TCF3 | Promuove l'adesione delle cellule epiteliali ed è coinvolta nella formazione delle giunzioni cellulari. |
| TWF2 | Proteina legante l'actina, coinvolta nei processi morfologici e di mobilità e ha un ruolo nell'endocitosi mediata da clatrina e nella distribuzione degli organuli endocitici. |
| ZYF | ZYF (zyxin) è una fosfoproteina legante lo zinco, presente sulle aderenze focali e lungo il citoscheletro di actina. Può modulare l'organizzazione citoscheletrica dei filamenti di actina e può promuovere la carcinogenesi mammaria. |

In rosso sono evidenziate le proteine, risultate iper-regolate nelle EVs in seguito al trattamento con IgG umane (rappresentanti il controllo), implicate nella crescita e differenziamento cellulare, nella regolazione dell'attività di cellule staminali tumorali e nella generazione di microvescicole. In colore verde le proteine, iper-regolate nella situazione di controllo, coinvolte nell'apoptosi e nel blocco della crescita e differenziamento cellulare.

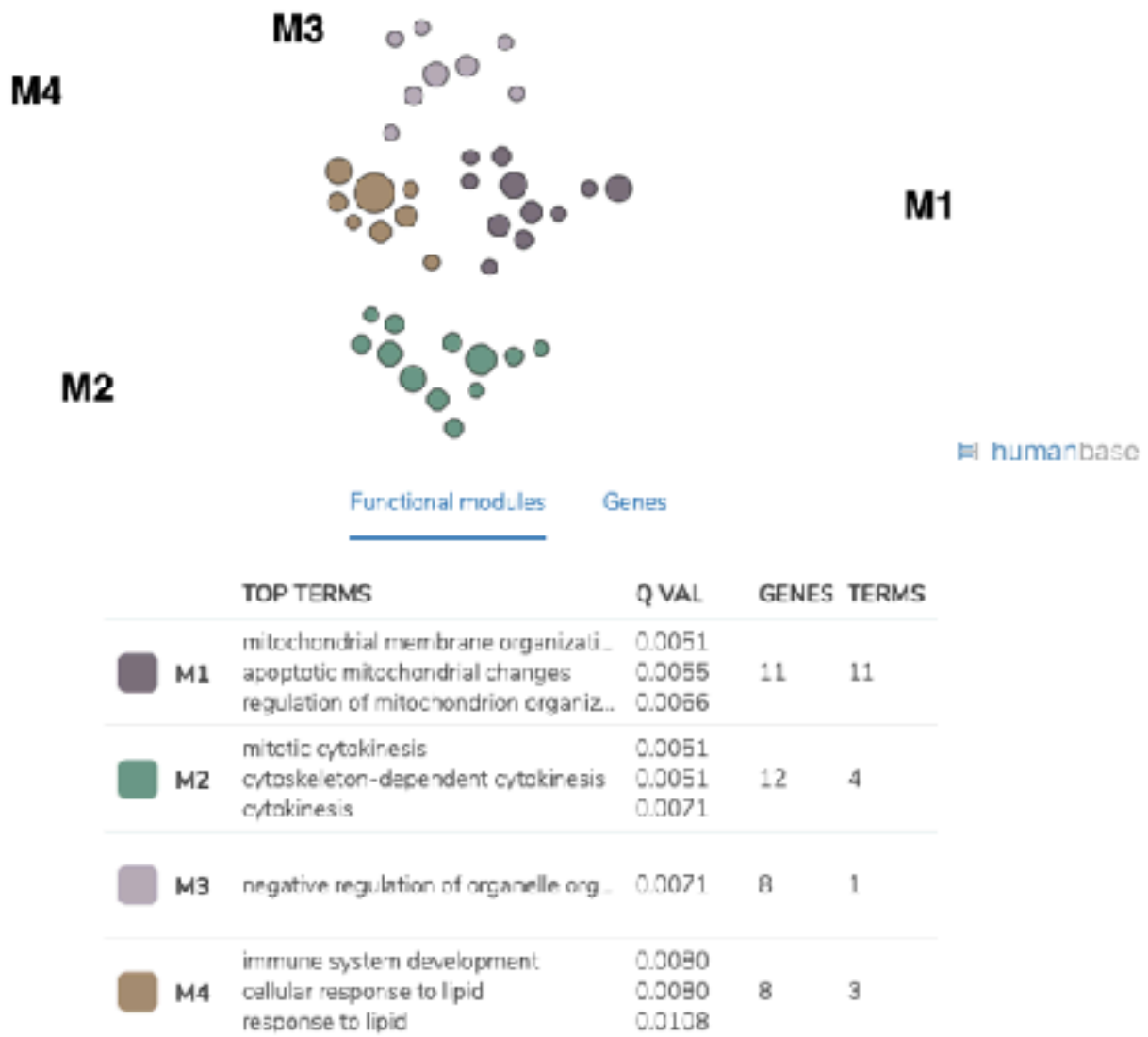


Fig. 21: Il trattamento con Tz modula diverse proteine, raggruppabili in 4 moduli in base alle funzioni che svolgono. Grafico ottenuto mediante l'algoritmo HumanBase.

Tz induce alterazioni mitocondriali in cellule SKBR-3

Basandoci sull'evidenza che il modulo funzionale maggiormente rappresentato dall'analisi informatica delle proteine associate alle EVs e modulate dal Tz è correlato ai processi di organizzazione della membrana mitocondriale, è stato ipotizzato che Tz possa influire sulla struttura mitocondriale stessa, in cellule di carcinoma mammario. In particolare, è stata utilizzata la linea cellulare SKBR-3 e sono state analizzate le dimensioni e l'area dei mitocondri marcati con il tracciante fluorescente Mito Tracker Red. E' stato riscontrato un aumento statisticamente

significativo di entrambi i parametri in seguito al trattamento con Tz (Fig. 22 A). Questi dati hanno posto le basi per caratterizzare ulteriormente il fenotipo mitocondriale nella linea cellulare ErbB2+, SKBR-3. L'analisi al TEM ha mostrato una alterazione delle creste mitocondriali nelle cellule trattate con Tz rispetto al controllo (Fig. 22 B).

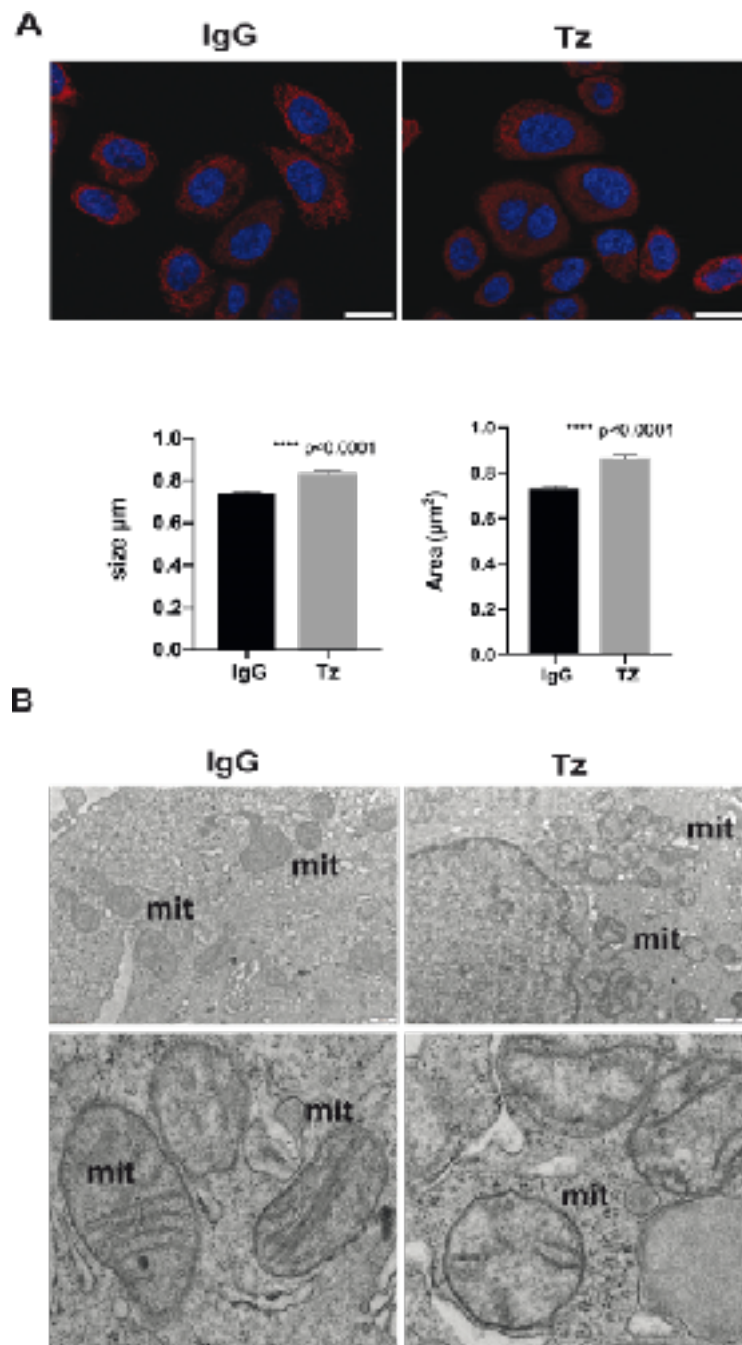


Fig. 22: Fluorescenza e analisi al TEM dei mitocondri delle cellule SKBR-3. (A) I mitocondri marcati con Mito Tracker Red mostrano dimensioni e area maggiori nelle cellule trattate con Tz rispetto ai controlli (IgG). (B) I mitocondri (mit) nelle cellule trattate con Tz mostrano un numero ridotto di creste rispetto ai controlli (IgG).

Discussione e conclusioni

Sebbene l'anticorpo monoclonale Trastuzumab (Tz) sia utilizzato da diversi anni come farmaco d'elezione nel trattamento del carcinoma mammario ErbB2+, la durata media della risposta, da parte delle pazienti, è modesta. Ciò è dovuto allo sviluppo di meccanismi di resistenza primaria o acquisita nei confronti del farmaco. In letteratura è noto che le vescicole extracellulari (EVs) che vengono rilasciate dalle cellule possono mediare la comunicazione intercellulare, sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche, trasportando segnali molecolari alle altre cellule, mediante il trasferimento di diverse molecole tra cui miRNA e proteine. Questo studio si è inizialmente focalizzato, avvalendosi della microscopia elettronica, sulla caratterizzazione delle EVs derivanti da cellule di carcinoma mammario ErbB2+ in presenza o meno del trattamento con Tz per verificare eventuali differenze in termini morfologici e/o di marcatura per ErbB2 e parallelamente è stata valutata anche la via endocitica/autofagica, nota per essere correlata alla via di rilascio di EVs.

Dopo aver verificato la positività per il recettore ErbB2 delle linee cellulari usate in questo studio (SKBR-3, BT474 e MDA-MB-361) e aver valutato che tutte le linee rilascino EVs, sono state eseguite analisi volte a caratterizzare, a livello ultrastrutturale e biochimico, il processo autofagico poiché il rilascio di EVs dipende dai MVBs, coinvolti in questo processo. E' stato dimostrato, tramite Western Blot, che nei nostri modelli cellulari il Tz riduce l'espressione di LC3I/II, marcatore di autofagosomi e implicato nella loro maturazione, bloccando quindi l'autofagia in una fase precoce del processo. Per giungere a questa conclusione è stata valutata l'espressione di LC3 I/II in presenza di Bafilomicina A1(Baf), la quale determina un blocco della fusione tra autofagosomi e lisosomi e una ridotta acidificazione. Basandoci su evidenze, note in letteratura, che riportano un'interazione tra EVs e autofagia⁷² è stato valutato se, anche per microscopia elettronica, si riscontrasse una correlazione con il dato precedente. Sono stati analizzati, a livello ultrastrutturale, due organelli della via endocitica/autofagica, lisosomi e *multivesicular bodies* (MVBs), identificati mediante la marcatura con BSA-gold. Poiché la Baf determina

un blocco della fusione tra autofagosomi e lisosomi, essa causa un aumento statisticamente significativo del diametro dei lisosomi degradativi nelle cellule e un *trend* di aumento del numero di lisosomi e di MVBs. Il Tz come singolo trattamento, nonostante l'effetto inibitorio che è stato osservato sulla riduzione di LC3 I/II tramite analisi biochimica, non dimostra avere un effetto così importante sulla riduzione del numero e delle dimensioni dei lisosomi mentre il doppio trattamento Tz+Baf determina invece una maggiore riduzione del loro numero così come un *trend* di aumento del numero di MVBs, che potrebbe essere correlato ad un maggiore rilascio di EVs da parte delle cellule o ad una maggiore attività degradativa lisosomiale⁷². Dall'analisi ultrastrutturale al TEM, è emerso che i MVBs hanno una localizzazione prevalentemente nucleare e vicino all'apparato del Golgi. La posizione perinucleare solitamente è associata alla via degradativa, per cui l'ipotesi di un potenziamento dell'attività di secrezione di EVs risulta essere poco probabile.

Tramite caratterizzazione ultrastrutturale è emerso che le EVs appartengono a tre classi distinte per caratteristiche morfologiche e dimensionali: tipo A maggiormente numerose, con classica forma a coppa e di diametro fino a 300 nm, tipo B con dimensione massima di 220 nm e caratterizzate da un anello chiaro alla periferia della vescicola e una zona centrale molto scura e tipo C più piccole (30-80 nm) e di un grigio uniforme. Le ultime due classi risultano essere le meno numerose.

Sono state effettuate analisi biochimiche e di microscopia elettronica per identificare e caratterizzare il contenuto proteico e morfologico delle vescicole. Le EVs provenienti dalle tre linee cellulari ErbB2+ risultano essere positive per i marcatori specifici di vescicole (CD9, HSP 90, Alix e CD63) e, come atteso, anche per ErbB2 (dalla letteratura è noto che le EVs riflettono la composizione proteica delle cellule da cui originano¹⁰¹). Dall'analisi ultrastrutturale è stato possibile evincere che il recettore ErbB2 si localizza solo su una frazione di EVs ed in particolare su quelle di tipo A che hanno dimensioni tra i 50 e i 200 nm. Le EVs di tipo B raramente risultano essere positive per ErbB2, mentre quelle di tipo C risultano essere sempre negative. Il trattamento con Tz non determina variazioni significative nelle dimensioni delle EVs

ma riduce sia il numero che la quantità di ErbB2 (proteina A oro, 10 nm) espressa sulle EVs. Nell'analisi dei marcatori di EVs, particolare attenzione è stata posta alla tetraspanina CD63, la quale è costituita da un core proteico di 17 KDa ma può essere glicosilata e avere un peso molecolare che può raggiungere i 50 KDa. Dall'analisi biochimica, l'espressione di CD63 a 50 KDa è risultata presente solo nei campioni trattati con Tz sulle EVs delle tre linee cellulari. È da notare che l'analisi proteomica non ha rilevato la proteina CD63 come significativamente regolata dal Tz nelle EVs; molto probabilmente questo è dovuto ad un limite della tecnica. Infatti, le catene glucidiche legate ai peptidi a causa della loro carica ed acidità determinano una bassa efficienza di ionizzazione e conseguentemente una misura poco accurata della loro abbondanza relativa rispetto a peptidi non glicosilati. Dalla letteratura è noto che, in alcuni specifici contesti, le forme altamente glicosilate di CD63 sono associate ad un fenotipo tumorale più aggressivo con disseminazione tumorale e prognosi più infausta. Dal lavoro di Tominaga et al¹⁰², si evince che la glicosilazione di CD63, mediata dalla riboforina II, è una modificazione post-traduzionale implicata nella resistenza alle terapie nel carcinoma mammario, attraverso la regolazione della localizzazione di MDR1 (Multi-Drug Resistance Protein) sulla membrana plasmatica. Inoltre l'analisi biochimica sui lisati cellulari totali permette sia di confermare che Tz modula CD63, inducendone la forma ad alto peso molecolare, sia che tale modulazione è data da una glicosilazione della proteina. Il fatto che Tz moduli la glicosilazione di CD63 e determini un *trend* di aumento dei MVBs, potrebbe essere dovuto ad una iniziale forma di resistenza al trattamento.

Il miR27a3-p è noto in letteratura per essere espresso in maniera anomala in diverse condizioni patologiche, soprattutto nei tumori, dove è considerato un oncogene in quanto la sua iper-espressione è associata ad una prognosi infausta, come osservato in pazienti con osteosarcoma o tumore gastrico^{103,104}. Diversi studi dimostrano che il miR27a3-p è implicato nell'evoluzione di molti tumori solidi, mostrandosi come potenziale utile biomarcatore e bersaglio per l'applicazione clinica. La sovraespressione di miR27a3-p promuove in modo significativo la crescita di cellule

tumorali nel glioma¹⁰⁵, nel carcinoma epatocellulare¹⁰⁶, nel cancro esofageo¹⁰⁷, nel carcinoma a cellule renali ⁰⁸, nel carcinoma rinofaringeo¹⁰⁹, nel cancro del colon (CRC)¹¹⁰ e nell'adenocarcinoma gastrico¹¹¹. Nel carcinoma mammario è stato osservato che miRNA 27a3-p regola la crescita, la proliferazione, l'invasione e l'angiogenesi delle cellule tumorali^{112,113}.

Tale miRNA è inoltre implicato nella transizione epitelio mesenchimale (EMT)¹¹⁴, nella regolazione della risposta immunitaria e nella resistenza ai farmaci¹¹⁵. Ad esempio, è stato visto che in cellule di carcinoma mammario è implicato nella sensibilità al trattamento con cisplatino¹¹⁶ e al trattamento con adriamicina¹¹⁷, alla terapia endocrina¹¹⁸; inoltre nel carcinoma mammario triplo negativo (TNBC) è coinvolto nella sensibilità alla radioterapia¹¹⁹. Nonostante i numerosi lavori che evidenziano il ruolo di questo RNA nel carcinoma mammario, non esiste un'evidenza della sua funzione nel sottotipo ErbB2+. I dati preliminari ottenuti dalle analisi effettuate sulle EVs delle tre linee cellulari, evidenziano un *trend* di riduzione nell'espressione del miRNA 27a3-p in seguito al trattamento con Tz per 72 ore. Saranno comunque necessari ulteriori studi per confermare questa ipotesi, implementando ad esempio il numero di linee cellulari di carcinoma mammario ErbB2+ e la quantità di campione analizzato.

In aggiunta al contenuto di miRNA, le cellule possono trasferire alle EVs anche proteine che possono determinare cambiamenti fenotipici nelle cellule riceventi; questa forma di trasferimento può contribuire alla diffusione del fenotipo tumorale aggressivo in altre cellule e quindi contribuire alla disseminazione del tumore¹²⁰.

Nel nostro modello sperimentale ed in particolare sulla linea SKBR-3 è stato effettuato, in triplicato, un esperimento di proteomica avvalendosi della spettroscopia di massa al fine di evidenziare eventuali differenze nell'espressione di proteine più o meno coinvolte nel trasferimento del fenotipo tumorale aggressivo da una cellula all'altra. Il risultato delle nostre analisi ha portato ad evidenziare un totale di 51 proteine significativamente regolate in seguito al trattamento con Tz (31 risultano iper-regolate nel Tz e 20 iper-regolate nel controllo). Avvalendoci del database "Humanbase", è stato possibile raggruppare queste proteine in 4 moduli proteici in base alle funzioni che svolgono nell'epitelio mammario. Di fatto, ciò che si può

estrapolare da questa analisi, è che le proteine appartenenti a questa classificazione appartengono a moduli coinvolti in diversi processi cellulari, principalmente nell'organizzazione di diversi organelli, nei mitocondri, nel citoscheletro e nel sistema immunitario. È interessante notare che diversi studi riportano che il trattamento con Tz induce forti alterazioni morfologiche mitocondriali. Tuttavia, questi studi si sono concentrati sui miocardiociti¹²¹⁻¹²³. Qui mostriamo che i mitocondri delle cellule ERBB2 + BCa trattate con Tz hanno dimensioni maggiori e mostrano alterazioni morfologiche nelle creste. Pertanto, ipotizziamo che queste cellule possano veicolare tramite EVs alcuni componenti di mitocondri danneggiati o disfunzionali, forse insieme a componenti di altri organelli danneggiati, nel tentativo di eliminarli.

Inoltre, dall'analisi proteomica è emerso che diverse proteine tra quelle regolate in modo significativo sono già note in letteratura per essere rilevanti nell'evoluzione del carcinoma mammario. Nello specifico, sono state osservate diverse proteine iper-regolate con Tz e coinvolte nella resistenza ai farmaci attraverso la regolazione di MDR (Multi Drug Resistance Protein) (CIAPIN 1), nella proliferazione cellulare e nella progressione del ciclo cellulare (CIT, FDZ6), nell'interazione con il gene oncosoppressore BRCA1 (RBBP7) e nella regolazione dell'espressione genica di ErbB2 (ANO1). Altre proteine, down regolate dal trattamento, sono riconosciute per essere iper-esprese durante il processo apoptotico (PDCD5) e implicate nel controllo negativo della crescita e della divisione cellulare (PPP2R5E). In questo caso il Tz sembra avere un effetto nell'espressione di proteine pro-tumorali all'interno delle EVs e quindi sembrerebbe essere coinvolto in un processo di iniziale resistenza. Altre proteine che sono iper-esprese dal Tz, sono note per essere coinvolte nell'apoptosi (CPPED1), nella stabilizzazione e regolazione dell'oncosoppressore BRCA2 (PCID2) e nella riparazione del DNA (RUVBL2) e tra quelle down-regolate dal Tz si evidenziano ACVR1B, PHLDB3 e ZYF implicate nella crescita e nel differenziamento cellulare; nella generazione di microvescicole (F2RL1) e nella regolazione delle cellule staminali tumorali (NOTCH4). In questo secondo caso, il Tz

sembra avere un processo inibitorio nei confronti del trasferimento, all'interno delle EVs, di proteine implicate in un fenotipo più aggressivo.

In definitiva, l'analisi proteomica ha posto le basi per l'individuazione di proteine significativamente regolate dal Tz nelle EVs rilasciate dalla linea SKBR-3, ma saranno necessari ulteriori approfondimenti e studi funzionali per chiarire il significato delle nostre osservazioni.

Prospettive future

Alla luce dei dati raccolti, le prospettive future in questo ambito di ricerca sembrano essere promettenti. Altri esperimenti potranno approfondire e caratterizzare meglio il profilo di espressione della tetraspanina CD63 nelle EVs derivate da cellule di carcinoma mammario in seguito al trattamento con Tz. Sarebbe utile verificare sia l'espressione di CD63 come singola marcatura, sia la doppia marcatura CD63-ErbB2 per stabilire un'eventuale co-localizzazione delle due proteine.

Ulteriori studi funzionali saranno necessari anche per comprendere se la modulazione della glicosilazione di CD63 da parte di Tz, unita al *trend* di aumento del numero dei MVBs, possa effettivamente, come ipotizzato, rappresentare una iniziale forma di resistenza al trattamento per cui le cellule rilasciano nell'ambiente extracellulare EVs con fenotipo più maligno (CD63+).

Infine, studi futuri potranno essere focalizzati nella comprensione dell'azione delle EVs sulla migrazione e invasione in cellule di carcinoma mammario ErbB2 positive.

Bibliografia

1. Jung, A. Y. *et al.* Antioxidant supplementation and breast cancer prognosis in postmenopausal women undergoing chemotherapy and radiation therapy. *Am. J. Clin. Nutr.* **109**, 69–78 (2019).
2. Xie, H.-Y., Shao, Z.-M. & Li, D.-Q. Tumor microenvironment: driving forces and potential therapeutic targets for breast cancer metastasis. *Chin. J. Cancer* **36**, 36 (2017).
3. D'Alesio, C. *et al.* The chromodomain helicase CHD4 regulates ERBB2 signaling pathway and autophagy in ERBB2+ breast cancer cells. *Biol. Open* **8**, (2019).
4. Sinn, H.-P. & Kreipe, H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care Basel Switz.* **8**, 149–154 (2013).
5. Polyak, K. Heterogeneity in breast cancer. *J. Clin. Invest.* **121**, 3786–3788 (2011).
6. Lemmon, M. A. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp. Cell Res.* **315**, 638–648 (2009).
7. Ferguson, K. M. *et al.* EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol. Cell* **11**, 507–517 (2003).
8. Sweeney, C. & Carraway, K. L. Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage. *Oncogene* **19**, 5568–5573 (2000).
9. Slamon, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 177–182 (1987).
10. Press, M. F., Cordon-Cardo, C. & Slamon, D. J. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* **5**, 953–962 (1990).
11. Fuchs, I. B. *et al.* Analysis of HER2 and HER4 in human myocardium to clarify the cardiotoxicity of trastuzumab (Herceptin). *Breast Cancer Res. Treat.* **82**, 23–28 (2003).
12. Marker, K. M. *et al.* Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer Is Associated with Indigenous American Ancestry in Latin American Women. *Cancer Res.* **80**, 1893–1901 (2020).
13. Nahta, R. & Esteva, F. J. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res. BCR* **8**, 215 (2006).

14. Yan, M. *et al.* HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. *Cancer Metastasis Rev.* **34**, 157–164 (2015).
15. Moasser, M. M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* **26**, 6469–6487 (2007).
16. Hu, S. *et al.* Molecular architecture of the ErbB2 extracellular domain homodimer. *Oncotarget* **6**, 1695–1706 (2015).
17. Liu, P. *et al.* A single ligand is sufficient to activate EGFR dimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 10861–10866 (2012).
18. Knudsen, S. L. J., Mac, A. S. W., Henriksen, L., van Deurs, B. & Grøvdal, L. M. EGFR signaling patterns are regulated by its different ligands. *Growth Factors Chur Switz.* **32**, 155–163 (2014).
19. Yuan, T. L. & Cantley, L. C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* **27**, 5497–5510 (2008).
20. Brazil, D. P., Yang, Z.-Z. & Hemmings, B. A. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 233–242 (2004).
21. Martelli, A. M. *et al.* Intranuclear 3'-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis? *Cell. Signal.* **18**, 1101–1107 (2006).
22. Rosner, M. & Hengstschläger, M. Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 2934–2948 (2008).
23. McCubrey, J. A. *et al.* Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1263–1284 (2007).
24. Rhim, J. H. *et al.* Cell type-dependent Erk-Akt pathway crosstalk regulates the proliferation of fetal neural progenitor cells. *Sci. Rep.* **6**, 26547 (2016).
25. Armenian, S. & Bhatia, S. Predicting and Preventing Anthracycline-Related Cardiotoxicity. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book Am. Soc. Clin. Oncol. Annu. Meet.* **38**, 3–12 (2018).
26. Jerusalem, G., Lancellotti, P. & Kim, S.-B. HER2+ breast cancer treatment and cardiotoxicity: monitoring and management. *Breast Cancer Res. Treat.* **177**, 237–250 (2019).

27. Carter, P. *et al.* Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4285–4289 (1992).
28. Gennari, R. *et al.* Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**, 5650–5655 (2004).
29. Nahta, R. & Esteva, F. J. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett.* **232**, 123–138 (2006).
30. Slamon, D. J. *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* **344**, 783–792 (2001).
31. Vogel, C. L. *et al.* Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **20**, 719–726 (2002).
32. Hudis, C. A. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N. Engl. J. Med.* **357**, 39–51 (2007).
33. Nagata, Y. *et al.* PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* **6**, 117–127 (2004).
34. Klapper, L. N., Waterman, H., Sela, M. & Yarden, Y. Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer Res.* **60**, 3384–3388 (2000).
35. Vu, T. & Claret, F. X. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front. Oncol.* **2**, 62 (2012).
36. Maadi, H., Nami, B., Tong, J., Li, G. & Wang, Z. The effects of trastuzumab on HER2-mediated cell signaling in CHO cells expressing human HER2. *BMC Cancer* **18**, 238 (2018).
37. Ozkavruk Eliyatkin, N., Aktas, S., Ozgur, H., Ercetin, P. & Kupelioglu, A. The role of p95HER2 in trastuzumab resistance in breast cancer. *J. BUON Off. J. Balk. Union Oncol.* **21**, 382–389 (2016).
38. Valabrega, G., Montemurro, F. & Aglietta, M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **18**, 977–984 (2007).
39. Li, Y.-J. *et al.* Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin. J. Cancer* **36**, 52 (2017).

40. Reggiori, F. & Klionsky, D. J. Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot. Cell* **1**, 11–21 (2002).
41. Eskelinen, E.-L. Autophagy: Supporting cellular and organismal homeostasis by self-eating. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **111**, 1–10 (2019).
42. Dikic, I. & Elazar, Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 349–364 (2018).
43. Jung, C. H. *et al.* ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1992–2003 (2009).
44. Simonsen, A. & Tooze, S. A. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J. Cell Biol.* **186**, 773–782 (2009).
45. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 107–132 (2011).
46. Ding, Z.-B. *et al.* Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **68**, 9167–9175 (2008).
47. Pirtoli, L. *et al.* The prognostic role of Beclin 1 protein expression in high-grade gliomas. *Autophagy* **5**, 930–936 (2009).
48. Choi, K. S. Autophagy and cancer. *Exp. Mol. Med.* **44**, 109–120 (2012).
49. Papandreou, I., Lim, A. L., Laderoute, K. & Denko, N. C. Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell Death Differ.* **15**, 1572–1581 (2008).
50. Rouschop, K. M. A. *et al.* The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J. Clin. Invest.* **120**, 127–141 (2010).
51. Siekevitz, P. Biological membranes: the dynamics of their organization. *Annu. Rev. Physiol.* **34**, 117–140 (1972).
52. Chargaff, E. & West, R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J. Biol. Chem.* **166**, 189–197 (1946).
53. Wolf, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.* **13**, 269–288 (1967).

54. De Broe, M. E., Wieme, R. J., Logghe, G. N. & Roels, F. Spontaneous shedding of plasma membrane fragments by human cells in vivo and in vitro. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **81**, 237–245 (1977).
55. Pan, B. T. & Johnstone, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* **33**, 967–978 (1983).
56. Raposo, G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**, 1161–1172 (1996).
57. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–659 (2007).
58. Pisitkun, T., Shen, R.-F. & Knepper, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13368–13373 (2004).
59. Lässer, C. *et al.* RNA-containing exosomes in human nasal secretions. *Am. J. Rhinol. Allergy* **25**, 89–93 (2011).
60. Le Pecq, J.-B. Dexosomes as a therapeutic cancer vaccine: from bench to bedside. *Blood Cells. Mol. Dis.* **35**, 129–135 (2005).
61. Stegmayr, B. & Ronquist, G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol. Res.* **10**, 253–257 (1982).
62. Théry, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 581–593 (2009).
63. Mathivanan, S., Ji, H. & Simpson, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* **73**, 1907–1920 (2010).
64. Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579 (2002).
65. Pike, L. J. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* **44**, 655–667 (2003).
66. Skog, J. *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1470–1476 (2008).
67. Nolte-’t Hoen, E. N. M. *et al.* Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* **40**, 9272–9285 (2012).

68. Dignat-George, F. & Boulanger, C. M. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 27–33 (2011).
69. György, B. *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **68**, 2667–2688 (2011).
70. H Rashed, M. *et al.* Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
71. Huotari, J. & Helenius, A. Endosome maturation. *EMBO J.* **30**, 3481–3500 (2011).
72. Xu, J., Camfield, R. & Gorski, S. M. The interplay between exosomes and autophagy - partners in crime. *J. Cell Sci.* **131**, (2018).
73. Hurley, J. H. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 4–11 (2008).
74. Henne, W. M., Buchkovich, N. J. & Emr, S. D. The ESCRT pathway. *Dev. Cell* **21**, 77–91 (2011).
75. Colombo, M. *et al.* Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell Sci.* **126**, 5553–5565 (2013).
76. Trajkovic, K. *et al.* Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* **319**, 1244–1247 (2008).
77. Ghossoub, R. *et al.* Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat. Commun.* **5**, 3477 (2014).
78. Kowal, J., Tkach, M. & Théry, C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **29**, 116–125 (2014).
79. Savina, A., Furlán, M., Vidal, M. & Colombo, M. I. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 20083–20090 (2003).
80. Fang, D. Y., King, H. W., Li, J. Y. & Gleadle, J. M. Exosomes and the kidney: blaming the messenger. *Nephrol. Carlton Vic* **18**, 1–10 (2013).
81. Becker, A. *et al.* Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell* **30**, 836–848 (2016).
82. Rodríguez Zorrilla, S. *et al.* Exosomes in head and neck cancer. Updating and revisiting. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **34**, 1641–1651 (2019).

83. Dong, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of lncRNA-SNHG14 promotes trastuzumab chemoresistance in breast cancer. *Int. J. Oncol.* **53**, 1013–1026 (2018).
84. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
85. Bhaskaran, M. & Mohan, M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet. Pathol.* **51**, 759–774 (2014).
86. Hutvagner, G. *et al.* A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science* **293**, 834–838 (2001).
87. Ketting, R. F. *et al.* Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* **15**, 2654–2659 (2001).
88. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* **9**, 102–114 (2008).
89. Schwarz, D. S. *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199–208 (2003).
90. He, L. & Hannon, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 522–531 (2004).
91. Wu, L., Fan, J. & Belasco, J. G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4034–4039 (2006).
92. Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 259–269 (2006).
93. Croce, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 704–714 (2009).
94. Guduric-Fuchs, J. *et al.* Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics* **13**, 357 (2012).
95. Silva, J. *et al.* Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur. Respir. J.* **37**, 617–623 (2011).
96. Ciravolo, V. *et al.* Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *J. Cell. Physiol.* **227**, 658–667 (2012).
97. Landgraf, P. *et al.* A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* **129**, 1401–1414 (2007).

98. Hata, A. & Davis, B. N. Control of microRNA biogenesis by TGFbeta signaling pathway-A novel role of Smads in the nucleus. *Cytokine Growth Factor Rev.* **20**, 517–521 (2009).
99. Sempere, L. F. *et al.* Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* **5**, R13 (2004).
100. Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834–838 (2005).
101. Vagner, T. *et al.* Protein Composition Reflects Extracellular Vesicle Heterogeneity. *Proteomics* **19**, e1800167 (2019).
102. Tominaga, N. *et al.* RPN2-mediated glycosylation of tetraspanin CD63 regulates breast cancer cell malignancy. *Mol. Cancer* **13**, 134 (2014).
103. Mu, Y. *et al.* Silencing microRNA-27a inhibits proliferation and invasion of human osteosarcoma cells through the SFRP1-dependent Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biosci. Rep.* **39**, (2019).
104. Xu, C., Cheng, H., Li, N., Zhou, N. & Tang, X. Relationship between microRNA-27a and efficacy of neoadjuvant chemotherapy in gastric cancer and its mechanism in gastric cancer cell growth and metastasis. *Biosci. Rep.* **39**, (2019).
105. Xu, W. *et al.* miR-24-3p and miR-27a-3p promote cell proliferation in glioma cells via cooperative regulation of MXI1. *Int. J. Oncol.* **42**, 757–766 (2013).
106. Zhao, N. *et al.* miR-27a-3p suppresses tumor metastasis and VM by down-regulating VE-cadherin expression and inhibiting EMT: an essential role for Twist-1 in HCC. *Sci. Rep.* **6**, 23091 (2016).
107. Wu, X.-Z. *et al.* MiR-27a-3p promotes esophageal cancer cell proliferation via F-box and WD repeat domain-containing 7 (FBXW7) suppression. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 15556–15562 (2015).
108. Nakata, W. *et al.* Expression of miR-27a-3p is an independent predictive factor for recurrence in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* **6**, 21645–21654 (2015).
109. Li, L. & Luo, Z. Dysregulated miR-27a-3p promotes nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and migration by targeting Mapk10. *Oncol. Rep.* **37**, 2679–2687 (2017).

110. Su, C., Huang, D.-P., Liu, J.-W., Liu, W.-Y. & Cao, Y.-O. miR-27a-3p regulates proliferation and apoptosis of colon cancer cells by potentially targeting BTG1. *Oncol. Lett.* **18**, 2825–2834 (2019).
111. Liu, T., Tang, H., Lang, Y., Liu, M. & Li, X. MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin. *Cancer Lett.* **273**, 233–242 (2009).
112. Kong, L.-Y., Xue, M., Zhang, Q.-C. & Su, C.-F. In vivo and in vitro effects of microRNA-27a on proliferation, migration and invasion of breast cancer cells through targeting of SFRP1 gene via Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncotarget* **8**, 15507–15519 (2017).
113. Tang, W. *et al.* miR-27a regulates endothelial differentiation of breast cancer stem like cells. *Oncogene* **33**, 2629–2638 (2014).
114. Zhang, L.-Y. *et al.* MiR-27a promotes EMT in ovarian cancer through active Wnt/ β -catenin signalling by targeting FOXO1. *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers* **24**, 31–42 (2019).
115. Zhao, X., Yang, L. & Hu, J. Down-regulation of miR-27a might inhibit proliferation and drug resistance of gastric cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **30**, 55 (2011).
116. Zhou, S. *et al.* miR-27a regulates the sensitivity of breast cancer cells to cisplatin treatment via BAK-SMAC/DIABLO-XIAP axis. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **37**, 6837–6845 (2016).
117. Zhu, B. *et al.* MicroRNA-27a-3p Reverses Adriamycin Resistance by Targeting BTG2 and Activating PI3K/Akt Pathway in Breast Cancer Cells. *OncoTargets Ther.* **13**, 6873–6884 (2020).
118. Ljepoja, B., García-Roman, J., Sommer, A.-K., Wagner, E. & Roidl, A. MiRNA-27a sensitizes breast cancer cells to treatment with Selective Estrogen Receptor Modulators. *Breast Edinb. Scotl.* **43**, 31–38 (2019).
119. Ren, Y., Fu, F. & Han, J. MiR-27a modulates radiosensitivity of triple-negative breast cancer (TNBC) cells by targeting CDC27. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **21**, 1297–1303 (2015).
120. Zaborowski, M. P., Balaj, L., Breakefield, X. O. & Lai, C. P. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience* **65**, 783–797 (2015).
121. Laird-Fick, H.S.; Tokala, H.; Kandola, S.; Kehdi, M.; Pelosi, A.; Wang, L.; Grondahl, B. Early Morphological Changes in Cardiac 447 Mitochondria after Subcutaneous Administration of

- Trastuzumab in Rabbits: Possible Prevention with Oral Selenium Supple- 448 mentation. *Cardiovasc Pathol* **2020**, *44*, 107159, doi:10.1016/j.carpath.2019.107159.
122. Gorini, S.; De Angelis, A.; Berrino, L.; Malara, N.; Rosano, G.; Ferraro, E. Chemotherapeutic Drugs and Mitochondrial Dysfunc- 450 tion: Focus on Doxorubicin, Trastuzumab, and Sunitinib. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, *2018*, 7582730, doi: 10.1155/2018/7582730.
123. Pecoraro, M.; Pinto, A.; Popolo, A. Trastuzumab-Induced Cardiotoxicity and Role of Mitochondrial Connexin43 in the Adaptive 452 Response. *Toxicol In Vitro* **2020**, *67*, 104926, doi: 10.1016/j.tiv.2020.104926.