



Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di dottorato di ricerca in PATOLOGIA OSTEONCOLOGICA

XXV ciclo anno 2010

Titolo tesi

RUOLO DELL'INTEGRINA $\alpha 5$ COME POTENZIALE TARGET TERAPEUTICO NELLE METASTASI OSSEE DA NEOPLASIA MAMMARIA

Francesco Pantano

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Giuseppe Tonini

Tutore

Chiar.mo Prof. Daniele Santini

8 luglio 2013

INDICE

1. BACKGROUND

1.1 INTRODUZIONE

1.2 STRUTTURA

1.3 SIGNALLING BIDIREZIONALE

1.4 SEGNALE INTEGRINICO E CELLULE STAMINALI TUMORALI.

1.5 SEGNALE INTEGRINICO NEL MICROAMBIENTE TUMORALE

1.6 CELLULE PERIVASCOLARI

1.7 CELLULE DI DERIVAZIONE MIDOLLARE

1.8 LE PIASTRINE

1.9 COOPERAZIONE DEL SEGNALE INTEGRINICO CON L'ATTIVITÀ DEGLI
ONCOGENI

1.10 CROSSTALK DEL SEGNALE INTEGRINICO CON CITOCHINE AGENTI
COME FATTORI DI CRESCITA

1.11 EGF E I SUOI RECETTORI

1.12 HGF E RECETTORI

1.13 TGFB E RECETTORI

1.14 VEGF, FGF E LORO RECETTORI

1.15 LE INTEGRINE COME BERSAGLI PER LA TERAPIA DEL CANCRO

1.16 IL RUOLO DEL SEGNALE INTEGRINICO NELLA RESISTENZA A
TRATTAMENTI ANTITUMORALI

1.17 INTEGRINA $\alpha 5\beta 1$

1.18 TUMORI DEL COLON

1.19 TUMORI OVARICI

1.20 TUMORI AL SENO

1.21 TUMORI DEL POLMONE

1.22 GLIOMA

1.23 MELANOMA

1.24 INTEGRINA $\alpha 5\beta 1$ ANTAGONISTI

1.25 MOLECOLE RGD-SIMILI

1.26 PEPTIDI NON RGD-SIMILI

1.27 METASTASI OSSEE DA NEOPLASI MAMMARIA. EPIDEMIOLOGIA

1.28 INTEGRINA $\alpha 5\beta 1$ NEL PROCESSO DI METASTATIZZAZIONE OSSEA

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

3. PAZIENTI E METODI

3.1 ANALISI DI DATASETS PUBBLICI DI ESPRESSIONE GENICA

3.2 PAZIENTI DELLA FASE SPERIMENTALE

3.3 ANALISI QRT-PCR

3.4 LINEA CELLULARE

3.5 ANTICORPO

3.6 SAGGI DI ADESIONE

3.7 SAGGI DI MIGRAZIONE

3.8 SAGGI DI INVASIONE

3.9 SILENZIAMENTO STABILE

3.10 ANALISI DEL CICLO CELLULARE

3.11 SAGGIO DI FORMAZIONE MAMMOSPHERE

3.12 MODELLI IN VIVO

3.13 ANALISI STATISTICA

4. RISULTATI

4.1 ANALISI UNIVARIATA DELLA SOPRAVVIVENZA NEGLI STUDI DI MICROARRAY

4.2 FASE SPERIMENTALE: ESPRESSIONE DI $\Delta 5$ E CARATTERISTICHE CLINICO-PATOLOGICHE IN PAZIENTI AFFETTE DA NEOPLASIA MAMMARIA

4.3 CORRELAZIONE TRA DATI CLINICO-PATOLOGICI E SOPRAVVIVENZA LIBERA DA MALATTIA SCHELETRICA (SDFS) (ANALISI UNIVARIATA)

4.4 CORRELAZIONE TRA ESPRESSIONE DI RANK E SOPRAVVIVENZA LIBERA DA MALATTIA SCHELETRICA (SDFS) (ANALISI UNIVARIATA)

4.5 ANALISI MULTIVARIATA

4.6 MODELLI IN VIVO

4.7 SILENZIAMENTO STABILE DEL GENE E ANALISI DELL' EFFICIENZA DI FORMAZIONE DI MAMMOSFERE

5. DISCUSSIONE

6. RINGRAZIAMENTI

7. BIBLIOGRAFIA

1. BACKGROUND

1.1 INTRODUZIONE

Le integrine appartengono a una famiglia di recettori eterodimerici transmembrana che mediano aderenze stabili tra le cellule e il loro ambiente extracellulare. Tali strutture biologiche appaiono nel corso dell'evoluzione per la prima volta a partire dal metozoico e probabilmente anche prima dell'esplosione cambriana e rappresentano requisito per la multicellularità, permettendo l'adesione delle cellule a membrane basali fattore essenziale per lo sviluppo di organismi multistrato^{1,2}. La loro scoperta risale a circa 30 anni fa quando il termine integrina è stato utilizzato per la prima volta da Richard O. Hynes, un biologo cellulare britannico. Il termine integrina riflette il ruolo di queste proteine integrali di membrana nel mantenimento dell'integrità delle connessioni tra il citoscheletro e la matrice extracellulare^{2,3}. Questi recettori di adesione collegano il citoscheletro alle componenti della matrice extracellulare, fra i quali laminina, collagene, fibronectina, vitronectina e fibrinogeno⁴. Attualmente sono state identificate 18 subunità α e 8 subunità β nelle cellule di mammifero. Nonostante potenzialmente in grado di formare un numero considerevole di eterodimeri, la selettività di molte subunità α nella loro associazione con una singola subunità β limita la famiglia di recettori a solo 24 paia eterodimeri unici. La specificità di ligando e studi su topi knockout indicano che ciascun integrina ha una funzione unica e non ridondante². Le integrine sono composte da una subunità α e una β , entrambe le quali sono proteine transmembrana a singolo passaggio legate insieme non covalentemente attraverso grandi ectodomini. Studi funzionali dimostrano che le subunità delle integrine troncate che mancano di dominio transmembrana o citoplasmatico riescono ancora a costituire eterodimeri⁵. Molti domini citoplasmatici hanno varianti di splicing alternativo e, con l'eccezione della subunità β_4 , tutti sono relativamente brevi⁶.

1.2 STRUTTURA

In termini strutturali semplici, le integrine sono costituite da una testa globulare extracellulare formata da due subunità dalle quale si estendono due porzioni che penetrano la membrana plasmatica. Entrambe le subunità α e β sono caratterizzate da un ampio numero di legami disolfuro. L'ectodominio di ogni subunità risulta essere strutturalmente complesso. A livello N-terminale, tutte le subunità α contengono sette ripetizioni di segmenti ricchi in cisteina ripiegate in una struttura tipo "seven-blade β -elica"⁷. Questo dominio costituisce la porzione più grande del dominio della testa della

subunità α e media l'interazione con la subunità β ⁸. La subunità α contiene un inserto I o dominio del fattore di von Willebrand A, che è posizionato all'interno della β -elica⁹. Questo dominio consta di 200 aminoacidi in lunghezza e ospita un catione bivalente (Mg^{++}) legato da tre anelli di struttura secondaria aminoacidica, che costituiscono il sito di metal ion dependent adhesion site (MIDAS)¹⁰. Il MIDAS è critico per il legame del metallo e, quindi, per la funzione delle integrine, dal momento che cationi bivalenti sono universalmente richiesti per il legame delle integrine con i loro ligandi⁸. Le subunità β sono strutturalmente più complesse. La testa della subunità β consiste di un dominio PSI (plexin / semaphorin / integrine), un dominio ibrido, e un dominio I β . Il dominio I β è situato nel dominio PSI, che si trova all'interno del dominio ibrido. Lungo circa 240 aminoacidi, questo dominio I β altamente conservato è analogo al dominio α I, ma è composto da due segmenti complementari: il specificity-determining loop (SDL) coinvolto nel legame con il ligando e un dominio di interfaccia che interagisce con la β elica della subunità α ⁸. Il dominio I β contiene un sito MIDAS che lega residui carichi negativamente, che a loro volta legano il Mg^{++} nel dominio I α ¹⁰. Esistono due siti di legame di metallo adiacenti denominati synergistic metal ion binding site (SynMBS) e adjacent to metal ion-dependent adhesion site (ADMIDAS) ed entrambi legano Ca^{++} ⁸.

1.3 SIGNALLING BIDIREZIONALE

Gli ectodomini integrinici sono ritenuti essere in equilibrio tra tre stati conformazionali: conformazione piegata con un "headpiece" chiuso, conformazione estesa con "headpiece" chiuso, e conformazione estesa con un "headpiece" aperto. Tali conformazioni corrispondono all'incirca funzionalmente rispettivamente a integrina a bassa affinità, attivata, attivata e legata al ligando¹². Nella conformazione chiusa, l'ectodominio della integrina è piegato e giustapposto alla membrana plasmatica. Questa conformazione è stabilizzata debolmente dalle interazioni tra le subunità α e β ^{10,13}. Cambiamenti conformazionali che producono la destabilizzazione di queste interazioni possono essere indotte a seguito dell'associazione di molecole effettrici che collegano l'integrina al citoscheletro cellulare, quali Talin. Anche mutazioni della coda citoplasmatica possono destabilizzare la conformazione ripiegata^{11,14-16}. Questi eventi provocano la separazione delle gambe all'interno del segmento transmembrana, estensione della testa in un movimento simile all'apertura di un coltello a serramanico e l'esposizione del dominio ibrido¹⁰. Questo cambiamento conformazionale attiva l'integrina favorendo il legame con il proprio ligando. Il concetto di attivazione integrinica è considerato come un segnale "inside-outside", dato che eventi intracellulari inducono cambiamenti conformazionali degli ectodomini integrinici per facilitare il legame del ligando¹². In subunità α che

esprimono il dominio I, questa struttura funziona come il principale dominio di legame, mentre il dominio I β regola l'attività di legame del dominio I α . In integrine prive del dominio I α il dominio I β dominio MIDAS si lega direttamente al ligando. Durante adesione o la migrazione cellulare, forze di trazione trasmesse da una integrina ancorata al suo ligando sono controbilanciate dal citoscheletro e da molecole associate adattatrici legate alla coda citoplasmatica. Si forma così una resistenza che favorisce una conformazione estesa su posizioni piegate o chiuse¹⁰. L'affinità di legame col proprio ligando e l'adesività delle integrine sono generalmente migliorate da concentrazioni crescenti di Mn^{++} extracellulare e concentrazioni decrescenti di Ca^{++} extracellulare¹⁰. Il legame con grandi ligandi multivalenti promuove l'associazione laterale di eterodimeri integrinici in oligomeri sulla superficie cellulare, evento noto come clustering. La conseguente stretta vicinanza dei domini citoplasmatici determina il reclutamento di chinasi e l'attivazione di cascate di segnalazione intracellulare, spesso indicate come vie di segnale outside-in di segnalazione¹². La capacità di segnalazione bidirezionale intrinseca alle integrine conduce ad una vasta gamma di conseguenze biologiche. Per esempio, la segnalazione inside-outside è critica per esercitare la forza adesiva tra integrine e il loro ambiente extracellulare, permettendo il trasferimento della forza di trazione necessaria per l'adesione cellulare mediata dalle integrine e per il rimodellamento della matrice extracellulare. Il segnale outside-inside, invece, conduce all'attivazione di cascate di segnalazione coinvolte in processi cellulari quali l'organizzazione del citoscheletro, l'espressione genica, e la differenziazione cellulare. Pur essendo processi distinti, queste due direzioni di segnalazione delle integrine sono strettamente legate e spesso convergono su processi cellulari complessi, di cui un esempio chiave sono il coordinamento della motilità cellulare e la modulazione della capacità proliferativa e di sopravvivenza.

Le integrine espresse sulle cellule tumorali contribuiscono alla progressione tumorale e al processo di metastatizzazione aumentando la migrazione cellulare, l'invasione, la proliferazione e la sopravvivenza (vedi figura). L'adesione alla matrice extracellulare (ECM) mediata dalle integrine fornisce la trazione necessaria per la capacità invasiva della cellula tumorale. Le integrine contribuiscono anche alla capacità invasiva delle cellule tumorali regolando la localizzazione e l'attività di proteasi specifiche, come la metalloproteasi di matrice 2 (MMP2) e l'urochinasi del plasminogeno (uPA). La migrazione integrina-mediata richiede generalmente il segnale mediato dalle chinasi di adesione focale (FAK)-famiglia delle chinasi Src (SFK). Tuttavia, esistono meccanismi integrina-specifici nelle vie di segnalazione che regolano la motilità cellulare. Per esempio, in cellule di neuroblastoma anche se l'integrina $\alpha 5\beta 1$ utilizza l'attivazione FAK-mediata di Src, l'integrina $\alpha 4\beta 1$ attiva Src attraverso un meccanismo FAK-indipendente¹⁷. Alcune

integrine inibiscono la motilità delle cellule tumorali, dal momento che la delezione dell'integrina $\beta 1$ (Itgb1) è in grado di incrementare la diffusione di cellule tumorali in modelli murini di neoplasia pancreaticata spontanea¹⁸. Anche la regolazione del "recycling" delle integrine è fondamentale per l'invasività delle cellule tumorali. Le Rab GTPasi sono in grado di relocalizzare le integrine lungo il fronte principale di invasione tumorale¹⁹. Oltre al loro ruolo ben definito nella migrazione e nell'invasione, le integrine regolano anche la proliferazione. Il legame integrinico controlla l'espressione di proteine chiave del ciclo cellulare, tra cui ciclina D1²⁰ e la "cyclin-dependent kinase inhibitor family", che regolano l'entrata in fase S del ciclo cellulare²¹. Nonostante il controllo della proliferazione cellulare adesione-dipendente sia deregolato nelle cellule tumorali e la crescita ancoraggio-indipendente sia un segno distintivo di trasformazione maligna, le integrine hanno anche un ruolo importante nel modulare la crescita tumorale^{22, 23}. Ulteriori ricerche sono necessarie per determinare i meccanismi con cui le integrine continuano a regolare la proliferazione delle cellule tumorali.

1.4 SEGNALE INTEGRINICO E CELLULE STAMINALI TUMORALI

E' stato dimostrato inoltre un ruolo del segnale integrinico nella modulazione del fenotipo staminale delle cellule tumorali.

Le cellule staminali tumorali rappresentano un sottoinsieme di cellule nel tumore primario ad alto potenziale oncogeno. Recenti evidenze hanno sottolineato il ruolo delle integrine come marcatori di popolazioni di cellule staminali sia normali che tumorali.

In particolare, l'integrina $\alpha 3 \beta 3$ rappresenta un marcatore di cellule progenitrici luminali nell'epitelio²⁴ duttale mammario. In un modello murino di tumorigenesi mammaria spontanea, espressione del proto-oncogene Wnt1 è in grado di promuovere l'espansione della popolazione di cellule progenitrici luminali, all'interno delle quali il marcatore luminale integrina $\beta 3$ (noto anche come CD61) è in grado di discriminare una sottopopolazione di cellule staminali a più elevato potenziale oncogenico. Il segnale mediato dalle integrine sembra incrementare la popolazione di cellule staminali del cancro nei tumori, come ablazione di Ptk2 (che codifica FAK) diminuisce il pool di cellule staminali tumorali^{25,26}. Inoltre, le integrine possono "upregolare" l'espressione di marcatori specifici delle cellule staminali tumorali, come il CD44.²⁷

1.5 SEGNALE INTEGRINICO NEL MICROAMBIENTE TUMORALE

Oltre al loro ruolo nelle cellule tumorali, le integrine sono anche importanti per la risposta cellulare dell'ospite nei confronti del cancro. Cellule endoteliali, fibroblasti, periciti, cellule

derivate dal midollo osseo, cellule infiammatorie e piastrine usano tutte specifiche integrine per varie funzioni, tra angiogenesi, desmoplasia e risposta immunitaria. Oltre alle integrine espresse sulle cellule tumorali, le integrine presenti su molti di questi tipi cellulari possono rappresentare potenziali bersagli terapeutici.

L'angiogenesi. Il contributo dell'angiogenesi alla progressione del tumore è ben consolidato e il ruolo delle integrine è stato recentemente oggetto di intenso interesse²⁵. I vasi sanguigni tumore-associati sono strutturalmente e biologicamente distinti da vasi non tumore-associati, ed è stato dimostrato che, i vasi associati al tumore esprimono alti livelli di integrina $\alpha v\beta 3$ ²⁶. È possibile che una maggiore espressione di integrine $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$ consenta alle cellule endoteliali angiogeniche di legare le proteine della matrice come vitronectina, fibrinogeno, fattore di von Willebrand, osteopontina e fibronectina che si depositano nel microambiente tumorale. Attraverso la delezione genetica, o il trattamento con antagonisti integrinici, diverse altre integrine sono state identificate come cruciali per l'angiogenesi, tra cui $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$ ²⁵. La cooperazione dell'integrine con particolari recettori di fattori di crescita sembra incrementare la risposta a specifici fattori di crescita angiogenici che sono altamente espressi nei tumori. Ad esempio, l'interazione fra $\alpha v\beta 3$ e FGFR induce angiogenesi, e quella fra $\alpha v\beta 5$ e VEGFR2 promuove l'angiogenesi VEGF-indotta²⁸.

1.6 CELLULE PERIVASCOLARI

L'angiogenesi dipende non solo dall'endotelio ma richiede anche cellule perivascolari, come periciti e cellule muscolari lisce vascolari, che si associano allo sviluppo dell'endotelio e promuovono la maturazione del vaso sanguigno. I tumori in genere esprimono vasi sanguigni immaturi con ridotta copertura perivascolare²⁹. Questo porta a vasi tortuosi e gravati da notevole "leakage", che spiegano gran parte della scarsa perfusione tipicamente osservata nei tumori. Le integrine regolano l'interazione tra cellule endoteliali e la membrana basale vascolare, e studi recenti suggeriscono che l'integrina $\alpha 4\beta 1$ sulle cellule endoteliali è necessaria per una interazione con la molecola di adesione VCAM1 sui periciti, con conseguente stabilizzazione dell'interazione cellula endoteliale-pericita³⁰. Recenti studi hanno indicato un ruolo importante dei periciti nel regolare il flusso e la pervietà dei vasi peritumorali³¹, la manipolazione delle quali può migliorare il delivery dei farmaci chemioterapici.

Desmoplasia. L'abbondante deposizione di collagene è una delle caratteristiche cardine della reazione desmoplastica sia nei tumori primari che nelle loro metastasi. Attraverso il segnale mediato dalle integrine il collagene depositato aumenta la proliferazione cellulare tumorale, la sopravvivenza e la chemioresistenza³². Inoltre le integrine espresse sui

fibroblasti stromali contribuiscono alla crescita del tumore. L'integrina $\alpha 11$ è comunemente overespressa nei fibroblasti che sono associati al carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC). L'espressione di $\alpha 11\beta 1$ sui fibroblasti aumenta la crescita del tumore, stimolando il rilascio di insulina-like growth factor 2 (IGF2)³³.

1.7 CELLULE DI DERIVAZIONE MIDOLLARE

E' stato dimostrato che cellule circolanti di derivazione midollare possono essere reclutate dai tumori solidi all'interno dei quali possono sopprimere la crescita del tumore o secernere fattori di crescita pro-angiogenici e citochine che contribuiscono alla progressione del tumore. Le cellule immunitarie, compresi i macrofagi e le cellule natural killer, sono fondamentali per la soppressione del tumore. Ad esempio, l'infiltrazione macrofagica tumorale è diminuita nei topi $\beta 3^{-/-}$ e ciò contribuisce ad aumentare il volume tumorale, dimostrando che l'espressione di integrine $\alpha v\beta 3$ sui macrofagi è importante per la loro azione antitumorale³⁴. Alternativamente, la presenza di cellule derivate dal midollo osseo all'interno del tumore può risultare in un incremento della progressione tumorale aumentando l'angiogenesi. Cellule del midollo osseo che esprimono una integrina $\beta 3$ mutante funzionalmente inattiva non riescono ad essere reclutate nei siti di neovascolarizzazione, con conseguente diminuzione dell'angiogenesi patologica³⁵. L'homing di precursori endoteliali e dei monociti dal tumore richiede anche l'integrina $\alpha 4\beta 1$ ³⁶. L'espressione dell'integrina $\alpha 4\beta 1$ sulle cellule di derivazione midollare favorisce l'adesione all'endotelio tumore-associato, mentre il blocco di integrina $\alpha 4\beta 1$ riduce la densità dei vasi sanguigni^{36,37}. Non è chiaro se il blocco del "tumor-homing" delle cellule derivate dal midollo osseo rappresenta una valida strategia terapeutica dato che i loro effetti tumore-soppressivi possono superare il loro potenziale pro-angiogenico.

1.8 LE PIASTRINE

Molteplici studi hanno collegato le interazioni cellula tumorale-piastrine con l'aumento della capacità metastatica. Il fibrinogeno, infatti, è in grado di fare da ponte tra le integrine $\alpha 11\beta 3$ sulle piastrine e le integrine $\alpha v\beta 3$ sulle cellule tumorali. Questa interazione facilita l'arresto delle cellule tumorali nel sistema vascolare, facilitando le metastasi ai vari siti, compreso il midollo osseo³⁸⁻⁴⁰. Il blocco combinato dell'integrina $\alpha v\beta 3$ tumorale e integrina $\alpha 11\beta 3$ piastrinica produce un aumento degli effetti anti-angiogenici e anti-tumorali rispetto al blocco singolo di una delle due integrine⁴¹, suggerendo che gli antagonisti che mirano a entrambe le integrine potrebbero avere una maggiore efficacia clinica nei pazienti.

1.9 COOPERAZIONE DEL SEGNALE INTEGRINICO CON L'ATTIVITÀ DEGLI ONCOGENI

Sebbene le integrine non hanno la capacità di trasformare cellule, e quindi non funzionano come oncogeni, diverse integrine possono cooperare con oncogeni o recettori tirosin-chinasici durante la tumorigenesi. Nei modelli spontanei murini di tumorigenesi, l'integrina $\alpha 6\beta 4$ si è dimostrata in grado di cooperare con ERBB2 nell'aumentare le capacità invasive del tumore mammario⁴². Sembra che ci sia qualche specificità nella capacità delle integrine di effettuare crosstalk con particolari oncogeni, come ad esempio il segnale integrinico attraverso FAK è richiesto per l'oncogenesi Ras e PI3K mediata^{43,44}, mentre per tumorigenesi indotta da ERBB2 è richiesta l'integrina $\alpha 6\beta 4$. In un altro esempio, studi in vitro ed in vivo hanno dimostrato che l'integrina $\alpha 5\beta 3$ sinergizza con l'oncogene SRC per aumentare il potenziale tumorigenico⁴⁵. Questi studi suggeriscono che alcuni oncogeni dipendono dal signalling integrinico, una proprietà che potrebbe potenzialmente essere sfruttata terapeuticamente.

1.10 CROSSTALK DEL SEGNALE INTEGRINICO CON CITOCHINE AGENTI COME FATTORI DI CRESCITA

Crescenti evidenze supportano un ruolo centrale per la segnalazione di cooperazione tra integrine, recettori dei fattori di crescita e recettori delle citochine in molti aspetti della progressione tumorale. Il crosstalk integrinico non solo regola l'adesione cellulare, la migrazione, l'invasione e sopravvivenza, ma anche influisce su molti aspetti della risposta dell'ospite al cancro. Tuttavia, non tutti i crosstalk sono pro-cancerogeni, dal momento che alcune integrine possono inibire la tumorigenesi indotta da alcuni oncogeni⁴⁶. In alcuni casi il segnale di cooperazione, eventualmente mediato dalla formazione di un complesso recettore del fattore di crescita-integrina⁴⁷⁻⁵⁰, potenzia l'attivazione di chinasi a valle come MAPK⁵¹ o AKT⁵² e incrementa quindi la migrazione e la sopravvivenza cellulare. In altri esempi, integrine e fattori di crescita o recettori delle citochine regolano reciprocamente l'espressione di superficie gli uni degli altri⁵³⁻⁶², o il legame con il loro ligando specifico^{63,64}. Oltre a questi meccanismi generali, studi recenti hanno chiarito altri modelli di crosstalk che potrebbero avere importanti implicazioni per il processo di metastatizzazione e l'acquisizione di resistenza ai farmaci.

1.11 EGF E I SUOI RECETTORI

I membri della famiglia del fattore di crescita epidermico (EGF) recettore, tra cui EGFR e ERBB2, contribuiscono alla formazione di diversi tipi di tumore, compresi quello al seno e al pancreas. Nelle cellule tumorali, la cooperazione tra integrine e membri della famiglia dei recettori EGF influenza molti aspetti della progressione del tumore, tra cui l'iniziazione, la proliferazione, la migrazione e l'invasione. L'integrina $\alpha 6\beta 4$ risulta essere particolarmente importante per la formazione tumorale specialmente nel sottogruppo di pazienti con neoplasia mammaria che esprimono alti livelli di ERBB2 dal momento che quest'ultimo coopera con integrina $\alpha 6\beta 4$ nella sua attività pro-oncogenica⁴². Questo effetto cooperativo sembra essere dovuto alla formazione di un complesso integrina $\alpha 6\beta 4$ -ERBB2 che aumenta l'attivazione di STAT3 portando alla perdita della polarità cellulare e iperproliferazione. Inoltre, questi studi hanno trovato che il silenziamento del gene $\beta 4$ è in grado di aumentare l'efficacia di terapie mirate ERBB2-specifiche, mettendo in evidenza l'importanza potenziale della terapia di combinazione con antagonisti integrinici e membri della famiglia del recettore EGF. Nel cancro del pancreas, la via EGF è spesso iperattiva. EGF stimola la migrazione delle cellule del tumore pancreatico sulla vitronectina in vitro e le metastasi in vivo⁶⁵⁻⁶⁷, e questi effetti richiedono integrina $\alpha \nu \beta 5$. Inoltre, $\alpha \nu \beta 5$ richiede l'attivazione EGF-dipendente di Src per la sua capacità di mediare la migrazione cellulare. Pertanto, il segnale EGF nelle cellule tumorali può aumentare la capacità di particolari integrine di mediare la migrazione e la sopravvivenza delle cellule, con conseguente aumento del potenziale metastatico. Inoltre, l'attivazione integrinica può indurre fosforilazione di EGFR indipendentemente da legame con EGF, con conseguente aumento dell'attivazione di MAPK e della proliferazione e sopravvivenza delle cellule tumorali⁷¹ attraverso un pathway SRC-p130Cas mediato⁷². La capacità delle integrine di aumentare il segnale di EGFR può essere particolarmente importante in seno a quei tumori che esprimono alti livelli di ERBB2. Un recente studio ha trovato che il segnale integrinico aumenta il clustering EGF e ERBB2 in cellule di cancro al seno, con conseguente resistenza all'inibitore ERBB2 trastuzumab⁶³. L'inibizione integrinica ha dimostrato di revertire la resistenza a trastuzumab, suggerendo che questo approccio combinato può rivelarsi terapeuticamente efficace nelle neoplasie esprimenti ERBB2.

1.12 HGF E RECETTORI

Il fattore di crescita degli epatociti (HGF) ed il suo recettore MET sono implicati nei processi di iniziazione e di metastasi di vari tipi di cancro. L'integrina $\beta 4$ sinergizza con il MET per aumentare la trasformazione dei fibroblasti e aumentare il loro potenziale

tumorigenico⁷⁵. Nelle cellule di cancro al seno, HGF aumenta la crescita ancoraggio-indipendente inducendo la fosforilazione di integrina $\beta 4$, con conseguente reclutamento di proteine come Shp2 (nota anche come PTPN11) e la successiva attivazione di Src e ERK 101. Formazione di complessi tra MET e integrina $\alpha 6\beta 4$ incrementa il segnale HGF-indotto, aumentando le capacità invasive tumorali⁵⁰. Inoltre, MET collabora con altre integrine, come l' integrina $\alpha \beta 5$ controllando l'espressione dei geni HGF indotti necessari per la migrazione cellulare⁷⁶. Il crosstalk Integrina-MET è anche indirettamente regolato da altre molecole. Ad esempio, la tetraspanina CD82 sopprime l'attivazione integrina-mediata di MET con conseguente riduzione dell'invasività delle cellule tumorali⁷⁷.

1.13 TGFB E RECETTORI

Anche se generalmente noto per i suoi effetti antiproliferativi, il fattore di crescita trasformante- β (TGF β) è un induttore ben noto di trasformazione epitelio-mesenchimale (EMT) nelle cellule tumorali. Le integrine sono strumentali all'attivazione del segnale TGF β . Il TGF $\beta 1$ è stato identificato come un ligando per l'integrina $\alpha \beta 6$, e l'espressione di integrine $\alpha \beta 6$ regola l'attivazione TGF $\beta 1$ ⁷⁸. È ormai noto che diverse integrine α possono legare il motivo RGD di TGF $\beta 1$ ⁷⁹. In tumori come il carcinoma basocellulare, l'aumento di espressione di integrina $\alpha \beta 6$ correla con malattia aggressiva, forse a causa di una maggiore attivazione TGF $\beta 1$ ⁸⁰. Il signalling integrinico può modulare anche direttamente le risposte TGF β . L' Integrina $\alpha \beta 3$ e Src cooperano con TGF β per indurre EMT in cellule⁸³ epiteliali mammarie, e questo richiede la fosforilazione Src-dipendente del recettore di tipo 2 TGF β (TGFBR2)⁸⁴. Inoltre, la stimolazione TGF β induce la fosforilazione del dominio citoplasmatico dell'integrina $\beta 1$ con conseguente aumento delle capacità invasive delle cellule tumorali⁸⁵. Dal momento che TGF β è prevalentemente secreto dalle cellule stromali del tumore, il crosstalk tra integrine e TGF β può avere un ruolo importante nel contributo dello stroma del tumore alla progressione del cancro.

1.14 VEGF, FGF E LORO RECETTORI

Il crosstalk fra fattori di crescita e integrine si verifica non solo sulle cellule tumorali, ma ha anche un ruolo in vari tipi di cellule ospiti, comprese le cellule endoteliali, in cui contribuisce all'angiogenesi tumorale. Durante l'angiogenesi, sia integrine che fattori di crescita sono vitali per la migrazione, la proliferazione e sopravvivenza delle cellule endoteliali. Pertanto, un notevole sforzo è stato fatto per identificare specifiche interazioni funzionali tra i singoli integrine e recettori per fattori di crescita. Infatti, è stato descritto

che diverse coppie integrina-fattore di crescita contribuiscono all'angiogenesi attraverso diverse vie di segnalazione. FGFR coopera con integrina α v β 3 per aumentare la fosforilazione di Raf a livello di ser338 e ser339 attraverso PAK con conseguente formazione del complesso Raf-ASK1 (noto anche come MAP3K5) nei mitocondri, inibendo così la via intrinseca di apoptosi¹³. Per contro, VEGFR2 coopera con integrina α v β 5, portando alla fosforilazione Src-dipendente di Raf a livello di Tyr340 e Tyr341 conducendo infine ad una resistenza apoptosi che è indotta da mediatori infiammatori come il fattore di necrosi tumorale (TNF). Questo sottolinea l'importanza di Raf durante l'angiogenesi tumorale e documenta come distinte coppie di fattori di crescita-integrina possono influenzare in modo differenziale le vie di sopravvivenza delle cellule endoteliali. Ulteriori esempi di cross talk tra VEGFR2 e integrine α v sono stati descritti in cellule endoteliali vascolari. Ad esempio, l'attivazione di VEGFR2 promuove il crosstalk con integrina α v β 3, e la fosforilazione Src-dipendente del dominio cito-plasmatico di integrina β 3⁸⁶. Questo può essere correlato ad un aumento dei livelli di VEGFR2 in topi β 3^{-/-} che porta a un aumento compensatorio della angiogenesi. Un altro meccanismo attraverso il quale VEGF influenza il segnale di integrina α v β 3 è attraverso la regolazione dello stato di affinità o di attivazione dell' integrina⁸⁸. L' attivazione dell' integrina α v β 3 può a sua volta aumentare la secrezione da parte delle cellule tumorali di VEGF, fornendo una retroazione con conseguente aumento della crescita tumorale. Specifiche coppie di integrina-fattore di crescita sono stati individuate nella angiogenesi FGF-mediata. Integrina β 4 contribuisce all'angiogenesi FGF-mediata, dal momento che una delezione mirata della porzione di segnale del dominio citoplasmatico dell'integrina β 4 causa una riduzione della angiogenesi indotta da FGF e una riduzione del volume tumorale⁸⁹. CXCR4. Anche se più caratterizzato per il suo ruolo nel reclutamento di cellule ematopoietiche verso siti di lesione o infezione, il recettore della chemochina CXCR4 è anche espresso su cellule tumorali. Il legame di CXCR4 al suo ligando (sdf1; anche noto come CXCL12) induce la migrazione delle cellule tumorali e contribuisce alla metastasi. La stimolazione attraverso sdf1 di CXCR4 sulle cellule tumorali aumenta l'espressione di integrine, quali α 5 β 1 e α v β 3, aumentando l'adesione cellulare e l'invasione in vitro^{60,61} e metastasi in vivo vivo⁹⁰. Oltre ad aumentare l' espressione delle integrine, sdf1 controlla l'adesione anche aumentando l'attivazione integrinica⁹¹.

1.15 LE INTEGRINE COME BERSAGLI PER LA TERAPIA DEL CANCRO

L'espressione delle integrine in diversi tipi di cellule che sono coinvolte nella progressione del tumore e la loro capacità di crosstalk con i recettori di fattore di crescita le ha rese attraenti bersagli terapeutici. Studi preclinici hanno dimostrato che gli antagonisti di

integrina inibiscono la crescita del tumore colpendo sia le cellule tumorali che le cellule associate al tumore, in particolare l'endotelio neoformato. Gli antagonisti integrinici attualmente valutati in studi clinici includono anticorpi monoclonali e peptidi mimetici RGD. Anni di studi preclinici e sperimentazioni cliniche iniziali sono culminati con l'avvio di una sperimentazione clinica di Fase III nel glioblastoma con il peptide mimetico RGD Cilengitide.

1.16 IL RUOLO DEL SEGNALE INTEGRINICO NELLA RESISTENZA A TRATTAMENTI ANTITUMORALI

L'interazioni integrina-ligando della matrice extra cellulare (ECM) sembra essere un fenomeno generale coinvolto nella sopravvivenza cellulare e nei meccanismi di resistenza ad agenti chemoterapici e si verifica in diversi tipi di tumori solidi compresi seno, polmone, prostata, ovaio, pancreas e colon, nonché in neoplasie ematologiche. E' stato dimostrato, infatti, in linee cellulari di carcinoma mammario MDA-MB-231, che l'attivazione della subunità integrinica $\beta 1$ inibisce l'apoptosi indotta da agenti chemioterapici ampiamente usati nella terapia del tumore della mammella come paclitaxel e vincristina¹¹⁹. E' stato dimostrato, infatti che l' "attachment" di cellule MDA-MB-231 alla fibronectina e al collagene di tipo I rispettivamente mediante le integrine $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$, è in grado di ridurre significativamente l'apoptosi indotta da questi farmaci antitumorali. L'effetto protettivo del segnale prodotto dall'integrina $\beta 1$ in queste cellule tumorali è mediato attraverso l'attivazione della pathway PI3-kinase/AKT, che limita la down-regulation dei livelli di proteine Bcl-2 inibendo così il rilascio del citocromo c dai mitocondri. Questi risultati indicano che l'integrina $\beta 1$ inibisce l'apoptosi indotta da farmaci agendo a livello dei mitocondri. Inoltre, laminina e fibronectina hanno dimostrato di proteggere le cellule MDA-MB-231 e cellule A549 di neoplasia polmonare dall'apoptosi indotta anche da radiazioni¹²¹. Più recentemente è stato dimostrato che la resistenza delle cellule di carcinoma mammario ErbB2-positive ad agenti anti-Erb2 può essere superata interrompendo l'adesione cellulare¹²². Infatti l'adesione delle cellule di cancro al seno umane Erb2-positive a laminina-5 è in grado di fornire una significativa resistenza al trastuzumab e lapatinib, rispettivamente un anticorpo e una piccola molecola, che hanno come bersaglio ErbB2. Tale effetto risulta mediato dalle integrine $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$ attivando vie di segnalazione a valle come AKT, ERK1/2 e FAK. Un altro studio ha riportato che l'espressione delle integrine $\beta 1$ è inversamente correlata alla sensibilità di neoplasie mammarie HER-2-positive al trattamento con trastuzumab, suggerendo che l'integrina $\beta 1$ è un potenziale biomarcatore predittivo di risposta a trastuzumab in tumori HER-2-positivi in fase metastatica¹²⁴. ErbB-2 è in grado inoltre di mediare l'upregulation

trascrizionale del recettore $\alpha 5\beta 1$ per fibronectina, e l'adesione alla fibronectina promuove la sopravvivenza delle cellule in diverse condizioni tra cui l'ipossia, mancanza di siero, e la chemioterapia¹²⁵. Inoltre, analizzando linee cellulari di cancro al seno umano e una serie di biopsie di cancro al seno da pazienti sottoposti a terapia con tamoxifene, è stato dimostrato che l'integrina $\alpha 6\beta 4$ contribuisce alla resistenza a tamoxifene tramite l'induzione dell'espressione di ErbB-3, che porta ad un aumento di attivazione AKT¹²⁶. Questo sembra verificarsi soprattutto nei carcinomi mammari estrogeno negativi. In questi tumori, ErbB-3 inibisce la fosforilazione di AKT e induce l'apoptosi, favorendo così la risposta al tamoxifene. L'analisi delle biopsie di tumori umani ha rivelato una correlazione significativa tra l'asse $\alpha 6\beta 4$ integrin/ErbB-3/p-AKT in tumori al seno ERbeta1-negativi e una corta sopravvivenza libera da malattia. Insieme, questi studi indicano che la funzione oncogenica della famiglia dei geni ErbB è strettamente regolata dal signalling integrinico. Fibronectina, collagene, e laminine sono importanti proteine della matrice del tumore microambiente tumorale al seno. L'integrina $\alpha 2\beta 1$ sembra essere importante per l'adesione al collagene di tipo I nelle metastasi delle cellule tumorali mammarie all'osso^{127,128}. Uno studio recente ha tuttavia suggerito che l'integrina $\alpha 2\beta 1$ possa sopprimere la disseminazione metastatica linfonodale di cellule di neoplasie mammarie¹²⁹. L'analisi di espressione genica di cellule di tumore mammario MCF-7 multidrug-resistant ha rivelato che 25 geni che codificano varie proteine dell'ECM (fra cui collagene, fibronectina, laminina) e subunità integriniche risultano iperespresse¹³⁰. Uno studio clinico ha anche mostrato che un' aumentata espressione dell'integrina $\beta 1$ è associata a ridotta sopravvivenza nel carcinoma invasivo della mammella¹³¹. Gli studi descritti sopra indicano che il segnale integrina-ECM rappresenta uno step critico nella resistenza alla chemioterapia del cancro al seno. Il ruolo dell' integrina $\beta 1$ è probabile che sia dipendente dallo stato di differenziazione del tumore della mammella e dalla natura del farmaco utilizzato. Inoltre, l'effetto protettivo delle integrine $\beta 1$ è mediato dall'attivazione del pathway PI3-kinase/AKT, che a sua volta inibisce l'arresto del ciclo cellulare e l'attivazione della caspasi-3 indotti dai farmaci antitumorali¹³³. Infatti l'attivazione mediata dalle integrine del pathway PI3-kinase/AKT riduce i livelli degli inibitori del ciclo cellulare p21 e p27 e previene la down-modulazione delle cicline E, A, e B. Di conseguenza, gli agenti chemioterapici sono incapaci di indurre l'arresto G2/M del ciclo cellulare, che è un passo necessario per l'apoptosi indotta da farmaci.

Analisi immunohistochimiche di biopsie di neoplasie polmonari a piccole cellule hanno rivelato che questi tumori producono grandi quantità di collagene IV, che potrebbe legarsi alle integrine $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$, e fibronectina, che è un ligando per l'integrina $\alpha 5\beta 1$ ^{134,135}. Uno studio clinico condotto utilizzando biopsie transbronchiali ha evidenziato che una maggiore espressione di integrina $\beta 1$ correla con chemioresistenza ed è un fattore

prognostico negativo nel carcinoma polmonare a piccole cellule¹³⁶. Inoltre, elevati livelli di espressione $\beta 1$ e p53 si sono dimostrati essere un fattore prognostico negativo rispetto nel carcinoma polmonare¹³⁷. L'iperespressione di integrina $\beta 1$ è stata anche associata alla resistenza del carcinoma polmonare non a piccole cellule a trattamento con gefitinib¹³⁸. Insieme, questi studi sottolineano il ruolo critico delle $\beta 1$ integrine nella malignità e chemioresistenza nel cancro del polmone.

Anche altri tumori solidi utilizzano l'adesione all'ECM per sfuggire all'apoptosi e la chemioterapia. E' stato infatti dimostrato che la fibronectina inibisce l'apoptosi ceramide e docetaxel indotta in linee cellulari di cancro alla prostata DU145 tramite le $\beta 1$ integrine e il fattore di crescita insulino simile¹³⁹. Inoltre PTHR β è stato dimostrato essere in grado di proteggere le cellule tumorali prostatiche C4-2 e PC-3 dall'apoptosi indotta da doxorubicina attraverso l'attivazione dell'asse PI3-kinase/AKT mediata dall'integrina $\alpha 6\beta 4$ ¹⁴⁰. Infatti l'attivazione dell'asse $\alpha 6\beta 4$ integrina/PI 3-kinase/AKT è in grado di indurre un aumento del rapporto dei membri antiapoptotici/ proapoptotici della famiglia Bcl-2 oltre che l'attivazione del fattore di trascrizione NF κ B, che è noto per upregolare l'espressione di diverse proteine antiapoptotiche.

E' stato dimostrato inoltre che l'interazione delle cellule tumorali pancreatiche con componenti dell'ECM tra cui fibronectina, collagene di tipo I, e il collagene di tipo IV è in grado di diminuire la sensibilità ai farmaci citotossici e promuovere la proliferazione¹⁴¹. Inoltre la chemioresistenza intrinseca alla gemcitabina in questi tumori correla con l'attivazione di FAK indotta da laminina¹⁴². L'attivazione di FAK si è dimostrata essere necessaria per l'attivazione di AKT, che a sua volta è in grado di mediare un aumento nell'espressione della proteina anti-apoptotica survivin, e l'inattivazione del fattore proapoptotico Bad tramite fosforilazione. Un recente studio ha dimostrato che le cellule stellate pancreatiche possono proteggere dall'apoptosi indotta da radioterapia le cellule di cancro al pancreas attraverso l'attivazione di FAK mediata dall' integrina $\beta 1$ ¹⁴³. Inoltre, il legame del collagene I all'integrina $\alpha 2\beta 1$ ha dimostrato di promuovere il fenotipo maligno di adenocarcinomi del dotto pancreatico e di limitare l'apoptosi indotta da 5'-fluorouracil attraverso l'upregolazione della proteina antiapoptotica Mcl-1, membro della famiglia Bcl-2¹⁴⁴. Il recettore $\alpha 5\beta 1$ fibronectina trasduce anche l'effetto antiapoptotico della molecola di adesione L1CAM (CD171) [64], e L1CAM/CD171 è associata a prognosi infausta in diversi tumori come colon e ovaie¹⁴⁷. Il trattamento delle cellule tumorali pancreatiche con farmaci chemioterapici induce l'espressione di L1CAM, che si lega a integrina $\alpha 5\beta 1$ favorendo così la resistenza alla chemioterapia. L'effetto prosurvival del legame L1CAM all' integrina $\alpha 5\beta 1$ sembra essere associata all'attivazione di NF κ B e produzione di IL-1 β ¹⁴⁸.

1.17 INTEGRINA $\alpha 5\beta 1$

Le integrine non hanno attività enzimatica pertanto la trasduzione del segnale è eseguita da proteine reclutate per la coda citoplasmatica come FAK, src, e Talin. La durata e l'intensità del segnale è regolata in parte da specifiche proteine regolatrici negative come ICAP1 o sharpin¹⁴⁹. Integrina $\alpha 5\beta 1$ ha come regolatrici due specifiche proteine intracellulari chiamate nischarin¹⁵⁰ e GIPC1¹⁵¹. Dopo l'attivazione, integrina $\alpha 5\beta 1$ può essere sia ubiquitinata e degradata nei lisosomi o essere riciclata rapidamente sulla membrana plasmatica tramite la pathway endosomiale precoce¹⁵². L'ubiquitinazione e la degradazione in lisosomi di integrina $\alpha 5\beta 1$ è importante per una corretta migrazione dei fibroblasti su fibronectina¹⁵³. Le integrine $\alpha 5\beta 1$ possono essere internalizzate attraverso pathway clathrina dipendenti o indipendenti¹⁵². L'internalizzazione caveolare di integrina $\alpha 5\beta 1$ e fibronectina promuove il turn-over della matrice extracellulare¹⁵⁴. Interessantemente sembra che caveolin-1 sia in grado di internalizzare l'integrina $\alpha 5\beta 1$ senza fibronectina, regolando così la quantità di recettore fibronectina disponibile sulla superficie cellulare. Questo tipo di regolazione è stata dimostrata anche in cellule endoteliali con l'internalizzazione dell'integrina $\alpha 5\beta 1$ attiva o inattiva attraverso due vie differenti¹⁵¹. Il rapido riciclaggio dell'integrina $\beta 1$ sulla membrana plasmatica tramite la via endosomiale precoce è regolata dal legame dalla proteina "Rab5 related GTPase Rab21" con una regione vicina al motivo GFFKR della coda plasmatica¹⁵⁵. Un'altra piccola proteina ad attività GTPasica come Rab25 modula l'integrina $\alpha 5\beta 1$ nella sua capacità di promuovere l'invasività delle cellule tumorali¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Dati recenti indicano anche un ruolo di integrina $\alpha 5\beta 1$ come meccanosensore^{159,160}. In risposta a forze meccaniche, integrina $\alpha 5\beta 1$ si alterna tra stati di rilassamento e tensione che permettono di modulare l'attività di adesione e di trasduzione del segnale^{161,162}. La stimolazione meccanica di integrina $\alpha 5\beta 1$ incrementa l'invasione delle cellule tumorali^{163,164}.

L'angiogenesi è un processo fisiologico e patologico chiave regolato in parte dalle integrine. Le integrine infatti sono espresse dalle cellule endoteliali, cellule muscolari lisce e componenti cellulari del sangue come piastrine, monociti, linfociti. Tra la grande famiglia delle integrine, le subunità integriniche $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv o $\beta 1$ hanno dimostrato essere richieste per una corretta vascolo-angiogenesi¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Tuttavia, ciascuna di queste integrine hanno funzione specifica: topi $\alpha 4$ knock out mostrano una ritenzione anormale di cellule staminali ematopoietiche nel midollo osseo e difetti cardiaci, topi knock out αv mostrano prevalentemente emorragie cerebrali e intestinali con conseguente morte precoce, e il knock out $\beta 1$ selettivo in cellule endoteliali comporta il fenotipo più grave con rimodellamento vascolare e difetti causati da un'alterata adesione e migrazione e relativa ridotta sopravvivenza delle cellule endoteliali. La delezione omozigote di $\alpha 5$ è associata a

morte embrionale precoce a causa di difetti di sviluppo tronco posteriore (difetti del tubo neurale e somiti) e dell'angiogenesi^{168,169}. Anormalità angiogenesi si osservano anche in topi carenti di fibronectina, il principale ligando per l'integrina $\alpha 5\beta 1$ ¹⁷⁰. Per comprendere meglio il meccanismo regolato dalla subunità integrinica $\alpha 5$ subunità nell'ambito dell'angiogenesi, sono stati progettati modelli knock out condizionali dove topi $\alpha 5$ flox/flox sono stati incrociati con topi Tie2-Cre. I topi risultanti non esprimono la subunità $\alpha 5$ sulle cellule endoteliali ed ematopoietiche. Sorprendentemente gli embrioni si sviluppano normalmente e non sono portatori di difetti angiogenesi¹⁷¹. L'analisi di adesione delle cellule endoteliali $\alpha 5$ nulle mostra che αv è presente ed è in grado di compensare la mancanza di $\alpha 5$. Il doppio knock out di $\alpha 5$ e αv in cellule endoteliali provoca un anormale rimodellamento vascolare e difetti cardiaci nella maggior parte degli embrioni. Questi risultati sottolineano l'importanza di specifiche integrine nello sviluppo dell'angiogenesi, ma anche che esistono meccanismi di compensazione. Questi meccanismi non sono solo osservati durante lo sviluppo, ma anche per esempio nelle cellule endoteliali cerebrali ipossiche adulte¹⁷². I meccanismi di compensazione possono svolgere un ruolo fondamentale e devono essere presi in considerazione quando si analizzano i risultati di terapie target anti-integrina. Oltre al suo ruolo diretto nell'angiogenesi, l'integrina $\alpha 5\beta 1$ regola anche i segnali angiogenici in modo indiretto attraverso il legame con altri partners, come endostatina¹⁷³, VEGFR-1¹⁷⁴, Angiopietina-2 e Tie-2¹⁷⁵. Interessantemente, i vasi maturi presentano livello molto basso di $\alpha 5$ (con l'eccezione dei sinusoidi epatici e le venule nei linfonodi) mentre la neovascolarizzazione tumorale o neovasi nella cornea esprimono elevati livelli di $\alpha 5$ ¹⁷⁶⁻¹⁷⁹. L'espressione di $\alpha 5$ nelle cellule endoteliali è regolata da diversi fattori angiogenici quali FGF, TNF α o IL8, ma non VEGF¹⁷⁶. A sua volta, l'attivazione di $\alpha 5\beta 1$ sulle cellule endoteliali tramite il legame con la fibronectina risulta nella trascrizione di un gene repertorio connessi con l' angiogenesi (HB-EGF, IL8, CXCL1), adesione (VCAM, E-selectina), trasduzione del segnale (RICK, NF κ b) e coagulazione (TF)¹⁸¹. Una volta espresso, $\alpha 5$ promuove segnali di sopravvivenza e blocco di segnali apoptotici nelle cellule endoteliali in vitro e in vivo¹⁸². Pertanto, il blocco dell'attività di $\alpha 5$ con peptidi o con anticorpi risulta in effetti anti-angiogenici e con conseguente riduzione della crescita¹⁸³⁻¹⁸⁴.

1.18 TUMORI DEL COLON

La controversia nel ritenere l'integrina $\alpha 5\beta 1$ come soppressore tumorale, piuttosto che come una integrina protumorale nasce principalmente da dati ottenuti in una linea cellulare di tumore del colon, l'HT29. Gli studi hanno mostrato che l'espressione de novo di $\alpha 5$ in cellule HT29 provoca l'arresto della crescita cellulare in vitro e una diminuita

tumorigenicità in vivo. L'arresto della crescita cellulare veniva invertita mediante il legame dell' integrina $\alpha 5\beta 1$ alla fibronectina¹⁸⁵. Interessantemente, le cellule HT29 $\alpha 5\beta 1$ -esprimenti hanno mostrato di resistere all'apoptosi indotta dalla deprivazione di siero¹⁸⁶. La funzione soppressiva tumorale di integrina $\alpha 5\beta 1$ nelle cellule HT29 è stata confermata in un altro studio¹⁸⁷ ed è stata riportata anche una forte azione inibitoria di questa integrina sulla colonizzazione polmone e metastasi¹⁸⁸. Questi risultati sono stati smentiti quando sottogruppi di linee cellulari di cancro del colon sono stati esaminati in base al loro stato di differenziazione¹⁸⁹. È stato dimostrato che il livello di integrina $\alpha 5\beta 1$ risultava essere aumentato nel gruppo scarsamente differenziato¹⁹⁰. In conformità con questi risultati, tre linee di cellule di cancro del colon, KM20, KM12C e KML4A, quando trattate con un anticorpo inibitore anti- $\alpha 5$ di integrina, mostravano un aumento del loro tasso di apoptosi¹⁹¹. È interessante notare che l'iperespressione di integrina $\alpha 5\beta 1$ è stata correlata con la down-regolazione di ADAM-15 e con una cattiva prognosi¹⁹². In linea con questo, è stato dimostrato che l'ipossia è in grado di aumentare l'espressione di $\alpha 5$ e questo aumento è più evidente nei pazienti Duke D stadio C suggerendo che la trascrizione aumenta con la progressione del cancro del colon¹⁹³. L'espressione di $\alpha 5$ integrina in cellule di cancro del colon è sotto il controllo di PTHrP¹⁹⁴ e ZEB2¹⁹⁵. È stata anche riportata in linee cellulari di neoplasia del colon l'attivazione di integrina $\alpha 5\beta 1$ e corrispondenti vie di segnalazione da parte di P-selectina e CEA^{196,197}. La soppressione dell'attività di integrina $\alpha 5\beta 1$ tramite peptidi inibitori ha dimostrato potenziare l'effetto dell'oxaliplatino impedendo così la crescita di metastasi di tumore del colon¹⁹⁸.

1.19 TUMORI OVARICI

La diffusione peritoneale è un passo importante nella progressione dei tumori ovarici. È stato dimostrato che la fibronectina secreta dal tessuto peritoneale attiva l'integrina $\alpha 5\beta 1$ sulle cellule tumorali ovariche stimolando la loro invasività attraverso un aumento di MMP-9 attività¹⁹⁹. Inoltre l'integrina $\alpha 5\beta 1$ regola la formazione di sferoidi multicellulari di carcinoma ovarico, un modello in vitro di micrometastasi²⁰⁰, e media l'adesione di tali sferoidi al monostrato di cellule mesoteliali di ascite derivati da pazienti²⁰¹. È stato dimostrato che linee di carcinoma ovarico umane esprimono l'integrina $\alpha 5\beta 1$ ed il loro legame con le cellule mesoteliali murine risultava essere compromesso specificamente dal trattamento con anticorpi anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ ^{202,203}. L'ipotesi di integrina $\alpha 5\beta 1$ come marcatore prognostico nei tumori ovarici è confermata da altri dati tra i quali quelli provenienti dall'analisi di grandi coorti di pazienti^{205,206}. In uno di questi studi, l'espressione delle integrine $\alpha 5\beta 1$ era inversamente correlata con l'espressione E-caderina e ha dimostrato di essere implicata nell'adesione delle cellule tumorali alla cavità peritoneale e

delle conseguenti metastasi. L'inibizione dell' integrina $\alpha 5\beta 1$ mediante anticorpi specifici ha portato alla soppressione della diffusione intra-peritoneale ed a una aumentata sopravvivenza in due modelli di xenotrapianto di carcinoma ovarico. Infatti l'interazione fibronectin/integrina $\alpha 5\beta 1$ sulle cellule tumorali ovariche attiva l'oncogene cMet e fornisce importanti vie di segnalazione mitogeniche cellule²⁰⁷. Anche adrenomedullina è in grado di upregolare integrina $\alpha 5\beta 1$ nei tumori dell'ovaio ed è stato dimostrato che i pazienti con alta espressione adrenomedullina mostrano una maggiore incidenza di metastasi, suggerendo ulteriormente indirettamente un ruolo dell' integrina $\alpha 5\beta 1$ nel regolare l' aggressività dei tumori ovarici²⁰⁸.

1.20 TUMORI AL SENO

Analogamente a ciò che è stato mostrato in cellule tumorali del colon, i primi dati relativi $\alpha 5\beta 1$ integrina nelle cellule di tumore del seno sono stati a favore del suo effetto di soppressione tumorale. È stato riportato che il trattamento della linea altamente invasiva carcinoma mammario MDA-MB-435 (che in seguito è stata classificata come una linea cellulare di melanoma) con Maspin riduceva il loro fenotipo invasivo attraverso una aumentata espressione di integrina $\alpha 5\beta 1$ ²⁰⁹. Dati successivi però hanno contestato questa opinione, ed hanno dimostrato un ruolo proinvasivo di di integrina $\alpha 5\beta 1$ nelle cellule di cancro al seno²¹⁰⁻²¹². L'oncogene ERBB2, che risulta essere fortemente associato con la malattia metastatica e prognosi infausta, induce l'iperespressione di integrina $\alpha 5\beta 1$ nell'adenocarcinoma mammario promuovendo la sopravvivenza delle cellule tumorali in condizioni avverse e la loro capacità invasiva^{210,213}. In un sottogruppo di tumori al seno, l'iperespressione del coattivatore-1 dei recettori steroidei (SRC-1) è stata associata con una "upregolazione" di integrina $\alpha 5\beta 1$ e promozione dell' adesione e migrazione cellulare²¹⁴. E' stata anche dimostrata una relazione inversa tra l'espressione dell' integrina $\alpha 5\beta 1$ ed espressione di soppressori tumorali, come nischarin²¹⁵, soppressori di metastasi come Nm23²¹⁶ o di markers di aderenza come ad esempio E-caderina²¹⁷. Inoltre è stata dimostrata la perdita di E-caderina attraverso la stimolazione delle cellule del cancro al seno con angiopoietina-2 attraverso un modalità $\alpha 5\beta 1$ integrina-dipendente²¹⁸. I dati hanno anche dimostrato che l'integrina $\alpha 5\beta 1$ controlla l'invasione delle cellule di cancro al seno attraverso la modulazione di MMP-1 e MMP-2²¹⁹. La subunità $\alpha 5$ risulta essere debolmente espressa in tessuti normali e più fortemente espressa in campioni di neoplasia mammaria²²⁰ e che l'elevata espressione della subunità integrinica $\alpha 5$ era associata con una diminuita sopravvivenza a lungo termine in una coorte di pazienti con cancro al seno²²¹, ma non in due altre coorti²²². E' interessante inoltre notare che mentre l'integrina $\alpha 5$ è stata proposta essere coinvolta positivamente

nelle metastasi polmonari di tumori della mammella nell'uomo²¹⁴, l'effetto opposto è stato descritto per le cellule tumorali mammarie murine²²³. Infine, la radioterapia ha mostrato di aumentare i livelli di espressione dell'integrina $\alpha 5\beta 1$ nelle cellule di tumore del seno in cultura 3D e che il trattamento combinato con radiazioni ionizzanti e antagonisti della integrina $\alpha 5\beta 1$ era in grado di incrementare significativamente i livelli di apoptosi²²¹.

1.21 TUMORI DEL POLMONE

Il tabacco è il principale fattore di rischio per i tumori del polmone. Il principale alcaloide del tabacco, la nicotina, stimola la proliferazione delle cellule di neoplasia del polmone attraverso l'induzione della deposizione della fibronectina che a sua volta induce l'attivazione dell'integrina $\alpha 5\beta 1$. Nel carcinoma polmonare non microcitoma, l'iperspressione di integrina $\alpha 5\beta 1$ ²²¹⁻²²⁴ è risultata associata negativamente con la sopravvivenza. È interessante notare che l'espressione dell'integrina $\alpha 5\beta 1$ potrebbe distinguere tra adenocarcinoma e carcinoma a cellule squamose del polmone. Inoltre l'espressione delle integrine $\alpha 5\beta 1$ è più frequente nei tumori con metastasi linfonodali rispetto a quelli senza metastasi. Il segnale fibronectina-integrina $\alpha 5\beta 1$ è stata dimostrata essere implicata nella progressione del cancro al polmone²²⁵⁻²²⁸. Il pathway PI3K/AKT/mTOR è un mediatore fondamentale degli effetti fibronectina-integrina sulla proliferazione. Proteine della matrice extracellulare compreso fibronectina hanno dimostrato di proteggere le cellule del cancro del polmone da apoptosi attraverso l'attivazione dell'integrina $\beta 1$ ²²⁹⁻²³² spiegando così in parte la resistenza ai farmaci delle cellule tumorali del polmone.

1.22 GLIOMA

L'integrina $\alpha 5\beta 1$ è espressa a livello significativamente superiore nel glioblastoma (il glioma più aggressivo) che nel tessuto normale cerebrale adiacente suggerendo che essa potrebbe svolgere un ruolo nello sviluppo o nella progressione del glioma²³³. È stato recentemente dimostrato²³⁶⁻²³⁸ in grandi coorti di pazienti che una alta espressione di integrina $\alpha 5\beta 1$ è associata a una prognosi peggiore nei pazienti affetti da glioma. Inoltre è stato dimostrato che l'espressione dell'integrina $\alpha 5\beta 1$ è sotto il controllo negativo di caveolin-1 e positivo di TGF β R in un sottogruppo di gliomi²³⁹. Con l'uso di specifici antagonisti non peptidici di integrina $\alpha 5\beta 1$, il suo ruolo nella proliferazione, migrazione, invasione e resistenza alla chemioterapia è stato messo in luce in diverse linee cellulari di glioma²⁴⁰⁻²⁴¹. L'interazione di MMP-2 con integrina $\alpha 5\beta 1$ è stata dimostrata regolare la segnalazione IL-6/STAT3 nel glioma²⁴². L'espressione della proteina di riparazione del

DNA, O6-Methylguanine-DNA metiltransferasi (MGMT), è inversamente correlata alla capacità invasione di glioma e all' espressione dell'integrina $\alpha 5\beta 1$ ²⁴³.

1.23 MELANOMA

Il melanoma maligno ha un alto potenziale metastatico. Il ruolo dell'integrina $\alpha 5\beta 1$ nel promuovere le metastasi da melanoma attraverso un aumento dell'adesione delle cellule alla fibronectina e della protezione contro l'apoptosi è stata ampiamente descritta²⁴⁴.

Recentemente è stato dimostrato che l'espressione della subunità integrinica $\alpha 5$ è sotto il controllo della survivina²⁴⁵ o controllata dalla interazione tra caveolina 1 e Rho-GTPasi²⁴⁶. Curiosamente, il melanoma uveale sembra essere uno dei casi in cui l'espressione delle integrine $\alpha 5\beta 1$ influisce negativamente sulla cancerogenicità. L'elevata aggressività delle cellule di melanoma uveale dipende dalla perdita di integrina $\alpha 5\beta 1$ alla superficie cellulare²⁴⁷⁻²⁴⁹. Tuttavia, il ripristino dell'espressione di $\alpha 5\beta 1$ aumenta la resistenza cellulare allo stress in vitro e la crescita in vivo²⁴⁸, il che appare un po' paradossale. È stato proposto che l'effetto di integrina $\alpha 5\beta 1$ sulla tumorigenicità cellula dipende l'espressione endogena della fibronectina dalle cellule tumorali.

1.24 INTEGRINA $\alpha 5\beta 1$ ANTAGONISTI

ANTICORPI

La ricerca di antagonisti specifici dell'integrina $\alpha 5\beta 1$ è aumentata in questi ultimi anni. Dato che l'integrina $\alpha 5\beta 1$ è stata ampiamente descritta come un'inequivocabile integrina pro-angiogenica, questi antagonisti sono generalmente presentati come potenziali agenti anti-angiogenici. Tre principali classi di antagonisti sono al momento stati studiati, gli anticorpi specifici, piccoli peptidi o piccole molecole RGD-simili non peptidici.

Un anticorpo murino bloccante anti- $\alpha 5\beta 1$, denominato IIA1, è stato utilizzato in studi pre-clinici²²¹. Esso si è dimostrato in grado di inibire in vitro l'invasione delle cellule tumorali ovariche in Matrigel e la loro adesione a cellule mesoteliali. Inoltre in modelli murini in vivo ha dimostrato poter ridurre il numero e le dimensioni delle metastasi intra-addominali e ha aumentato la sopravvivenza degli animali trattati²⁰⁵. Questo anticorpo inibitorio inoltre è in grado di indurre apoptosi in cellule di cancro al seno in condizioni di coltura 3D²²¹. Successivamente è stata generata una versione chimerica umanizzata di IIA1 chiamata M200 e registrata con il nome volociximab (sviluppata per prima da Pdl Biopharma, Fremont, CA, USA), con affinità per l'integrina $\alpha 5\beta 1$ e attività simili a IIA1 nel bloccare l'adesione alla fibronectina²⁵⁰. Volociximab è un potente inibitore in vitro dell'angiogenesi in grado di indurre apoptosi delle cellule endoteliali in fase proliferativa. Ha dimostrato

essere in grado di ridurre la densità dei vasi e la crescita tumorale in neoplasie xenotrapiantate nei conigli^{251,252}. Volociximab ha dimostrato di essere sicuro e tollerabile in studi di fase I^{254,255} in pazienti affetti da tumori solidi in fase avanzata. Gli effetti avversi riportati includono, sintomi gastrointestinali, mal di testa, edema e ipertensione. Anche se l'integrina $\alpha 5\beta 1$ è espressa su monociti normali, non sono state osservate complicazioni infettive clinicamente evidenti. Uno studio clinico di fase II ha dimostrato che nei pazienti con carcinoma ovarico platino-resistente ovarico in fase avanzata o carcinoma peritoneale primario, in monoterapia settimanale con volociximab è stato ben tollerato, ma senza efficacia su queste particolare popolazione di pazienti²⁵⁶. Nei pazienti con carcinoma a cellule chiare refrattario ai trattamenti convenzionali in fase avanzata, volociximab ha portato alla stabilizzazione della malattia nel 80% dei pazienti²⁵⁷. Un anticorpo monoclonale a doppia azione, PF-04605412, è stato sviluppato da Pfizer. Questo anticorpo è stato progettato per indurre una forte tossicità cellulare anticorpo-dipendente²⁵⁸.

Studi preclinici hanno dimostrato che PF-04605412 è in grado di inibire potentemente le vie di segnale intracellulare di $\alpha 5\beta 1$, l'adesione cellulare, la migrazione e l'angiogenesi. In studi su animali, è stata riscontrata una robusta azione anti-tumorale che correlava con un importante infiltrazione tumorale di macrofagi e le cellule natural killer²⁵⁸.

Uno studio clinico di fase I è in corso di tumori solidi refrattari alle terapie disponibili.

1.25 MOLECOLE RGD-SIMILI

Il motivo RGD della fibronectina è riconosciuto da almeno tre principali: integrine $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 5\beta 3$ e $\alpha 11\beta 3$. La sfida di questi ultimi dieci anni è stata quella di disegnare antagonisti con maggiore selettività per ciascuna di queste integrine. Il primo antagonista peptidico non selettivo di integrina $\alpha 5\beta 1$ è stato SJ749²⁵⁹.

SJ749 ha dimostrato essere in grado di inibire in cellule HT29 $\alpha 5$ integrina-esprimenti l'adesione delle cellule alla fibronectina e non agli altri ligandi dell' ECM. È anche bloccata la funzione di $\alpha 5\beta 1$ in embrioni di pollo e in modelli murini di angiogenesi agendo come un potente inibitore della crescita tumorale e dell'angiogenesi tumorale indotta. Inoltre SJ749 inibisce potentemente la proliferazione di linee cellulari di glioma ed è in grado di aumentare la sensibilità alla chemioterapia modulando la via p53²³⁹⁻²⁴⁰.

1.26 PEPTIDI NON RGD-SIMILI

Sequenze al di fuori del sito di RGD sono deputate a consentire la piena adesione di integrina $\alpha 5\beta 1$ alla fibronectina. Di particolare interesse è la sequenza Pro-His-Ser-Arg-

Asn (PHSRN) nel tipo III, 9° ripetizione della fibronectina anche chiamata il "sito sinergia". Il peptide PHSRN è in grado di incrementare l'invasione delle cellule tumorali prostatiche inducendo MMP-1²⁷⁴⁻²⁷⁴ e la stimolazione dell'angiogenesi²⁷⁵ che invece risultano essere inibita dal peptide inibitore competitivo PHSCN. Una forma acetilato-amidata di PHSCN peptide è risultata essere ancora più potente del peptide PHSCN²⁷⁴, ed è stato sviluppato da Attenuon LLC (San Diego, CA, USA) con il nome di ATN-161.

Il trattamento con ATN-161 è in grado di ridurre in modelli preclinici murini le recidive e metastasi di neoplasie prostatiche²⁷⁶, ridurre metastasi epatiche da tumori del colon-retto, migliorare la sopravvivenza se somministrato in aggiunta a chemioterapia²⁷⁷ e bloccare la crescita del cancro al seno²⁷⁸. Il targeting dell'integrina $\alpha 5\beta 1$ con ATN-161 in combinazione con la radioterapia ha dimostrato indurre maggiore apoptosi in cellule di cancro al seno coltivate in coltura 3D.

Uno studio di fase I di ATN-161 ha indicato che è ben tollerato in pazienti con tumori solidi, e che un terzo dei pazienti manifesta malattia stabile prolungata. Nessun effetto collaterale è emerso o si è aggravato con la somministrazione continua di ATN-161²⁸⁰.

1.27 METASTASI OSSEE DA NEOPLASI MAMMARIA. EPIDEMIOLOGIA

Nel mondo occidentale il tumore mammario è la neoplasia a maggiore incidenza nel sesso femminile e la seconda causa di morte per neoplasia. Un'incidenza di 232,620 nuovi casi e una mortalità di 39,970 (in entrambi i sessi) sono stimate per il 2011 negli Stati Uniti d'America²⁸¹.

Al momento della diagnosi di neoplasia mammaria, circa il 5-6% di donne presenta lesioni a distanza^{282,283} e l'osso rappresenta la sede più comune di metastasi. Più della metà delle donne affette da carcinoma mammario ad esordio metastatico svilupperanno lesioni secondarie ossee²⁸⁴.

La sopravvivenza è influenzata dalla presenza o meno di altre metastasi al di fuori dello scheletro. Le casistiche più numerose considerano una sopravvivenza mediana di 20-30 mesi dalla comparsa di metastasi ossee, mentre la sopravvivenza mediana dei pazienti con metastasi viscerali è di circa 2-3 mesi²⁸⁵. Le lesioni osteoaddensanti sono associate a un'augmentata sopravvivenza a causa di una lenta crescita tumorale. L'80% delle metastasi ossee nel carcinoma della mammella sono osteolitiche, sebbene le due componenti, addensante e litica, spesso coesistano. Infatti, la comparsa di osteosclerosi nelle sedi di lesioni osteolitiche pre-esistenti può essere dovuta al trattamento antitumorale ed indica una regressione del tumore associata a rigenerazione dell'osso, con conseguente miglioramento della prognosi²⁸⁶. La presenza di aree osteolitiche è associata ad aumentato rischio di eventi scheletrici correlati (SREs), definiti come fratture

patologiche, compressione del midollo spinale, dolore osseo che richiede cure palliative radioterapiche e/o chirurgia ortopedica²⁸⁷. Da trials clinici è emerso che l'incidenza di SRE ed il tempo mediano di comparsa del primo SRE tra i pazienti appartenenti al gruppo placebo varia da 5 a 15 mesi, a seconda del tipo tumorale. Tumori della mammella con recettore per gli estrogeni (ER) positivo sviluppano più frequentemente metastasi ossee rispetto a quelli con recettori negativi e presentano una sopravvivenza generalmente più lunga. Altri fattori clinici associati a maggiore tendenza allo sviluppo di metastasi ossee nel carcinoma della mammella sono: basso grading istologico, aumentata angiogenesi ed aumentata attività dell'attivatore del plasminogeno. I dati pubblicati sui tassi di incidenza di metastasi ossee e SREs dopo la diagnosi primaria di neoplasia mammaria con metastasi ossee successive sono scarsi.

Uno studio canadese ha valutato le caratteristiche della malattia metastatica in 180 pazienti affette da neoplasie mammarie triplo-negative (mancanza di espressione di ER, del recettore per il progesterone (PgR) e Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER2/neu)-negative) rispetto ad altri sottotipi di neoplasia mammaria (N = 1,428)²⁸⁸. Il rischio di sviluppare metastasi ossee entro 10 anni dopo la diagnosi era del 7-9% per tutti i sottogruppi.

Hortobagyi e colleghi hanno analizzato l'efficacia dei bisfosfonati nel ridurre le complicanze scheletriche nei pazienti con metastasi ossee e neoplasia mammaria nell'ambito di studi clinici e hanno scoperto che il tempo mediano alla comparsa del primo SRE era di 13.9 mesi in donne trattate con bifosfonati e 7.0 mesi nel gruppo placebo (P = 0.001)^{289,290}.

Un gruppo danese ha stimato l'incidenza di metastasi ossee e SREs in una coorte numerosa di pazienti (population based-cohort) con nuova diagnosi di neoplasia mammaria in Danimarca dal 1990 al 2007²⁹¹. Questa analisi ha registrato un'elevata incidenza di SREs particolarmente nel primo anno dopo la diagnosi di metastasi ossee. Tali evidenze sottolineano la necessità di diagnosticare precocemente la lesione primitiva ed utilizzare tutti i mezzi terapeutici efficaci disponibili che possano ritardare la comparsa dell'evento scheletrico.

1.28 INTEGRINA $\alpha 5\beta 1$ NEL PROCESSO DI METASTATIZZAZIONE OSSEA

Dopo il distacco dal tumore primitivo, la cellula neoplastica accede, attraverso la neovascolarizzazione tumorale, tramite molecole di adesione come E-caderina o laminina, alla circolazione sistemica; si arresta a livello dei capillari ossei e fuoriesce dal letto capillare cominciando ad invadere la matrice tissutale²⁹². Affinchè questa "cascata metastatica" si realizzi la cellula deve disporre di enzimi proteolitici che le permettano di

distaccarsi dalla massa tumorale primitiva, deve sopravvivere al sistema immunitario ed agli attriti meccanici nel circolo ematico e deve sviluppare un profilo recettoriale di membrana che le consenta di aderire al sito metastatico^{293,294}.

Per la formazione delle metastasi all'interno del tessuto osseo sono necessarie interazioni reciproche tra le cellule tumorali, le cellule ospiti ed il microambiente. Questo percorso della cellula tumorale, già noto nell'ambito dell'ipotesi del "seed and soil" ("seme e terreno fertile") formulata da Stephen Paget alla fine del 1800²⁹⁵.

Sono molti gli studi in letteratura che descrivono una vasta gamma di fattori "soil" prodotti dalle cellule residenti nell'osso o immagazzinati nella matrice ossea, che una volta rilasciati e attivati, possono influenzare la crescita della metastasi²⁹⁶, così come sono noti i fattori "seed" espressi dalle cellule tumorali mammarie che favoriscono le interazioni con il microambiente osseo e quindi con la matrice extracellulare (ECM) e le cellule residenti (osteoblasti, osteoclasti e cellule endoteliali del midollo osseo).

L'integrina $\alpha 5\beta 1$ è lo specifico recettore per la fibronectina (FN) che risulta essere iperespresso nelle cellule tumorali che vanno incontro a transizione epiteliomesenchimale (EMT) principalmente stimolata dal TGF- β . La transizione epiteliomesenchimale (EMT) è definita dalla perdita delle caratteristiche epiteliali e l'acquisizione di un fenotipo mesenchimale. Nelle cellule di carcinoma, l'EMT è generalmente associata all'acquisizione di maggiore aggressività con un aumento del potenziale invasivo e metastatico³⁰⁶.

E' stato dimostrato che l'espressione di $\alpha 5\beta 1$ in cellule leucemiche, di tumore della prostata e in cellule di neoplasia mammaria facilita l'interazione con lo stroma a livello del midollo osseo³⁰³⁻³⁰⁵. Studi in vitro su diverse linee cellulari tumorali hanno mostrato che l'espressione di $\alpha 5\beta 1$ può facilitare l'interazione delle cellule tumorali con lo stroma midollare ricco di FN e permettere la sopravvivenza delle cellule tumorali nel midollo osseo³⁰⁷⁻³⁰⁹.

È stato dimostrato che l'attivazione $\alpha 5\beta 1$ è un regolatore chiave nel passaggio dalla dormienza cellulare alla crescita metastatica. E' stato infatti dimostrato in vitro usando un sistema di coltura a 3 dimensioni (3D), che la supplementazione della membrana basale con fibronectina provoca l'attivazione delle vie di segnalazione a valle $\alpha 5\beta 1$ come FAK e Src.

Ciò provoca l'attivazione della chinasi ERK, un regolatore chiave nel ciclo cellulare e della riorganizzazione del citoscheletro. ERK, a sua volta, induce la fosforilazione della catena leggera della miosina (MLC) da parte della MLC chinasi (MLCK), determinando la riorganizzazione delle fibre di f-actina, seguita dalla traslocazione della chinasi ciclina-dipendente p27 nel citoplasma. La seguente cascata conduce al passaggio dalla dormienza (quiescenza) alla proliferazione. L'inibizione della subunità beta1, o le sue

molecole di segnalazione a valle come Src, p-FAK, p-ERK, e MLCK, determina una ridotta fosforilazione di MLC contribuendo a mantenere le cellule in uno stato inattivo³¹⁰⁻³¹¹.

Inoltre, studi condotti in cellule di neoplasia del testa-collo e della mammella hanno dimostrato l'importanza del cross-talk tra integrine $\alpha 5\beta 1$, recettore urochinasasi (uPAR) e recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR) nel regolare il processo di dormienza cellulare in vivo^{303,313}.

La downregolazione di uPAR determina una riduzione del crosstalk con integrina $\alpha 5\beta 1$ e, a sua volta, riduce l'attivazione di FAK, ERK e contemporaneamente aumenta l'attività della "stress activated protein kinase p38". Il ridotto rapporto di ERK/p- p38^{SAPK} conduce in ultimo all'induzione della dormienza cellulare³¹²⁻³¹³. E' possibile dunque che l'interazione tra $\alpha 5\beta 1$ sulle cellule maligne e FN sulle cellule stromali midollari potrebbe rappresentare un potenziale meccanismo attraverso cui le CTC (cellule tumorali circolanti) potrebbero essere sequestrate all'interno della cavità del midollo osseo in grado successivamente anche di attivare vie di segnalazione di sopravvivenza e proliferazione contribuendo alla formazione di metastasi scheletriche clinicamente evidenti³⁰⁸.

Fino ad ora il ruolo dell' integrina $\alpha 5\beta 1$ come bersaglio terapeutico è stato studiato concentrandosi solo sulle sue proprietà proangiogenetiche.

Il presente lavoro è rivolto a valutare per la prima volta la potenziale attività di un approccio terapeutico mirante al blocco dell'attività dell'integrina $\alpha 5\beta 1$ in un modello preclinico progettato per dimostrare il suo impatto nello sviluppo di metastasi ossee. Questo progetto di ricerca è finalizzato a fornire il razionale per permettere di testare agenti anti $\alpha 5\beta 1$ in un setting completamente inesplorato e clinicamente rilevante, come l'osteoncologia.

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il presente studio si prefigge l'obiettivo di valutare se α_5 possa rappresentare un target terapeutico nelle metastasi ossee da neoplasia mammaria fornendo un background preclinico ed un razionale per testare in futuro agenti anti α_5 in setting clinici di ambito osteoncologico

Obiettivi primari

Determinare se l'integrina α_5 possa essere considerata un fattore prognostico indipendente in grado di predire la propensione alla metastatizzazione ossea da parte della neoplasia mammaria.

Elucidare il reale ruolo biologico di tale molecola nell'ambito del processo di metastatizzazione ossea e l'impatto di un approccio terapeutico basato sull'uso di un anticorpo monoclonale (M200) bloccante la sua attività.

Obiettivi secondari

Indagare la correlazione tra l'espressione di α_5 ed i fattori prognostici validati per la neoplasia mammaria

Indagare il legame tra l'espressione di α_5 e le caratteristiche di quiescenza e staminalità delle cellule tumorali

3. PAZIENTI E METODI

3.1 ANALISI DI DATASET PUBBLICI DI ESPRESSIONE GENICA

Per condurre la prima parte del nostro studio abbiamo selezionato il dataset di microarray pubblico della coorte del Nederlands Kanker Instituut (NKI) ad Amsterdam, contenente 295 pazienti affette da neoplasia mammaria primitiva. I cosiddetti “raw data” (dati grezzi) ed i dati clinici completi sono stati ottenuti dal Rosetta Website (<http://www.rii.com>). Le caratteristiche clinico-molecolari dei pazienti sono mostrate in Tabella.

Fattori prognostici	pz (n)	pz (%)
<i>Eta' (anni)</i>		
<50	246	83.4
≥50	49	16.6
<i>Linfonodi positivi (n)</i>		
0	151	51.2
1-3	106	35.9
≥4	38	12.9
<i>Dimensioni (cm)</i>		
≤2	155	52.5
>2	140	47.5
<i>Grading istologico</i>		
Ben differenziato (G1)	75	25.5
Moderatamente d. (G2)	101	34.2
Scarsamente d. (G3)	119	40.3
<i>Status ER</i>		
Negativo	69	23.4
Positivo	226	76.6
<i>70-gene signature</i>		
Poor prognosis	180	61
Good prognosis	115	39

Caratteristiche clinico-patologiche della coorte NKI

I raw data sono stati importati nel software Partek Genomic Suite 6.4 (Partek Inc., St. Louis, MO), trasformati in scala log₂ e sottoposti a normalizzazione quantile. La qualità dei dati è stata verificata utilizzando la cosiddetta “Principal Component Analysis” (PCA) ed i dati trasformati in in log₂ riguardanti il seguente probeset sono stati valutati: ITGA5. La popolazione è stata stratificata sulla base dei principali fattori prognostici standard utilizzati per la neoplasiamammaria: lo stato ER, la dimensione tumorale (T) ed il grading istologico (G). Inoltre, la popolazione è stata divisa in base all’espressione del profilo prognostico dei “70-gene” (van’t Veer signature) in 2 gruppi (good prognosis e poor prognosis) ed in base alla classificazione in sottotipi molecolari di Sorlie.

3.2 PAZIENTI DELLA FASE SPERIMENTALE

Abbiamo studiato l'espressione della subunità integrinica $\alpha 5$ nei tumori primivi mammari mediante tecnica qRT-PCR ed abbiamo correlato i risultati alle caratteristiche clinico-patologiche, alla recidiva ossea ed alla sopravvivenza. Lo studio ha retrospettivamente arruolato donne con diagnosi istologica di neoplasia mammaria sottoposta ad asportazione chirurgica. In dettaglio, campioni di biopsie chirurgiche di 427 pazienti affette da carcinoma intraduttale (IDC) o intralobulare (ILC) sono stati ottenuti dagli archivi chirurgici dei dipartimenti di istopatologia delle seguenti strutture: Curie Institutee René Huguenin Hospital (Parigi, Francia). Il consenso informato scritto per ciascuna delle pazienti è stato ottenuto. I comitati etici istituzionali hanno approvato questa procedura. I principali criteri di inclusione erano: follow-up minimo di 24 mesi dalla chirurgia e assenza di malattia metastatica alla diagnosi di neoplasia primitiva. Criteri di esclusione erano: terapia neoadiuvante e assenza di materiale disponibile sufficiente per analisi di biologia molecolare. Tutti i dati dei pazienti sono stati inseriti in un database comune includente: caratteristiche clinico-patologiche, siti di recidiva, SDFS e OS. Le informazioni clinico-patologiche sono state ottenute dalle cartelle mediche e dall'archivio dei referti istologici. Le caratteristiche cliniche di queste pazienti sono mostrate in Tabella. L'età media delle pazienti era 60.7 anni (range = 25–91) e il follow-up mediano è stato 120.5 mesi (range = 13–347).

Patients characteristics	No. (%) of patients
Age	
≤60 y	199 (46.5)
>60 y	228 (53.5)
Grading	
1-2	278 (65.1)
3	149 (34.8)
Estrogen receptor status	
Negative	108 (25.2)
Positive	319 (74.8)
Lymphnode status	
Negative	121 (28.3)
Positive	306 (71.7)
Macroscopic tumor size	
≤25mm	216 (50.7)
>25mm	211 (49.3)

Caratteristiche clinico-patologiche della coorte sperimentale

3.3 ANALISI QRT-PCR

L'RNA totale è stato isolato utilizzando il metodo standard acido fenol-guanidio. La concentrazione e la purezza dell'RNA sono state misurate misurato su Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). Il "first-strand" cDNA è stato sintetizzato usando il SuperScriptII Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) secondo le indicazioni dell'azienda produttrice. Tutte le reazioni sono state eseguite PCR con ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) e SYBR Green PCR Core Reagents kit (Applied Biosystems). Trascritti TATA box-binding protein (TBP) sono stati usati come controlli endogeni ed ogni campione è stato normalizzato sulla base del suo contenuto di TBP.

I primer specifici per α_5 utilizzati sono : forward 5' -ACAGACGGGGTCAGTGTGCT- 3'; reverse 5' -CGAGAGCCTTTGCTGTCAA- 3'. Per ogni coppia di primer è stata realizzata una curva standard utilizzando diluizioni seriali di un pool di cDNAs consistenti di differenti tessuti normali. La linearità della curve standard è stata verificata con tutti i coefficienti di variazione fra 0.96 e 0.99.

3.4 LINEA CELLULARE

La linea cellulare MDA-MB-231/B02 (B02) è stata isolata da metastasi ossee causate della linea cellulare di neoplasia mammaria umana MDA-MB-231. Topi atimici sono stati inoculati con una sospensione di MDA-MB-231 direttamente nel ventricolo cardiaco sinistro. Tre settimane dopo le cellule metastatiche sono state raccolte dai siti metastatici ossei, mantenute in coltura fino a confluenza e nuovamente inoculate nel ventricolo cardiaco sinistro. La sottopopolazione B02 è stata ottenuta dopo sei passaggi di MDA-MB-231 in vivo e sono caratterizzata da una altissima efficienza e selettività di metastatizzazione a livello osseo.

Le cellule MDA-MB-231/B02 (B02) sono state stabilmente transfettate con il gene della luciferasi per permetterne il tracking in vivo attraverso la rilevazione della bioluminescenza.

3.5 ANTICORPO

L'anticorpo bloccante l'integrina $\alpha_5\beta_1$ (M200) è stato provvisto da Abbvie Inc. (Illinois, USA). M200 è un IgG4 monoclonale chimerica (85% umana, 15% murina) dotata di selettività specifica per la subunità α_5 umana. Tale selettività consente nel corso degli esperimenti in vivo in modelli murini di valutare l'effetto diretto del blocco $\alpha_5\beta_1$ senza effetti confondenti dovuti al targeting del microambiente tumorale.

3.6 SAGGI DI ADESIONE

I saggi di adesione sono stati eseguiti su piastre da coltura a 96 pozzetti. Tali pozzetti sono stati ricoperti alternativamente con fibronectina, collagene di tipo I, vitronectina e osteopontina (10 µg/ml overnight a 4°C). Cellule di B02 (10⁵) sono state preincubate con M200 o IgG umane di controllo (Chrompure, Jackson ImmunoResearch) a differenti concentrazioni (50, 150, 250 µg/ml) per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente seminate in triplicato lasciandole aderire per 1 ora a 37°C in assenza di siero. La significatività statistica è stata determinata tramite il test ANOVA ad una via seguito dal test di Tukey.

3.7 SAGGI DI MIGRAZIONE

I saggi di migrazione apoptotica sono stati eseguiti su piastre da coltura a 96 pozzetti Transwell (Corning Costar, Corning, NY) provvisti di inserti con membrane in policarbonato dotate di pori da 5-µm. Gli inserti sono stati ricoperti nel lato inferiore con fibronectina (10 µg/ml overnight a 4°C). Cellule di B02 (10³) sono state preincubate con M200 o IgG umane di controllo (Chrompure, Jackson ImmunoResearch) a differenti concentrazioni (50, 150, 250 µg/ml) per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente seminate in triplicato lasciandole migrare ora a 37°C in assenza di siero. La significatività statistica è stata determinata tramite il test ANOVA ad una via seguito dal test di Tukey.

3.8 SAGGI DI INVASIONE

I saggi di invasione sono stati eseguiti su camere di migrazione Bio-Coat ((Becton Dickinson), NY) provviste di filtri da 8-µm ricoperti di Matrigel. Cellule di B02 (5x10⁴) sono state preincubate con M200 o IgG umane di controllo (Chrompure, Jackson ImmunoResearch) a differenti concentrazioni (50, 150, 250 µg/ml) per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente seminate in triplicato nella camera superiore lasciandole migrare per 24 ore a 37°C dopo aver posto il chemoattrattante (10% FBS) nella camera inferiore.

La significatività statistica è stata determinata tramite il test ANOVA ad una via seguito dal test di Tukey.

3.9 SILENZIAMENTO STABILE

Per realizzare il silenziamento stabile del gene $\alpha 5$, la linea cellulare B02 è stata transdotta con $\alpha 5$ short hairpin RNA (shRNA) (5 diversi shRNA sono stati testati) o con uno short hairpin RNA control (shRNA) utilizzando particelle lentivirali (shRNA MISSION RNA, Sigma- Aldrich). Queste particelle lentivirali sono state prodotte transfettando la linea cellulare 293T con hairpinLKO. Il titolo virale è stato calcolato infettando cellule HeLa con volumi crescenti di preparazione virale e contando il numero di cellule vitali dopo selezione con puromicina. Le cellule B02 sono state infettate con gli short hairpin RNA lentivirali e successivamente poste sotto selezione antibiotica con puromicina (2.5 $\mu\text{g/ml}$). L'efficienza del silenziamento è stata misurata a 7 giorni dall'infezione con analisi Western Blot comparando i livelli di espressione di $\alpha 5$ nelle cellule transdotte con $\alpha 5$ short hairpin RNA e short hairpin RNA control.

3.10 ANALISI DEL CICLO CELLULARE

I saggi di ciclo cellulare sono stati eseguiti su piastre da coltura a 12 pozzetti. Tali pozzetti sono stati ricoperti con fibronectina (10 $\mu\text{g/ml}$ overnight a 4°C). Cellule di B02 (3×10^5) sono state preincubate con M200 o IgG umane di controllo (Chrompure, Jackson ImmunoResearch) alla concentrazione di 250 $\mu\text{g/ml}$ per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente seminate in triplicato lasciandole crescere per 72 ore a 37°C in assenza di siero. Dopo il distacco con Tripsina/EDTA dalla piastra, le cellule sono state lavate per due volte con PBS I X erisospese in 200 μl di soluzione ipotonica contenente Ioduro di Propidio (50 $\mu\text{g/ml}$ di PI, 0,1% di Sodio Citrato, e 0,1% di Triton-X-100).

In questo modo lo ioduro dipropidio può entrare in tutte le cellule analizzate, perché è permeabilizzate con detergente.

I campioni sono stati incubati per 15 minuti a 37°C e poi trasferiti a +4°C al buio per un'ora. Il contenuto di DNA delle cellule è stato poi misurato tramite citofluorimetro FACScantoll (Becton and Dickinson, Lincoln park NJ. U.S.A.).

I detriti cellulari vengono esclusi dall'analisi alzando la soglia del forward scatter.

La curva di fluorescenza ottenuta dall'elaborazione dei dati, detta Histogram Plot, presenta due picchi, il primo dei quali rappresenta la fase G1 del ciclo cellulare, interposta tra la fine della mitosi e l'inizio della sintesi del DNA, ed il secondo picco è indicativo della fase G2 premitotica. La depressione tra i due picchi rappresenta la fase di sintesi del DNA o fase S.

3.11 SAGGIO DI FORMAZIONE MAMMOSPHERE

Cellule B02 silenziate per $\alpha 5$ e cellule B02 transdotte con shRNA di controllo (scramble) sono state risospese in MammoCult medium (StemCell Technologies) e seminate in triplicato in camere ad adesione ultra bassa (Cytocapture, PAA) alla densità di 3×10^5 /ml. Le cellule sono state coltivate per 7 giorni a 37°C e successivamente contate e misurate in dimensione utilizzando il software Imagej. Sono state considerate mammosfere aggregati cellulari di diametro maggiore di 70 micron. La componente staminale all'interno degli sferoidi è stata analizzata tramite marcatura con il kit ALDEFLUOR (StemCell).

3.12 MODELLI IN VIVO

L'esperimento di tumorigenesi è stato condotto inoculando 10^6 cellule B02 risospese in $100\mu\text{l}$ di PBS nel sottocute di topi BALB/c nude (Charles River) di 4 settimane di età. La crescita del tumore nel singolo animale è stata seguita tramite misurazione con calibro fino a quando il tumore ha raggiunto il volume 30mm^3 .

Al raggiungimento di tale volume l'animale è stato randomizzato a ricevere M200 (15mg/kg tre volte a settimana) o Vehicle (PBS). Al termine della randomizzazione 7 animali hanno ricevuto trattamento con M200 e 7 con Vehicle. Gli animali sono stati seguiti con misurazioni con calibro e con analisi del segnale di bioluminescenza (NightOwl, Berthold) due volte a settimana per tutta la durata del trattamento (36 giorni).

L'esperimento di sviluppo di metastasi ossee è stato condotto inoculando 10^6 cellule B02 risospese in $100\mu\text{l}$ di PBS nella vena principale della coda di topi BALB/c nude (Charles River) di 4 settimane di età. Il giorno precedente all'inoculazione l'animale è stato randomizzato a ricevere M200 (15mg/kg tre volte a settimana) o Vehicle (PBS) ed è stato sottoposto alla prima somministrazione di trattamento. Al termine della randomizzazione 13 animali hanno ricevuto trattamento con M200 e 12 con Vehicle. Gli animali sono stati seguiti con misurazioni con analisi del segnale di bioluminescenza (NightOwl, Berthold) e radiografie degli arti inferiori (MX-20; Faxitron X-ray Corporation) due volte a settimana (fino al giorno 18) e al giorno finale del protocollo (giorno 28). Dopo il sacrificio gli arti inferiori sono stati raccolti per permettere di effettuare analisi di istomorfometria.

L'esperimento di colonizzazione del midollo osseo è stato condotto inoculando 10^6 cellule B02 risospese in $100\mu\text{l}$ di PBS nella vena principale della coda di topi BALB/c nude (Charles River) di 4 settimane di età. Il giorno precedente all'inoculazione l'animale è stato randomizzato a ricevere M200 (15mg/kg tre volte a settimana) o Vehicle (PBS) ed è stato sottoposto alla prima somministrazione di trattamento. Al termine della randomizzazione 9

animali hanno ricevuto trattamento con M200 e 9 con Vehicle. Al giorno 7 tutti gli animali sono stati sacrificati e il midollo osseo proveniente dagli arti inferiori è stato raccolto e posto in coltura sotto selezione antibiotica con puromicina per 15 giorni. Al termine della selezione le colonie formate dalle cellule tumorali disseminate nel midollo (DTC) sono state colorate con cristal violet e contate.

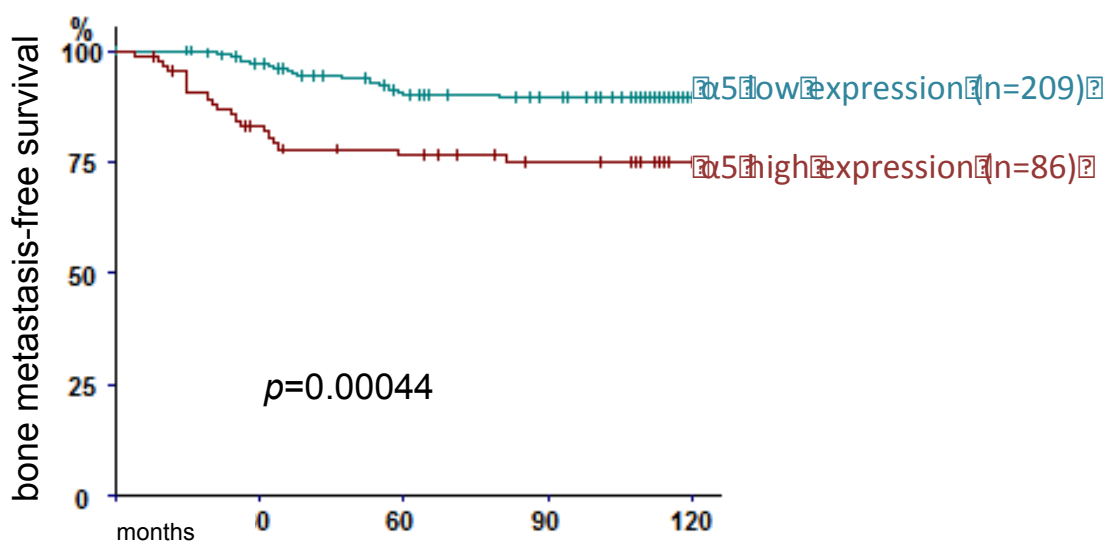
3.13 ANALISI STATISTICA

Gli esperimenti in vitro sono stati analizzati utilizzando test di Student o test ANOVA seguito dal test di Tukey per comparazioni multiple. Per gli esperimenti in vivo sono stati utilizzati il test U di Mann-Whitney o il test ANOVA a 2 vie seguito dal test di Bonferroni per comparazione multiple. Per l'analisi delle coorti di pazienti affette da neoplasia mammaria la sopravvivenza libera da malattia ossea è stata determinata utilizzando il metodo di Kaplan-Meier. Le differenze in termini di sopravvivenza secondo le variabili prognostiche sono state determinate log-rank test. L'Hazard ratio e gli intervalli di confidenza al 95% sono stati calcolati con la regressione di Cox stratificata. Il modello di rischio Cox proporzionale è stato applicato all'analisi multivariata. Le variabili continue come i livelli di espressione del gene $\alpha 5$ sono state dicotomizzate utilizzando il metodo "receiver operating characteristic" (ROC). L'analisi statistica è stata effettuata con GraphPad Prism versione 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) e SPSS versione 20.00 (SPSS, Inc., Chicago). Un P-value a due code <0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

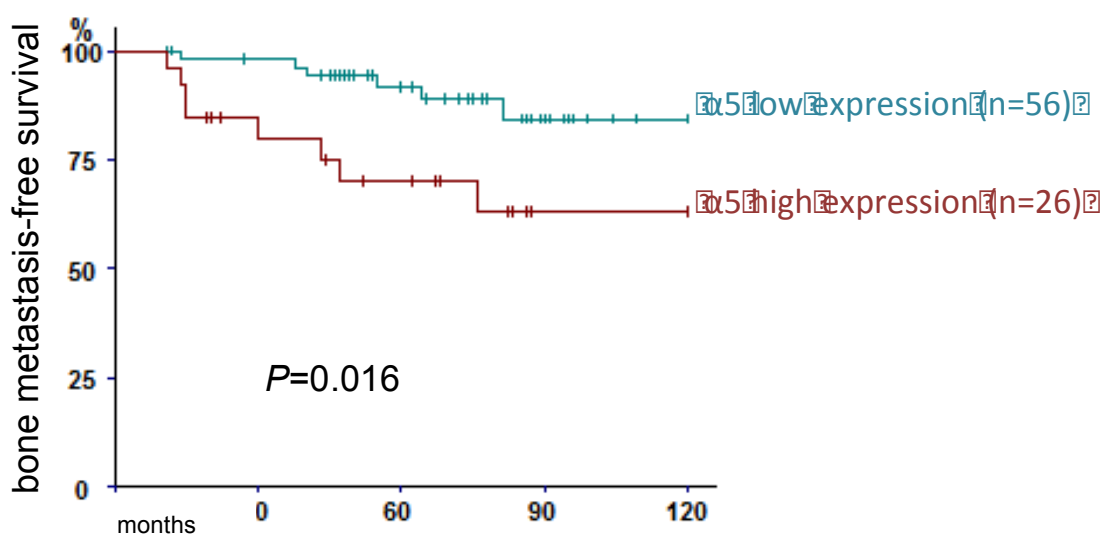
4. RISULTATI

4.1 ANALISI UNIVARIATA DELLA SOPRAVVIVENZA NEGLI STUDI DI MICROARRAY

Le curve di Kaplan-Meier mostrano una correlazione significativa tra elevati livelli di mRNA di $\alpha 5$ e prognosi ossea peggiore (bone metastasis free survival) sia nella coorte NKI ($p=0.00044$) che nella piccola coorte di controllo "MSKCC" (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE2603>) ($n = 82$) formata da tumori localmente avanzati (66% positività linfonodale).



Analisi univariata della sopravvivenza libera da metastasi ossee nella coorte NKI.



Analisi univariata della sopravvivenza libera da metastasi ossee nella coorte MSKCC

4.2 FASE SPERIMENTALE: ESPRESSIONE DI $\alpha 5$ E CARATTERISTICHE CLINICO-PATOLOGICHE IN PAZIENTI AFFETTE DA NEOPLASIA MAMMARIA

Abbiamo quindi deciso di effettuare analisi qRT-PCR di $\alpha 5$ nella nostra casistica indipendente costituita da 427 campioni di neoplasia mammaria radicalmente asportate.

Characteristics	All patients (n=427)	High $\alpha 5$ (n=90)	Low $\alpha 5$ (n=337)	p (χ^2)
Metastasis	163 (38%)	47 (52%)	116 (34%)	0.002
Age (>50y)	340 (80%)	67 (74%)	273 (81%)	NS
Macroscopic tumor size (>25mm)	210 (50%)	45 (50%)	165 (50%)	NS
Grade 3	148 (35%)	44 (49%)	104 (32%)	0.002
ER negative	109 (25.5%)	35 (47%)	74 (22%)	0.001
PR negative	184 (43%)	50 (55.5%)	134 (38%)	0.007
ERBB2 positive	90 (21%)	34 (38%)	56 (17%)	< 0.001
Lymph node status (>3 node)	92 (22%)	20 (22%)	72 (21%)	NS

Correlazione tra fattori prognostici clinico-molecolari ed espressione di $\alpha 5$ nella coorte di 427 pazienti della fase sperimentale.

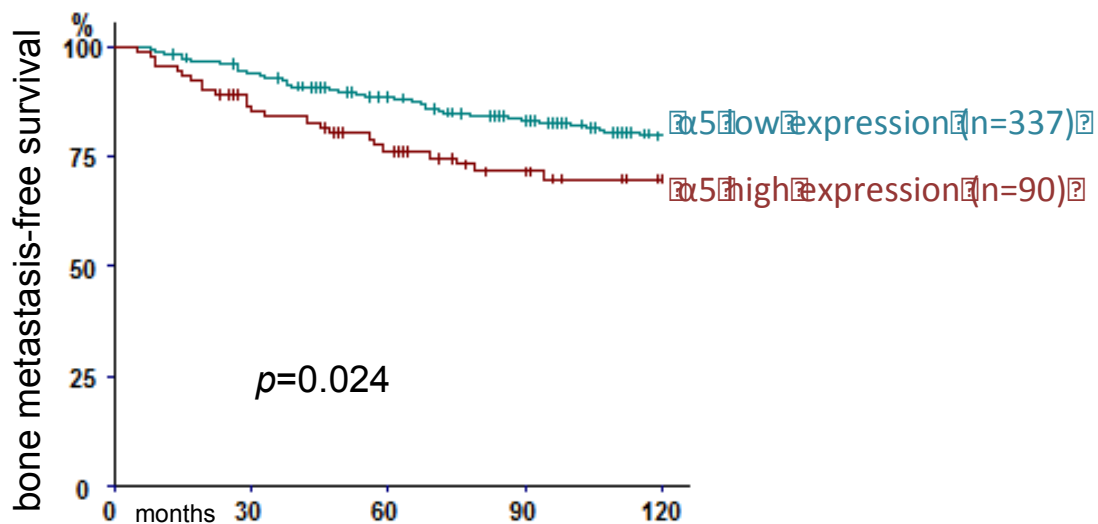
Overespressione di $\alpha 5$ è stata riscontrata nel 21% delle pazienti. Il 52% delle pazienti con overespressione ha sviluppato metastasi contro il 34% delle pazienti con bassa espressione ($p=0.002$). Inoltre l'iperespressione $\alpha 5$ correla con un grading elevato (49% vs 32%; $p=0.002$), con negatività per recettore per gli estrogeni (47% vs 22%; $p=0.001$), negatività del recettore per il progesterone (55,5% vs 38%; $p=0.002$) e positività per recettore ERBB2 (38% vs 17%; $p<0,0001$). Non ci sono correlazioni significative con il volume tumorale, l'interessamento linfonodale e l'età delle pazienti.

4.3 CORRELAZIONE TRA DATI CLINICO-PATOLOGICI E SOPRAVVIVENZA LIBERA DA MALATTIA SCHELETRICA (SDFS) (ANALISI UNIVARIATA)

I dati di follow-up erano disponibili per tutti i casi, con un follow-up mediano di 120,5 mesi. L'analisi univariata non ha mostrato alcuna correlazione tra fattori prognostici come età, volume tumorale, grading e stato HER2/neu, ER e PGR con SDFS (dati non mostrati). Soltanto il coinvolgimento linfonodale è risultato essere significativamente associato con una precoce recidiva ossea ($p<0.001$).

4.4 CORRELAZIONE TRA ESPRESSIONE DI RANK E SOPRAVVIVENZA LIBERA DA MALATTIA SCHELETRICA (SDFS) (ANALISI UNIVARIATA)

Per stabilire il ruolo di $\alpha 5$ nel determinare la prognosi scheletrica, i casi sono stati stratificati in base all'espressione qRT-PCR utilizzando il metodo ROC : $\alpha 5$ -positivi (espressione elevata) versus $\alpha 5$ -negativi (bassa espressione). L'analisi univariata ha mostrato un'associazione tra espressione di $\alpha 5$ e SDFS (skeletal disease free survival). In particolare, nelle pazienti con over-espressione di $\alpha 5$ la SDFS è risultata essere più breve di quella delle pazienti affette da neoplasie $\alpha 5$ -negative ($P=0.024$).



Analisi univariata della sopravvivenza libera da metastasi ossee nella coorte nella coorte di 427 pazienti della fase sperimentale.

4.5 ANALISI MULTIVARIATA

L'analisi multivariata secondo il modello di rischio Cox proporzionale ha dimostrato che sia lo stato linfonodale che l'espressione di $\alpha 5$ sono fattori prognostici indipendenti per sviluppo precoce di metastasi ossee ($p= 0.0003$ e 0.04 , rispettivamente).

Covariable	Hazard Ratio	95% C.I	p
Lymph node	2.32	1.47 - 3.66	0.0003
$\alpha 5$ expression	1.65	1.02 - 2.67	0.04
Tumor size			NS
Grading			NS
Age			NS
RE			NS

Analisi multivariata della SDFS nella coorte nella coorte di 427 pazienti della fase sperimentale

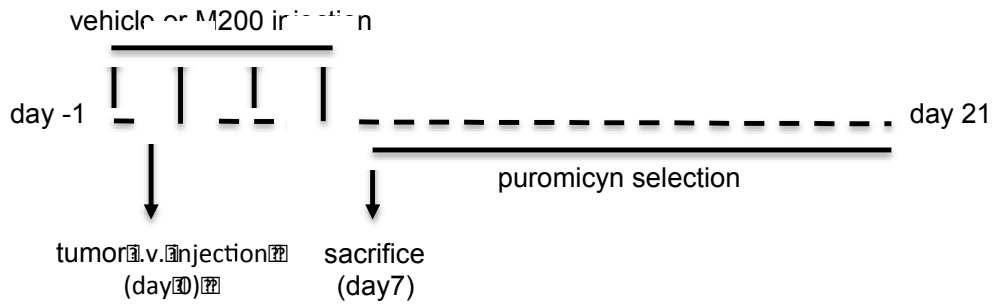
4.6 MODELLI IN VIVO

Per stabilire il ruolo di un trattamento con anticorpi bloccanti la subunità integrinica $\alpha 5$ (M200) nello sviluppo di metastasi ossee da neoplasia mammaria sono stati condotti 3 differenti protocolli miranti ad elucidare differenti aspetti del processo di metastatizzazione ossea.

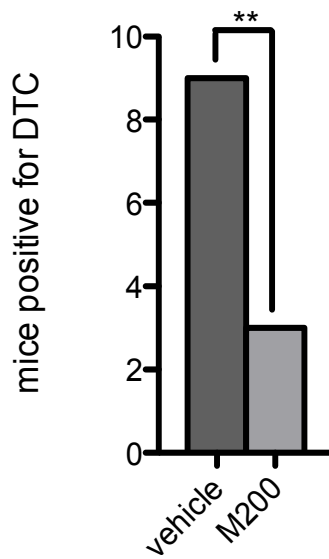
Modello 1: Trattamento preventivo con flushing del midollo precoce (7giorni)

L'esperimento di colonizzazione del midollo osseo è stato condotto inoculando 10^6 cellule B02 risospese in 100 μ l di PBS nella vena principale della coda di topi BALB/c nude di 4 settimane di età. Il giorno precedente all'inoculazione l'animale è stato randomizzato a ricevere M200 (15mg/kg tre volte a settimana) o Vehicle (PBS) ed è stato sottoposto alla prima somministrazione di trattamento. Al termine della randomizzazione 9 animali hanno ricevuto trattamento con M200 e 9 con Vehicle. Al giorno 7 tutti gli animali sono stati sacrificati e il midollo osseo proveniente dagli arti inferiori è stato raccolto e posto in coltura sotto selezione antibiotica con puromicina per 15 giorni. Al termine della selezione le colonie formate dalle cellule tumorali disseminate nel midollo (disseminated tumor cells :DTC) sono state colorate con cristal violet e contate.

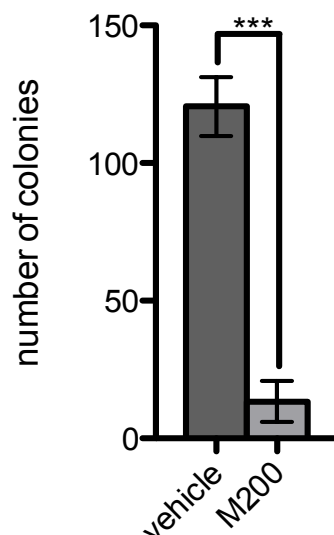
Tale protocollo è stato in grado di fornire informazione sul coinvolgimento di $\alpha 5$ nelle prime fasi della disseminazione delle cellule tumorali circolanti (homing) nel midollo osseo.



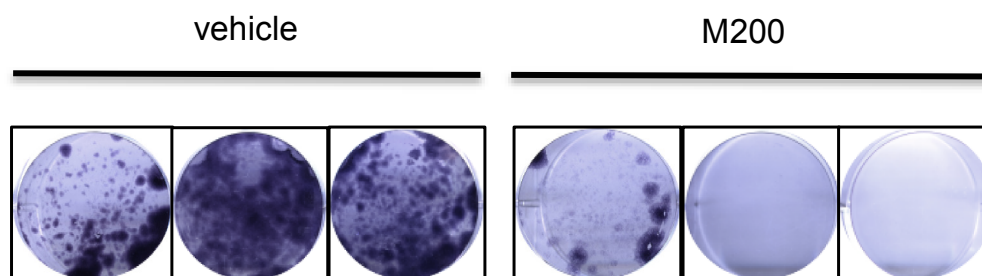
Modello 1: Trattamento preventivo con flushing del midollo precoce (7giorni)



Numero di animali con micrometastasi midollari nei due gruppi di trattamento. La significatività statistica è stata determinata tramite test Fisher; ** $p < 0,001$



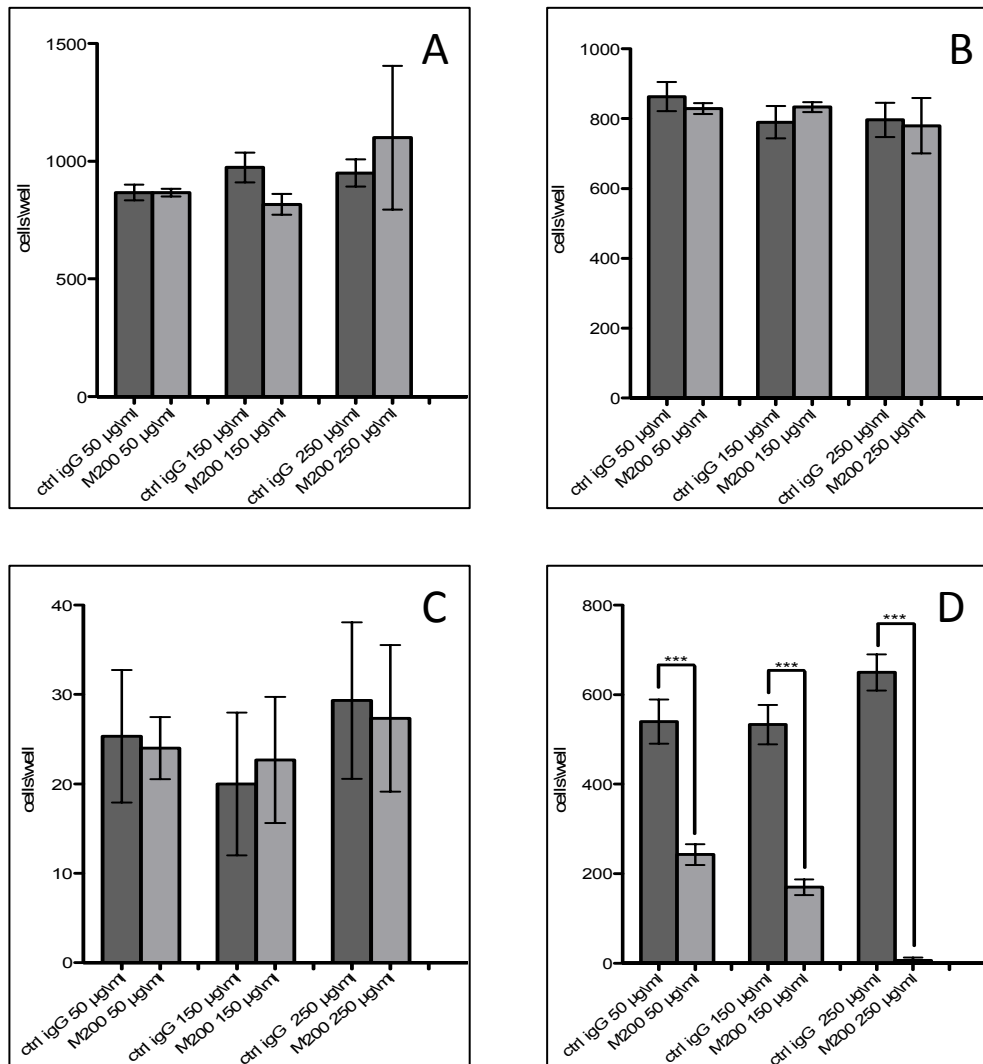
Numero di micrometastasi (colonie) midollari nei due gruppi di trattamento. I dati sono rappresentati come media \pm SEM. La significatività statistica è stata determinata tramite test U di Mann-Whitney; *** $p < 0,0001$



Immagini rappresentative di micrometastasi (colonie) midollari nei due gruppi di trattamento.

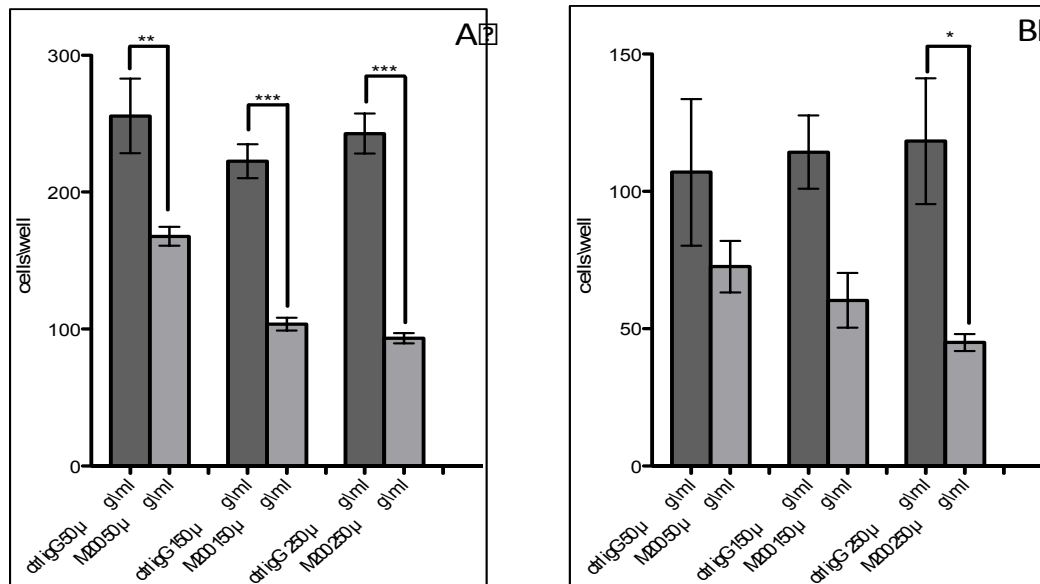
La forte diminuzione della colonizzazione midollare da parte delle cellule tumorali registrata in questo protocollo "in vivo" è stato imputato ad un effetto diretto del blocco integrina sull'efficienza dei processi di adesione, migrazione e invasione.

Per averne conferma sono stati condotti specifici esperimenti "in vitro". I saggi di adesione condotti con concentrazioni crescenti di M200 su differenti componenti ECM (collagene di tipo I, vitronectina, osteopontina e fibronectina) hanno confermato che M200 è in grado di inibire l'adesione alla fibronectina (ligando specifico dell'integrina $\alpha_5\beta_1$) delle cellule tumorali B02 selettivamente ed in maniera dose dipendente



Immagini rappresentative di micrometastasi (colonie) midollari nei due gruppi di trattamento. Effetto sull'adesione del trattamento con M200 delle cellule tumorali B02 a diversi costituenti dell' ECM (A) collagene di tipo I (B) vitronectina (C) osteopontina (D) fibronectina. I dati sono presentati come media \pm SEM. La significatività statistica è stata determinata tramite test ANOVA ad 1 via seguito del test di Tukey per comparazioni multiple; *** $p < 0.001$

Allo stesso modo è stata testata in vitro la capacità dell'anticorpo M200 di inibire la migrazione e l'invasione.



Effetto sulla migrazione (A) e invasione (B) del trattamento con M200 delle cellule tumorali. I dati sono presentati come media \pm SEM. La significatività statistica è stata determinata tramite test ANOVA ad 1 via seguito del test di Tukey per comparazioni multiple; * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$

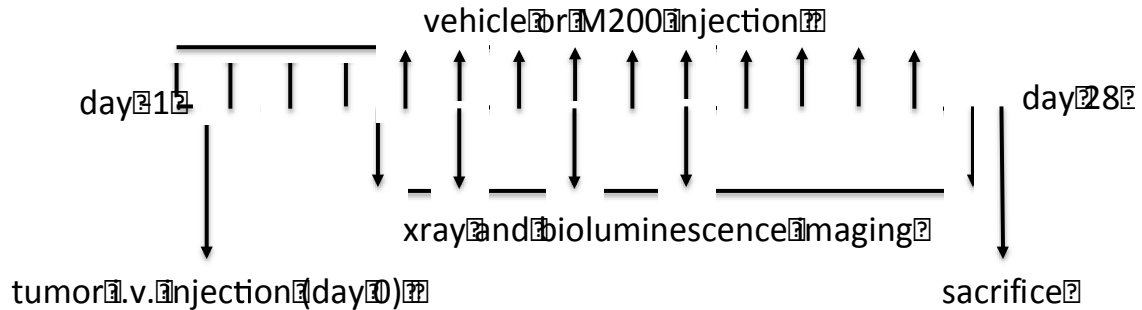
M200 è risultato in grado di inibire in maniera dose dipendente la migrazione delle cellule tumorali B02, ed essere in grado di ridurre la capacità di invasione attraverso Matrigel solo a concentrazioni elevate.

Tale differenza va valutata alla luce del fatto che la composizione del Matrigel è praticamente priva di fibronectina

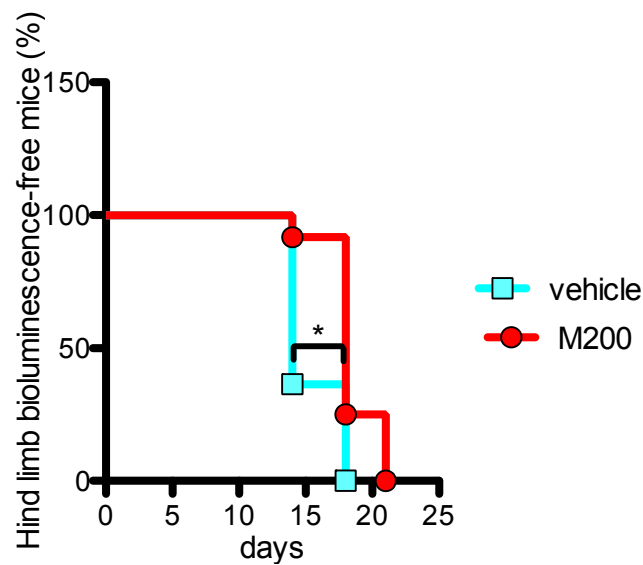
Modello 2: Trattamento long term delle metastasi ossee

L'esperimento di trattamento a lungo termine è stato condotto inoculando 10^6 cellule B02 risospese in 100µl di PBS nella vena principale della coda di topi BALB/c nude (Charles River) di 4 settimane di età. Il giorno precedente all'inoculazione l'animale è stato randomizzato a ricevere M200 (15mg/kg tre volte a settimana) o Vehicle (PBS) ed è stato sottoposto alla prima somministrazione di trattamento. Al termine della randomizzazione 13 animali hanno ricevuto trattamento con M200 e 12 con Vehicle. Gli animali sono stati seguiti con misurazioni con analisi del segnale di bioluminescenza e radiografie degli arti inferiori (due volte a settimana (fino al giorno 18) e al giorno finale del protocollo (giorno 28)). Dopo il sacrificio gli arti inferiori sono stati raccolti per permettere di effettuare analisi di istomorfometria.

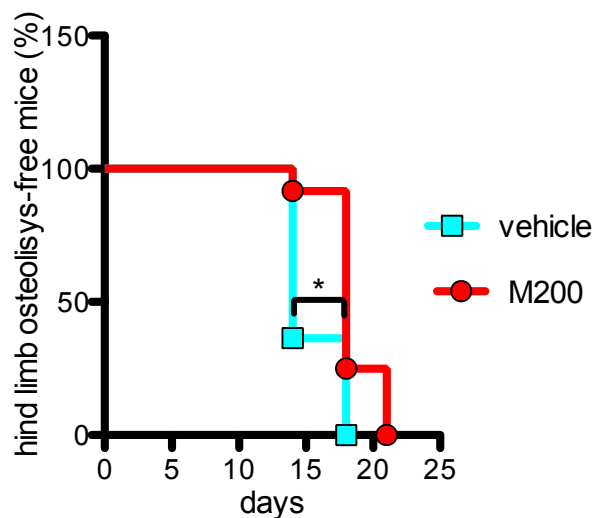
Tale protocollo è stato in grado di fornire informazioni sull'impatto del blocco $\alpha 5$ durante tutte le fasi di sviluppo della lesione metastatica ossea, in particolare fornendo informazioni sul tempo alla comparsa di lesioni rilevabili e sulla loro estensione al termine del protocollo.



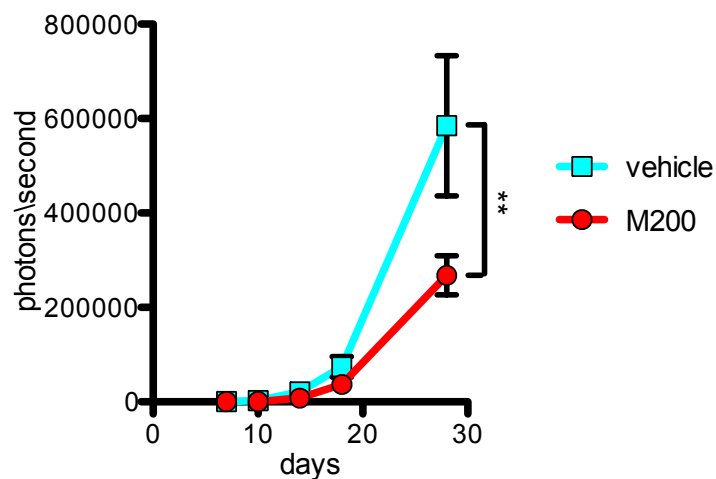
Modello 2: Trattamento long term delle metastasi ossee



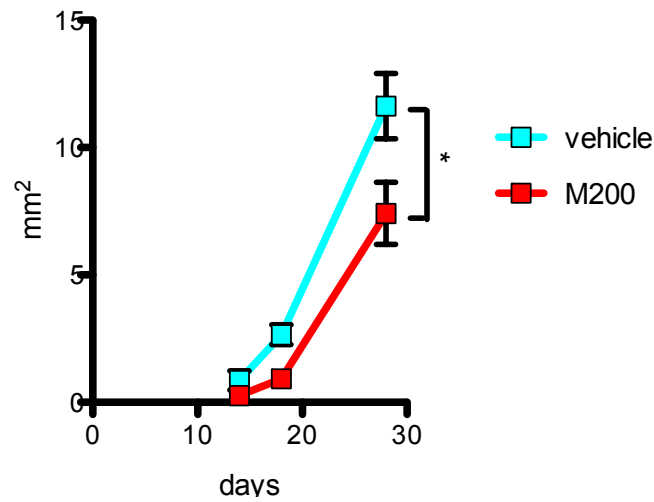
Percentuale di animali liberi da segnali di bioluminescenza a carico degli arti inferiori rappresentata tramite curve di Kaplan-Meier. La significatività statistica è stata valutata tramite log-rank test; * $p=0.0180$ (HR = 4.648; 95% CI of ratio = 1.301 to 16.61)



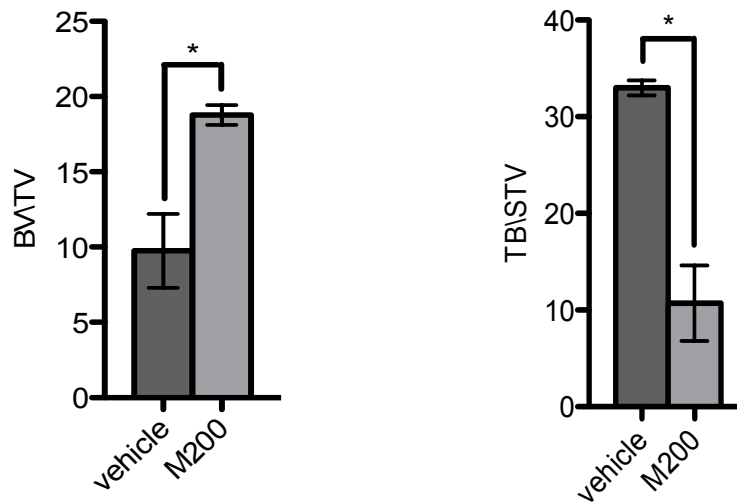
Percentuale di animali liberi da segnali aree di osteolisi a carico degli arti inferiori rappresentata tramite curve di Kaplan-Meier. La significatività statistica è stata valutata tramite log-rank test; $p=0.0036$ ($HR = 8.435$; 95% CI of ratio = 2.007 to 35.43)



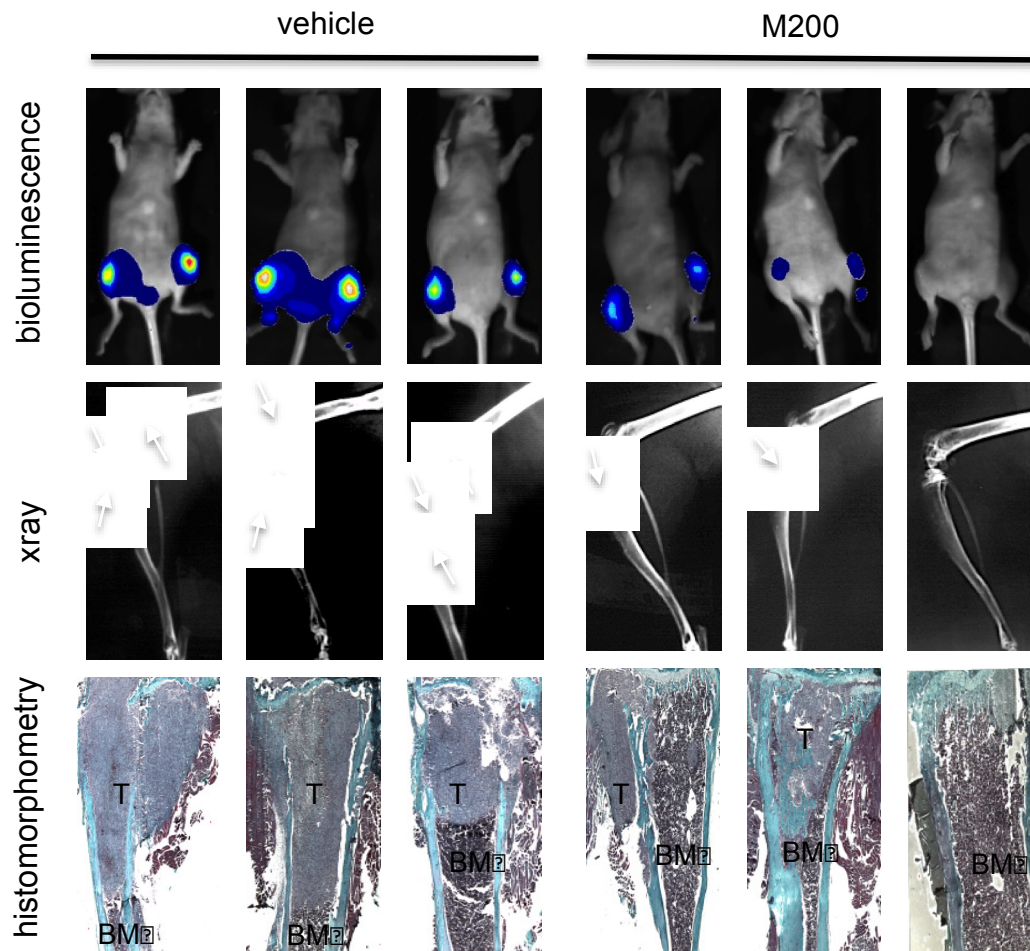
Intensità del segnale di bioluminescenza espressa in fotoni per secondo. I dati sono presentati come media \pm SEM. La significatività statistica è stata determinata tramite test ANOVA a 2 vie seguito da test di Bonferroni per comparazioni multiple; ** $p<0.001$



Estensione delle aree di osteolisi espressa in mm². I dati sono presentati come media \pm SEM. La significatività statistica è stata determinata tramite test ANOVA a 2 vie seguito da test di Bonferroni per comparazioni multiple; ** $p < 0.01$



Analisi istomorfometrica. I dati sono presentati come media \pm SEM. La significatività statistica è stata determinata tramite test U di Mann Whitney. * $p < 0.01$; BV|TV (bone volume\tumor volume); TB|STV (tumor burden\soft tissue volume)



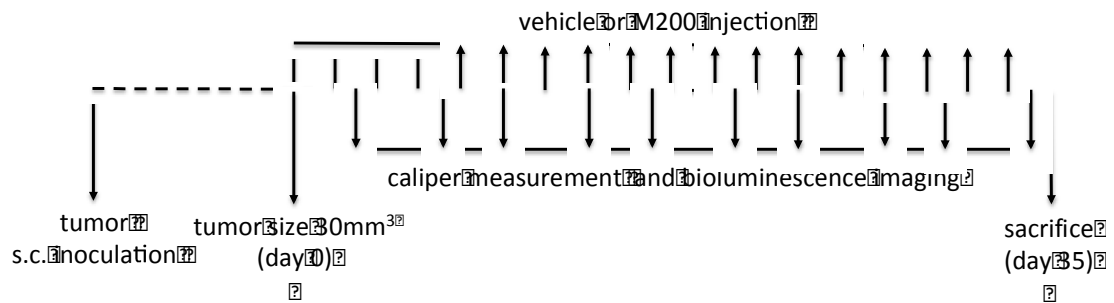
Immagini rappresentative delle analisi di bioluminescenza, radiografiche e istomorfometriche nei due gruppi di trattamento

M200 è risultato essere in grado di aumentare in maniera statisticamente significativa il tempo all'insorgenza di metastasi ossee rilevabili con modalità non invasive (bioluminescenza e radiografie) e di ridurre il volume tumorale rilevato tramite modalità non invasive (bioluminescenza e radiografie) e mediante analisi istomorfometriche. In merito a quest'ultime in particolare si è registrato un aumento del rapporto BV/TV (bone volume/tumor volume) indice di una ridotta distruzione ossea e di un contestuale aumento del rapporto TB/STV (tumor burden/soft tissue volume) che indice di un ridotto volume tumorale all'interno della cavità midollare.

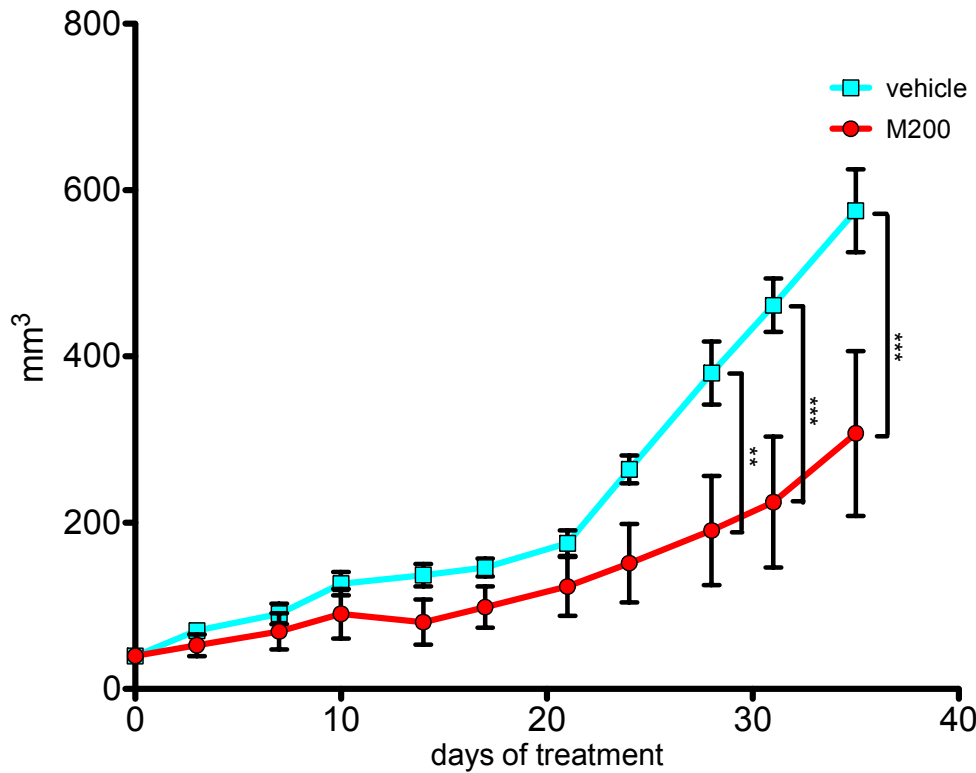
Modello 3: Protocollo di tumorigenesi

L'esperimento di tumorigenesi è stato condotto inoculando 10^6 cellule B02 risospese in 100 μ l di PBS nel sottocute di topi BALB/c nude di 4 settimane di età. La crescita del tumore nel singolo animale è stata seguita tramite misurazione con calibro fino a quando il tumore ha raggiunto il volume 30mm³. Al raggiungimento di tale volume l'animale è stato randomizzato a ricevere M200 (15mg/kg tre volte a settimana) o Vehicle (PBS). Al termine della randomizzazione 7 animali hanno ricevuto trattamento con M200 e 7 con Vehicle. Gli animali sono stati seguiti con misurazioni con calibro e con analisi del segnale di bioluminescenza due volte a settimana per tutta la durata del trattamento (35 giorni).

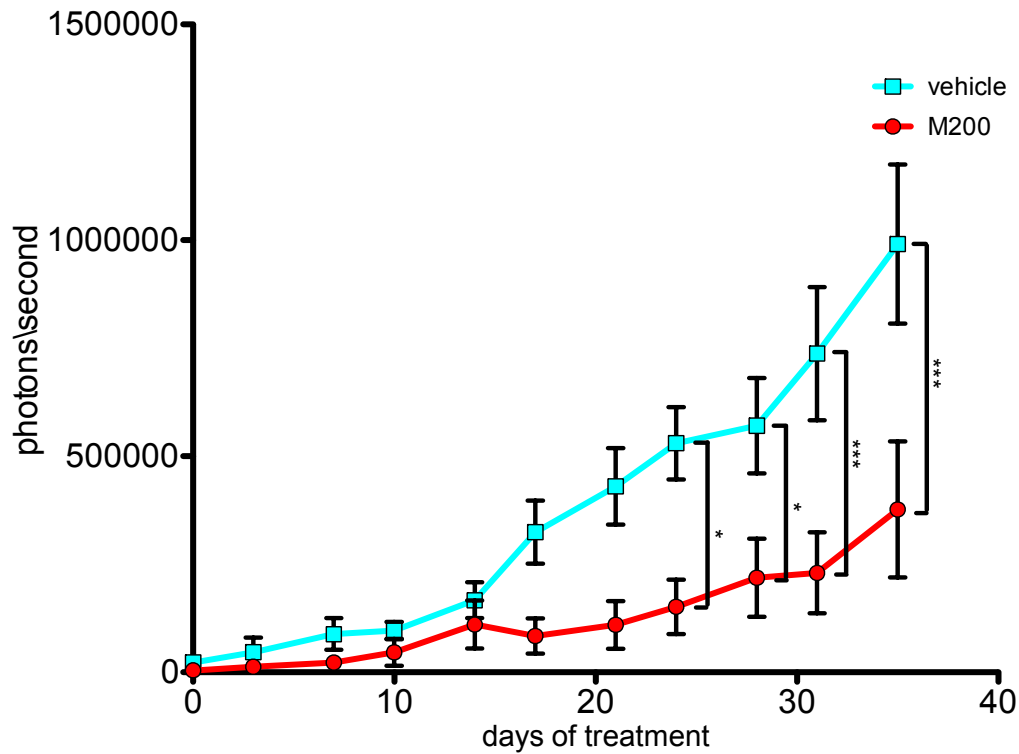
Tale protocollo è stato in grado di fornirci informazioni riguardo l'impatto del blocco $\alpha 5$ sulla crescita tumorale in un modello disegnato per non risentire degli effetti di altri processi (homing).



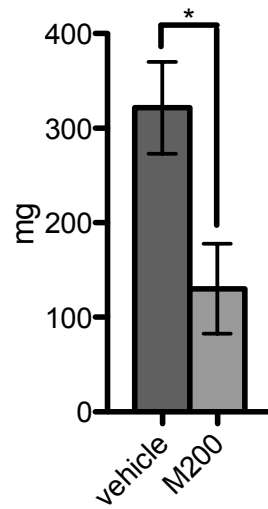
Modello 3: Protocollo di tumorigenesi



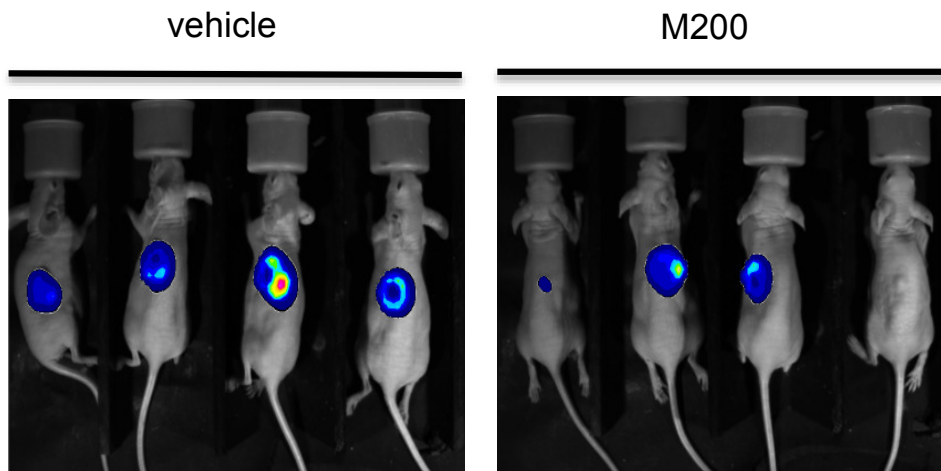
Volume tumorale misurato mediante il calibro espresso in mm^3 . I dati sono presentati come media \pm SEM. La significatività statistica è stata determinata tramite test ANOVA a 2 vie seguito da test di Bonferroni per comparazioni multiple; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$



Intensità del segnale di bioluminescenza espressa in fotoni per secondo. I dati sono presentati come media \pm SEM. La significatività statistica è stata determinata tramite test ANOVA a 2 vie seguito da test di Bonferroni per comparazioni multiple; * $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$

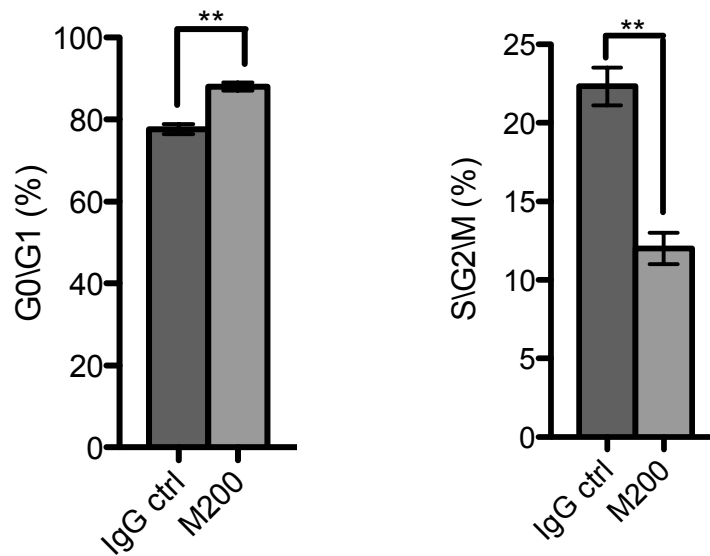


*Peso tumorale misurato al termine del protocollo espresso in mg I dati sono presentati come media \pm SEM. La significatività statistica è stata determinata tramite test U di Mann Whitney; * $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$*



Immagini rappresentative delle analisi di bioluminescenza, nei due gruppi di trattamento al giorno 35

Alla luce della significativa riduzione delle a crescita tumorale registrata negli animali trattati con M200 è stata eseguita una analisi del ciclo cellulare in vitro.

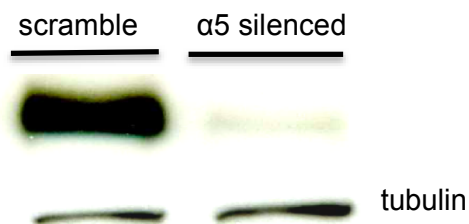


Analisi della percentuale di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare I dati sono presentati come media \pm SEM. La significatività statistica è stata determinata tramite test di Student; ** $p < 0.001$

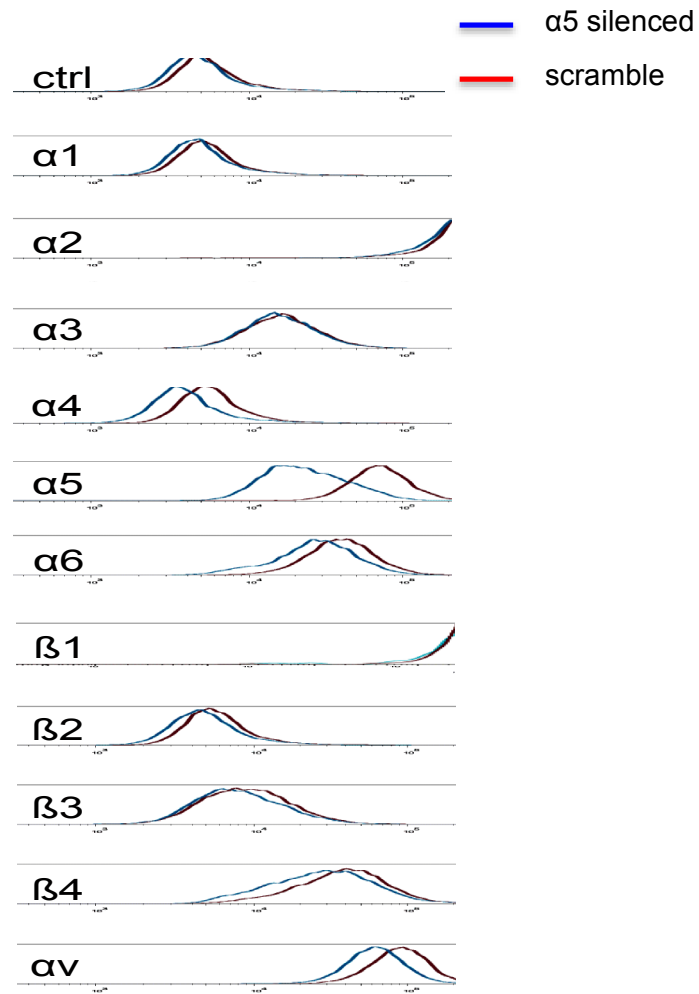
L'analisi del ciclo cellulare ha mostrato che il trattamento con M200 è in grado di incrementare in maniera significativa la percentuale di cellule in fase di quiescenza (G0+G1) e contestualmente ridurre le cellule in fase proliferativa (S/G2/M)

4.7 SILENZIAMENTO STABILE DEL GENE E ANALISI DELL'EFFICIENZA DI FORMAZIONE DI MAMMOSFERE

Il silenziamento stabile del gene, la linea cellulare B02 è stata transdotta con $\alpha 5$ short hairpin RNA ($\alpha 5$ silenced) o con uno short hairpin RNA control (Scramble) utilizzando particelle lentivirali



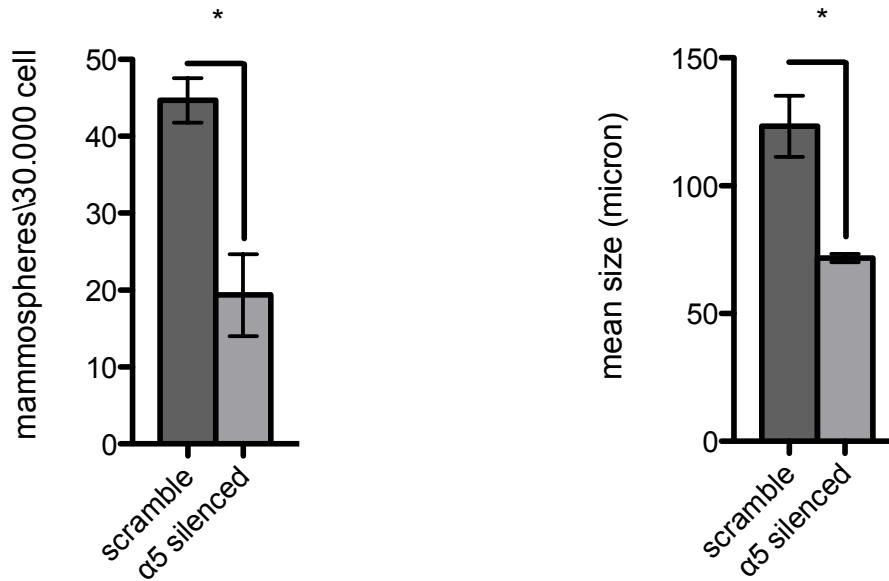
Immagini rappresentative dell'analisi di espressione proteica di $\alpha 5$ Western Blot delle due linee cellulari generate



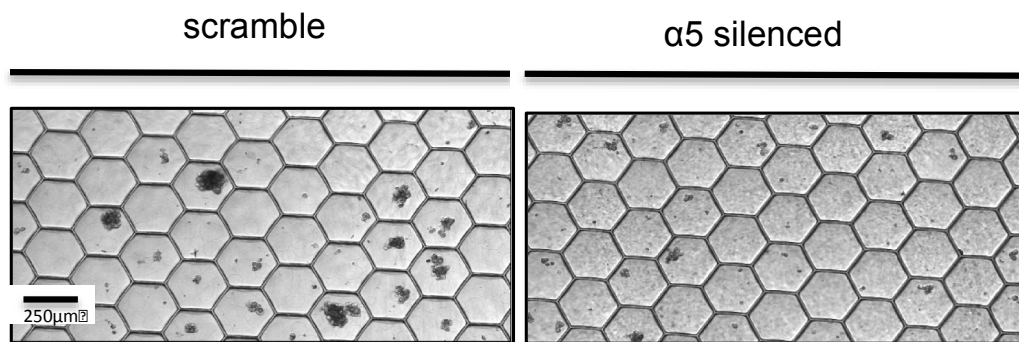
Analisi in citometria a flusso del profilo di espressione delle principali subunità integriniche nelle due linee cellulari generate

Dopo aver dimostrato l'efficienza e aver escluso fenomeni di upregolazione di altre subunità integriniche, si è provveduto a valutare la loro efficacia nel formare mammosfere.

Tale saggio ci ha permesso di ottenere informazioni sul ruolo di $\alpha 5$ in un modello in vitro disegnato per dare origine ad aggregati sferoidi arricchiti in cellule a potenziale staminale



Analisi dell'efficienza di formazione di mammosfere espressa in termine di resa (panel sinistro) e dimensioni (panel destro) I dati sono presentati come media \pm SEM. La significatività statistica è stata determinata tramite test di Student; ** $p < 0.01$

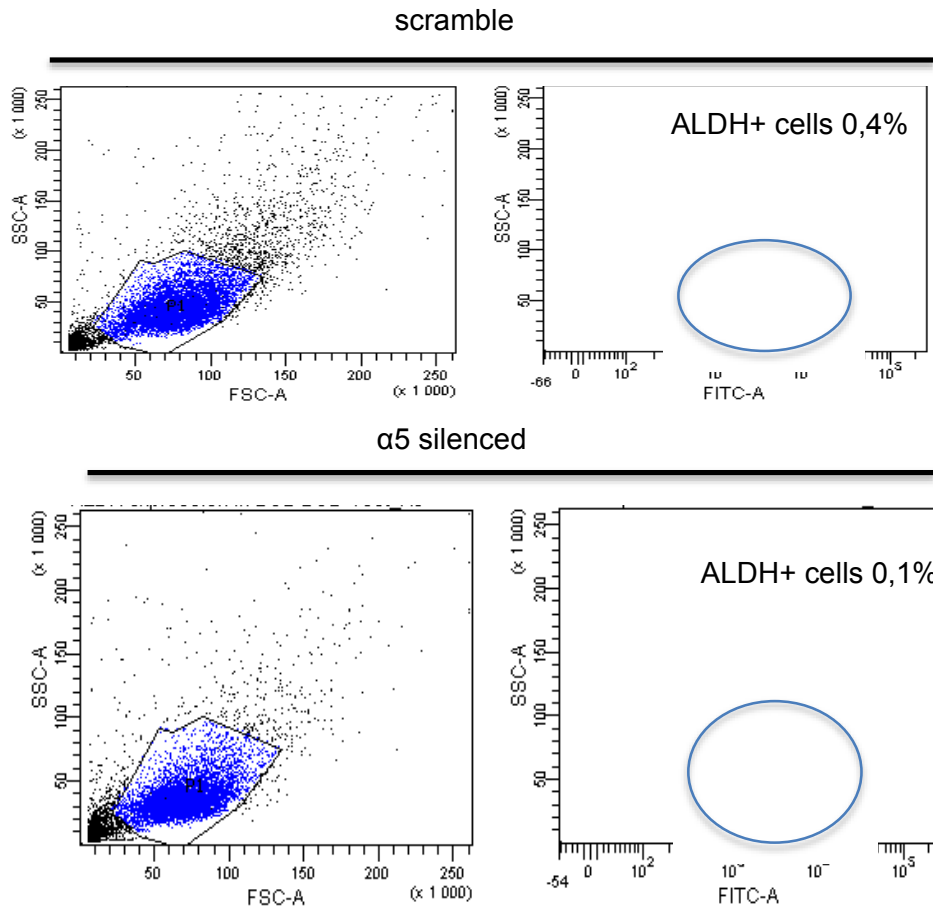


Immagini dell'efficienza di formazione di sferoidi delle due linee cellulari

Il silenziamento del gene $\alpha 5$ è in grado di ridurre l'efficienza di crescita di sferoidi arricchite di cellule a fenotipo staminale.

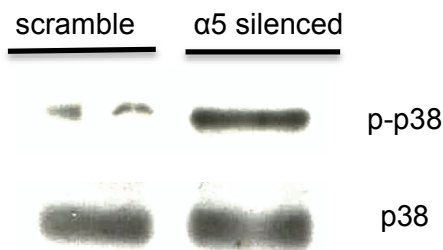
Tale dato è stato successivamente dimostrato tramite l'analisi in citometria a flusso del comparto staminale (cellule ALDH positive) all'interno della popolazione cellulare degli sferoidi.

Nello specifico la linea cellulare silenziata per $\alpha 5$ mostrava una ridotta percentuale di tale fenotipo cellulare 0,4% vs 0,1 della linea controllo.



Immagini rappresentativa dello scatterplot di citometria a flusso per positività ALDH nelle due linee cellulari generate

Infine è stato osservato che gli sferoidi formati da cellule silenziate per $\alpha 5$ esprimono livelli più alti dell'inibitore del ciclo cellulare p-p38.



Immagini rappresentative dell'analisi di espressione proteica di p38 e p-p38 Western Blot delle due linee cellulari generate

5. DISCUSSIONE

Le strategie attualmente disponibili per il trattamento delle metastasi osse sono mirate esclusivamente a ridurre il riassorbimento osseo di una lesione già clinicamente evidente. Per esempio i bifosfonati e primariamente gli aminobifosfonati (Zometa; Novartis) hanno ampiamente dimostrato la loro efficacia clinica nel prevenire i cosiddetti Skeletal Related Events (SREs). Più recentemente l'anticorpo monoclonale anti-RANKL Denosumab (Amgen) ha dimostrato di essere un' alternativa dotata di efficacia addirittura superiore all'acido zoledronico in alcuni setting. Tuttavia entrambe queste classi di trattamenti "bone target" in realtà agiscono esclusivamente riducendo il grado di distruzione ossea operato da un eccesso di attivazione osteoclastica nell'ambito di un circolo vizioso innescato dalla presenza di cellule tumorali in fase proliferante nell'ambito del midollo osseo. Pertanto rimane vacante una finestra di intervento terapeutico che riguarda le fasi più precoci del processo di metastatizzazione ossea come la fase dell'homing e la fase del passaggio da una fase di dormienza (quiescenza) ad una fase di attività e proliferazione.

Nel presente studio è stato dimostrato come, mediante analisi dei dati provenienti da microarray datasets e dallo studio ex novo di un'ampia coorte di pazienti, l'integrina $\alpha 5$ possa essere considerata un fattore prognostico indipendente in grado di predire la propensione alla metastatizzazione ossea da parte della neoplasia mammaria.

Tale evidenze sono state il punto di partenza per uno studio di tipo preclinico volto ad elucidare il reale ruolo biologico di tale molecola nell'ambito del processo di metastatizzazione ossea e l'impatto di un approccio terapeutico basato sull'uso di un anticorpo monoclonale (M200) bloccante la sua attività.

In tal modo è stato dimostrato in modelli murini che il blocco dell'attività di $\alpha 5$ mediante la somministrazione di M200 è in grado di ridurre drasticamente la colonizzazione midollare da parte di cellule circolanti della linea cellulare di neoplasia mammaria altamente osteotropica MDA-MB-231(B02).

Tale effetto è principalmente mediato dalla forte inibizione dell'adesione, della migrazione e dell' invasione come attestato dai saggi specifici "in vitro" condotti.

Inoltre il trattamento continuato è stato in grado negli animali trattati di ritardare l'insorgenza di metastasi ossee rilevabili e di ridurre il "tumor burden" all'interno delle stesse.

In un modello di tumorigenesi sottocutanea il trattamento continuo per 35 giorni ha determinato una netta riduzione della crescita tumorale dato confermato da concomitante una riduzione "in vitro" della frazione cellulare proliferante e da un' aumento della quota in quiescenza (G0-G1).

Infine il silenziamento stabile del gene $\alpha 5$ è in grado di ridurre significativamente la

crescita della cosiddette mammosfere dando un' indicazione indiretta del potenziale coinvolgimento di tale molecola nella propagazione della comparto staminale della neoplasia.

Tale indicazione è stata confermata dall' analisi della quota cellulare ALDH+ (marcatore delle cancer stem cells) all'interno delle sfere risultando notevolmente diminuita nel caso di Knock out di $\alpha 5$.

Parallelamente si è registrato un aumento della forma fosforilata di p-38 negli sferoidi $\alpha 5$ silenziati suggerendo che il meccanismo con cui si determina in vivo l'inibizione della proliferazione potrebbe essere legato ad un blocco del ciclo cellulare p38 mediato anche nel comparto più staminale del tumore.

La possibilità di sviluppare una "target therapy" per l'osso che inibisca le fasi più precoce della metastatizzazione potrebbe cambiare drammaticamente la storia naturale della malattia.

In particolare questo approccio terapeutico potrebbe determinare un'efficacia antitumorale nelle primissime fasi del processo metastatico a carico dell'osso conducendo, potenzialmente, ad un aumento del tempo al primo SRE e di conseguenza ad una riduzione delle disabilità individuali del singolo paziente, ad un miglioramento della qualità della vita ed a una riduzione dei costi connessi alla gestione delle complicanze scheletriche.

Data la disponibilità di agenti $\alpha 5$ (attualmente nelle prime fasi di sviluppo clinico come agenti anti-angiogenetici) l'approccio proposto potrebbe essere oggetto in tempi relativamente brevi di studi translazionali e/o clinici di validazione.

6. RINGRAZIAMENTI

Grazie Prof Tonini e Prof Santini: per l'esempio che siete e per la fiducia che mi avete dato.

Grazie Philippe Clézardin e Martine Croset per aver capito che valeva la pena fare un po' di strada insieme.

E soprattutto grazie Alessia: è inutile dire che senza di te non ce l'avrei fatta.. e non parlo (solo) della tesi

7. BIBLIOGRAFIA

1. Ridley, A.J. Life at the leading edge. *Cell* 145:1012-1022.
2. Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-687.
3. Hynes, R.O. 2004. The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biol* 23:333-340.
4. Tamkun, J.W. et al. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46:271-282 (1986)
5. Hynes, R.O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-554.
6. Dana, N. et al. Expression of a soluble and functional form of the human beta 2 integrin CD11b/CD18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3106-3110 (1991).
7. Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25 (1992).
8. Springer, T.A. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:65-72 (1997).
9. Fu, G. et al. Overview: structural biology of integrins. *Methods Mol Biol* 757:81-99.
10. Lee, J.O. et al. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* 80:631-638 (1995).
11. Luo, B.H. et al. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 25:619-647 (2007).
12. Hughes, P.E. et al. Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem* 271:6571-6574 (1996)
13. Shattil, S.J. et al. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:288-300.
14. Takagi, J. et al. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 110:599-511 (2002).
15. O'Toole, T.E. et al. Modulation of the affinity of integrin alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) by the cytoplasmic domain of alpha IIb. *Science* 254:845-847 (1991).
16. O'Toole, T.E. et al. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol* 124:1047-1059 (1994).
17. Wu, L. et al. Distinct FAK-Src activation events promote $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ integrin-stimulated neuroblastoma cell motility. *Oncogene* 27, 1439–1448 (2008).
18. Kren, A. et al. Increased tumor cell dissemination and cellular senescence in the absence of $\beta 1$ -integrin function. *EMBO J.* 26, 2832–2842 (2007).
19. Caswell, P. T. et al. Rab-coupling protein coordinates recycling of $\alpha 5\beta 1$ integrin and EGFR1 to promote cell migration in 3D microenvironments. *J. Cell Biol.* 183, 143–55 (2008).
20. Fournier, A. K. et al. Rac-dependent cyclin D1 gene expression regulated by cadherin- and integrin-mediated adhesion. *J. Cell Sci.* 121, 226–233 (2008).
21. Carrano, A. C. & Pagano, M. Role of the F-box protein Skp2 in adhesion-dependent cell cycle progression. *J. Cell Biol.* 153, 1381–1390 (2001).
22. Han, S. et al. Fibronectin stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways. *Cancer Res.* 66, 315–323 (2006).
23. Vellon, L. et al. $\alpha v\beta 3$ integrin regulates heregulin (HRG)-induced cell proliferation and survival in breast cancer. *Oncogene* 24, 3759–3773 (2005).
24. Asselin-Labat, M. L. et al. Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nature Cell Biol.* 9, 201–209 (2007).

25. Vaillant, F. *et al.* The mammary progenitor marker CD61/ β 3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* 68, 7711–7717 (2008).
26. Taverna, D. *et al.* A direct test of potential roles for β 3 and β 5 integrins in growth and metastasis of murine mammary carcinomas. *Cancer Res.* 65, 10324–10329 (2005).
27. Luo, M. *et al.* Mammary epithelial-specific ablation of the focal adhesion kinase suppresses mammary tumorigenesis by affecting mammary cancer stem/progenitor cells. *Cancer Res.* 69, 466–474 (2009).
28. Samanna, V. *et al.* Alpha-V-dependent outside-in signaling is required for the regulation of CD44 surface expression, MMP-2 secretion, and cell migration by osteopontin in human melanoma cells. *Exp. Cell Res.* 312, 2214–2230 (2006).
29. Avraamides, C. J. *et al.* Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Rev. Cancer* 8, 604–617 (2008).
30. Ribatti, D. The contribution of Harold F. Dvorak to the study of tumor angiogenesis and stroma generation mechanisms. *Endothelium* 14, 131–135 (2007).
31. J. I. *et al.* A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature* 456, 809–813 (2008).
32. Conti, J. A. *et al.* The desmoplastic reaction surrounding hepatic colorectal adenocarcinoma metastases aids tumor growth and survival via α v integrin ligation. *Clin. Cancer Res.* 14, 6405–6413 (2008).
33. Zhu, C. Q. *et al.* Integrin α 11 regulates IGF2 expression in fibroblasts to enhance tumorigenicity of human non-small-cell lung cancer cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 11754–11759 (2007). □
34. Taverna, D. *et al.* Increased primary tumor growth in mice null for β 3- or β 3/ β 5-integrins or selectins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 763–768 (2004).
35. Feng, W. *et al.* The angiogenic response is dictated by β 3 integrin on bone marrow-derived cells. *J. Cell Biol.* 183, 1145–1157 (2008). □
36. Jin, H. *et al.* A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *J. Clin. Invest.* 116, 652–662 (2006).
37. Jin, H. *et al.* Integrin α 4 β 1 promotes monocyte trafficking and angiogenesis in tumors. *Cancer Res.* 66, 2146–2152 (2006).
38. Bakewell, S. J. *et al.* Platelet and osteoclast β 3 integrins are critical for bone metastasis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 14205–14210 (2003).
39. Felding-Habermann, B. *et al.* Role of β 3 integrins in melanoma cell adhesion to activated platelets under flow. *J. Biol. Chem.* 271, 5892–5900 (1996).
40. Felding-Habermann, B. *et al.* Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 1853–1858 (2001).
41. Trikha, M. *et al.* Multiple roles for platelet GPIIb/IIIa and α v β 3 integrins in tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res.* 62, 2824–2833 (2002).
42. Guo, W. *et al.* β 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell* 126, 489–502 (2006).
43. White, D. E. *et al.* Targeted disruption of β 1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction. *Cancer Cell* 6, 159–170 (2004).
44. Macias-Perez, I. *et al.* Loss of integrin α 1 β 1 ameliorates Kras-induced lung cancer. *Cancer Res.* 68, 6127–6135 (2008).
45. Lahlou, H. *et al.* Mammary epithelial-specific disruption of the focal adhesion kinase blocks mammary tumor progression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 20302–20307 (2007).

46. Pylayeva, Y. *et al.* Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling. *J. Clin. Invest.* 119, 252–266 (2009).
47. Huveneers, S. *et al.* Integrin $\alpha\beta3$ controls activity and oncogenic potential of primed c-Src. *Cancer Res.* 67, 2693–2700 (2007).
48. Huveneers, S. *et al.* Integrins uncouple Src- induced morphological and oncogenic transformation. *J. Biol. Chem.* 283, 13243–13251 (2008).
49. Shimizu, H. *et al.* $\alpha6\beta1$ integrin induces proteasome- mediated cleavage of erbB2 in breast cancer cells. *Oncogene* 22, 831–839 (2003).
50. Borges, E. *et al.* Platelet-derived growth factor receptor β and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the $\beta3$ integrin through its extracellular domain. *J. Biol. Chem.* 275, 39867–39873 (2000).
51. Schneller, M. *et al.* $\alpha\beta3$ integrin associates with activated insulin and PDGF β receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *EMBO J.* 16, 5600–5607 (1997).
52. Soldi, R. *et al.* Role of $\alpha\beta3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J.* 18, 882–892 (1999).
53. Trusolino, L. *et al.* A signaling adapter function for $\alpha6\beta4$ integrin in the control of HGF- dependent invasive growth. *Cell* 107, 643–654 (2001).
54. Miyamoto, S. *et al.* Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J. Cell Biol.* 135, 1633–1642 (1996).
55. Caswell, P. T. *et al.* Rab-coupling protein coordinates recycling of $\alpha5\beta1$ integrin and EGFR1 to promote cell migration in 3D microenvironments. *J. Cell Biol.* 183, 143–55 (2008).
56. Spangenberg, C. *et al.* ERBB2-mediated transcriptional up-regulation of the $\alpha5\beta1$ integrin fibronectin receptor promotes tumor cell survival under adverse conditions. *Cancer Res.* 66, 3715–3725 (2006).
57. Yoon, S. O. *et al.* A novel mechanism for integrin-mediated ras activation in breast carcinoma cells: the $\alpha6\beta4$ integrin regulates ErbB2 translation and transactivates epidermal growth factor receptor/ErbB2 signaling. *Cancer Res.* 66, 2732–2739 (2006).
58. Ning, Y. *et al.* Activated epidermal growth factor receptor induces integrin $\alpha2$ internalization via caveolae/raft-dependent endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 282, 6380–6387 (2007).
59. Ning, Y. *et al.* Down-regulation of integrin $\alpha2$ surface expression by mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) induces aberrant cell spreading and focal adhesion formation. *Cancer Res.* 65, 9280–9286 (2005).
60. Engl, T. *et al.* CXCR4 chemokine receptor mediates prostate tumor cell adhesion through $\alpha5$ and $\beta3$ integrins. *Neoplasia* 8, 290–301 (2006).
61. Sun, Y. X. *et al.* Expression and activation of $\alpha\beta3$ integrins by SDF-1/CXC12 increases the aggressiveness of prostate cancer cells. *Prostate* 67, 61–73 (2007).
62. Grzesiak, J. J. *et al.* Integrin-mediated laminin-1 adhesion upregulates CXCR4 and IL-8 expression in pancreatic cancer cells. *Surgery* 141, 804–814 (2007).
63. Wang, S. E. *et al.* Transforming growth factor beta induces clustering of HER2 and integrins by activating Src-focal adhesion kinase and receptor association to the cytoskeleton. *Cancer Res.* 69, 475–482 (2009).
64. De, S. *et al.* VEGF-integrin interplay controls tumor growth and vascularization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 7589–7594 (2005).
65. Klemke, R. L. *et al.* Receptor tyrosine kinase signaling required for integrin $\alpha\beta5$ -directed cell motility but not adhesion on vitronectin. *J. Cell Biol.* 127, 859–866 (1994).

66. Brooks, P. C. *et al.* Insulin-like growth factor receptor cooperates with integrin $\alpha\beta 5$ to promote tumor cell dissemination *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 99, 1390–1398 (1997).
67. Ricono, J. M. *et al.* Specific cross-talk between epidermal growth factor receptor and integrin $\alpha\beta 5$ promotes carcinoma cell invasion and metastasis. *Cancer Res.* 69, 1383–1391 (2009).
68. Wayner, E. A. *et al.* Integrins $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ contribute to cell attachment to vitronectin but differentially distribute on the cell surface. *J. Cell Biol.* 113, 919–929 (1991).
69. Pouliot, N. *et al.* Laminin-10 mediates basal and EGF-stimulated motility of human colon carcinoma cells via $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ integrins. *Exp. Cell Res.* 266, 1–10 (2001).
70. Yang, C. *et al.* Integrin $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ are the key regulators of hepatocarcinoma cell invasion across the fibrotic matrix microenvironment. *Cancer Res.* 63, 8312–8317 (2003).
71. Moro, L. *et al.* Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J.* 17, 6622–6632 (1998).
72. Moro, L. *et al.* Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J. Biol. Chem.* 277, 9405–9414 (2002).
73. Bertotti, A. *et al.* $\beta 4$ integrin is a transforming molecule that unleashes Met tyrosine kinase tumorigenesis. *Cancer Res.* 65, 10674–10679 (2005).
74. Bertotti, A. *et al.* $\beta 4$ integrin activates a Shp2-Src signaling pathway that sustains HGF-induced anchorage-independent growth. *J. Cell Biol.* 175, 993–1003 (2006).
75. Chung, J. *et al.* The Met receptor and $\alpha 6\beta 4$ integrin can function independently to promote carcinoma invasion. *J. Biol. Chem.* 279, 32287–32293 (2004).
76. Crouch, S. *et al.* HGF and ligation of $\alpha\beta 5$ integrin induce a novel, cancer cell-specific gene expression required for cell scattering. *Exp. Cell Res.* 292, 274–287 (2004).
77. Sridhar, S. C. & Miranti, C. K. Tetraspanin KAI1/CD82 suppresses invasion by inhibiting integrin-dependent crosstalk with c-Met receptor and Src kinases. *Oncogene* 25, 2367–2378 (2006).
78. Munger, J. S. *et al.* The integrin $\alpha\beta 6$ binds and activates latent TGF $\beta 1$: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96, 319–328 (1999).
79. Ludbrook, S. B. *et al.* The integrin $\alpha\beta 3$ is a receptor for the latency-associated peptides of transforming growth factors $\beta 1$ and $\beta 3$. *Biochem. J.* 369, 311–318 (2003).
80. Marsh, D. *et al.* $\alpha\beta 6$ Integrin promotes the invasion of morphoeic basal cell carcinoma through stromal modulation. *Cancer Res.* 68, 3295–3303 (2008).
81. Van Aarsen, L. A. *et al.* Antibody-mediated blockade of integrin $\alpha\beta 6$ inhibits tumor progression *in vivo* by a transforming growth factor- β -regulated mechanism. *Cancer Res.* 68, 561–570 (2008).
82. Bates, R. C. *et al.* Transcriptional activation of integrin $\beta 6$ during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J. Clin. Invest.* 115, 339–347 (2005).
83. Galliher, A. J. & Schiemann, W. P. $\beta 3$ integrin and Src facilitate transforming growth factor-beta mediated induction of epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res.* 8, R42 (2006).
84. Galliher, A. J. & Schiemann, W. P. Src phosphorylates Tyr284 in TGF- β type II receptor and regulates TGF- β stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Res.* 67, 3752–3758 (2007).
85. Fransvea, E. *et al.* Targeting transforming growth factor (TGF)- β RI inhibits activation of $\beta 1$ integrin and blocks vascular invasion in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 49, 839–850 (2009).
86. Mahabeleshwar, G. H. *et al.* Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor

- cross-activation in angiogenesis. *Circ. Res.* 101, 570–580 (2007)
87. Hood, J. D. *et al.* Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science* 296, 2404–2407 (2002).
88. Byzova, T. V. *et al.* A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol. Cell* 6, 851–860 (2000).
89. Nikolopoulos, S. N. *et al.* Integrin $\beta 4$ signaling promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 6, 471–483 (2004).
90. Cardones, A. R. *et al.* CXCR4 enhances adhesion of B16 tumor cells to endothelial cells *in vitro* and *in vivo* via $\beta 1$ integrin. *Cancer Res.* 63, 6751–6757 (2003).
91. Hartmann, T. N. *et al.* CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene* 24, 4462–4471 (2005).
92. Damiano, J.S. *et al.* Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines, *Blood*, vol. 93, no. 5, pp. 1658–1667 (1999).
93. Uhm, J. H. *et al.* Vitronectin, a glioma-derived extracellular matrix protein, protects tumor cells from apoptotic death, *Clinical Cancer Research*, vol. 5, no. 6, pp. 1587–1594 (1999).
94. Cordes, N., Integrin-mediated cell-matrix interactions for prosurvival and antiapoptotic signaling after genotoxic injury, *Cancer Letters*, vol. 242, no. 1, pp. 11–19 (2006).
95. Hehlhans, S. *et al.* Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1775, no. 1, pp. 163–180 (2007).
96. Meads, M. B. *et al.* Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease, *Nature Reviews Cancer*, vol. 9, no. 9, pp. 665–674, (2009).
97. Meads, M. B. *et al.* The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance, *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 9, pp. 2519–2526 (2008).
98. Shain, K. H. and Dalton, W. S. Environmental-mediated drug resistance: a target for multiple myeloma therapy, *Expert Review of Hematology*, vol. 2, no. 6, pp. 649–662 (2009).
99. Aoudjit, F. and Vuori, K. Engagement of the $\alpha 2\beta 1$ integrin inhibits Fas ligand expression and activation-induced cell death in T cells in a focal adhesion kinase-dependent manner, *Blood*, vol. 95, no. 6, pp. 2044–2051 (2000).
100. Fornaro, M. *et al.* Fibronectin protects prostate cancer cells from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis via the AKT/survivin pathway, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 50, pp. 50402–50411 (2003).
101. Gendron, S. Integrin $\alpha 2\beta 1$ inhibits Fas-mediated apoptosis in T lymphocytes by protein phosphatase 2A-dependent activation of the MAPK/ERK pathway, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 49, pp. 48633–48643 (2003).
102. Lane, D. *et al.* Ovarian cancer ascites protects from TRAIL-induced cell death through $\alpha v\beta 5$ integrin-mediated focal adhesion kinase and Akt activation, *Oncogene*, vol. 29, no. 24, pp. 3519–3531 (2010).
103. Shain, K. H. *et al.* T. H. Adhesion-mediated intracellular redistribution of c-Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme-like inhibitory protein-long confers resistance to CD95-induced apoptosis in hematopoietic cancer cell lines, *Journal of Immunology*, vol. 168, no. 5, pp. 2544–2553, (2002).
104. Krammer, Life and death in peripheral T cells, *Nature Reviews Immunology*, vol. 7, no. 7, pp. 532–542 (2007).
105. Ricci, S. and W. X. Zong W. Z, Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways,

- Oncologist, vol. 11, no. 4, pp. 342–357 (2006).
106. Strasser, A. et al. What do we know about the mechanisms of elimination of autoreactive T and B cells and what challenges remain, Immunology and Cell Biology, vol. 86, no. 1, pp. 57–66, (2008)
107. Kroemer, G. and Ree, J. C. Mitochondrial control of cell death, Nature Medicine, vol. 6, no. 5, pp. 513–519 (2000).
108. Martinou, J.C. and Youle, R. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics, Developmental Cell, vol. 21, no. 1, pp. 92–101 (2011).
109. Zimmermann, K. C. et al. The machinery of programmed cell death, Pharmacology and Therapeutics, vol. 92, no. 1, pp. 57–70 (2001).
110. Fulda, S. Tumor resistance to apoptosis, International Journal of Cancer, vol. 124, no. 3, pp. 511–515 (2009).
111. Fulda, S. and Debatin, K. M. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy, Current Cancer Drug Targets, vol. 4, no. 7, pp. 569–576 (2004).
112. Hynes, R. O. et al. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines, Cell, vol. 110, no. 6, pp. 673–687 (2002).
113. Liddington, R. C. and Ginsberg, M. H. Integrin activation takes shape, Journal of Cell Biology, vol. 158, no. 5, pp. 833–839 (2002).
114. Vuori, K. Integrin signaling: tyrosine phosphorylation events in focal adhesions, Journal of Membrane Biology, vol. 165, no. 3, pp. 191–199 (1998).
115. Hannigan, G. E. et al. Integrin-linked kinase: not so pseudo after all, Oncogene, vol. 30, no. 43, pp. 4375–4385 (2011).
116. Mitra, S. K. and Schlaepfer, D. D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells, Current Opinion in Cell Biology, vol. 18, no. 5, pp. 516–523 (2006).
117. Horbinski, C. et al. Live free or die: tales of homeless (cells) in cancer, American Journal of Pathology, vol. 177, no. 3, pp. 1044–1052 (2010).
118. Stupack, D. G. and Cheresch, D. A. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival, Journal of Cell Science, vol. 115, no. 19, pp. 3729–3738 (2002).
119. Guo, W. and Giancotti, F. G. Integrin signalling during tumour progression, Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol. 5, no. 10, pp. 816–826 (2004).
120. Loftus, J. C. et al. Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face, Journal of Biological Chemistry, vol. 269, no. 41, pp. 25235–25238 (1994).
121. Aoudjit, F. and Vuori, K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells, Oncogene, vol. 20, no. 36, pp. 4995–5004 (2001).
122. Rae, J. M. et al. MDA-MB-435 cells are derived from M14 Melanoma cells—a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research, Breast Cancer Research and Treatment, vol. 104, no. 1, pp. 13–19 (2007).
123. Cordes, N. et al. Fibronectin and laminin increase resistance to ionizing radiation and the cytotoxic drug Ukrain® in human tumour and normal cells in vitro, International Journal of Radiation Biology, vol. 79, no. 9, pp. 709–720 (2003).
124. Yang, X. H. et al. Disruption of laminin-integrin-CD151-focal adhesion kinase axis sensitizes breast cancer cells to ErbB2 antagonists, Cancer Research, vol. 70, no. 6, pp. 2256–2263 (2010).
125. Gutierrez, C. and Schiff, R. HER2: biology, detection, and clinical implications, Archives of Pathology and Laboratory Medicine, vol. 135, no. 1, pp. 55–62 (2011).
126. Spangenberg, C. et al. ERBB2-mediated transcriptional up-regulation of the $\alpha 5 \beta 1$ integrin fibronectin receptor promotes tumor cell survival under adverse conditions, Cancer Research, vol. 66, no. 7, pp.

- 3715–3725 (2006).
127. Folgiero, V. et al. Induction of ErbB-3 expression by $\alpha 6\beta 4$ integrin contributes to tamoxifen resistance in ER β -1-negative breast carcinomas, *PLoS One*, vol. 3, no. 2, article e1592 (2008).
128. Lundström, A. et al. The role of $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ integrin receptors in the initial anchoring of MDA-MB-231 human breast cancer cells to cortical bone matrix, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 250, no. 3, pp. 735–740 (1998).
129. van der Pluijm, G. et al. Attachment characteristics and involvement of integrins in adhesion of breast cancer cell lines to extracellular bone matrix components, *Laboratory Investigation*, vol. 77, no. 6, pp. 665–675, (1997).
130. Işeri, Ö. D. et al. Gene expression analysis of drug-resistant MCF-7 cells: implications for relation to extracellular matrix proteins, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 65, no. 3, pp. 447–455 (2010).
131. Yao, E. S. et al. Increased $\beta 1$ integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer, *Cancer Research*, vol. 67, no. 2, pp. 659–664 (2007).
132. Park, C. C. et al. $\beta 1$ integrin inhibition dramatically enhances radiotherapy efficacy in human breast cancer xenografts, *Cancer Research*, vol. 68, no. 11, pp. 4398–4405 (2008).
133. Hodkinson, P. S. et al. ECM overrides DNA damage-induced cell cycle arrest and apoptosis in small-cell lung cancer cells through $\beta 1$ integrin-dependent activation of PI3-kinase, *Cell Death and Differentiation*, vol. 13, no. 10, pp. 1776–1788 (2006).
134. Buttery, R. C. et al. Small cell lung cancer: the importance of the extracellular matrix, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 36, no. 7, pp. 1154–1160 (2004).
135. Rintoul, R. C. and Sethi, T. Extracellular matrix regulation of drug resistance in small-cell lung cancer, *Clinical Science*, vol. 102, no. 4, pp. 417–424 (2002).
136. Oshita, F. et al. Increased expression of integrin $\beta 1$ is a poor prognostic factor in small-cell lung cancer, *Anticancer Research*, vol. 22, no. 2 B, pp. 1065–1070 (2002).
137. Oshita, F. et al. High expression of integrin $\beta 1$ and p53 is a greater poor prognostic factor than clinical stage in small-cell lung cancer, *American Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 3, pp. 215–219 (2004).
138. Ju, L. et al. Integrin beta1 over-expression associates with resistance to tyrosine kinase inhibitor gefitinib in non-small cell lung cancer, *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 111, no. 6, pp. 1565–1574 (2010).
139. Thomas, F. et al. Fibronectin confers survival against chemotherapeutic agents but not against radiotherapy in DU145 prostate cancer cells: involvement of the insulin like growth factor-1 receptor, *Prostate*, vol. 70, no. 8, pp. 856–865 (2010).
140. Bhatia, V. et al. Parathyroid hormone-related protein regulates cell survival pathways via integrin $\alpha 6\beta 4$ -mediated activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling,” *Molecular Cancer Research*, vol. 7, no. 7, pp. 1119–1131 (2009).
141. Miyamoto, H. et al. Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins, *Pancreas*, vol. 28, no. 1, pp. 38–44 (2004).
142. Huanwen, W. et al. Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with constitutive and laminin-induced phosphorylation of FAK in pancreatic cancer cell lines, *Molecular Cancer*, vol. 8, article 125 (2009).
143. Mantoni, T. S. et al. Pancreatic stellate cells radioprotect pancreatic cancer cells through $\beta 1$ -integrin signaling, *Cancer Research*, vol. 71, no. 10, pp. 3453–3458 (2011).

144. Armstrong, T. et al. Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Clinical Cancer Research*, vol. 10, no. 21, pp. 7427–7437 (2004).
145. Mahadevan, D. and Von Hoff, D. D. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 6, no. 4, pp. 1186–1197 (2007).
146. Mürköster, S. S. et al. $\alpha 5$ -integrin is crucial for L1CAM-mediated chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma, *International Journal of Oncology*, vol. 34, no. 1, pp. 243–253 (2009).
147. Kiefel, H. et al. Linking L1CAM-mediated signaling to NF- κ B activation, *Trends in Molecular Medicine*, vol. 17, no. 4, pp. 178–187 (2011).
148. Lobert, V. H. et al. Ubiquitination of alpha 5 beta 1 integrin controls fibroblast migration through lysosomal degradation of fibronectin-integrin complexes. *Dev. Cell*. 19, 148–159 (2010).
149. Shi, F.; Sottile, J. Caveolin-1-dependent beta1 integrin endocytosis is a critical regulator of \square fibronectin turnover. *J. Cell. Sci.* 121, 2360–2371 (2008).
150. Pellinen, T. et al. Small GTPase Rab21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of beta1-integrins. *J. Cell Biol.* 173, 767–780 (2006).
151. Caswell, P.T. et al. Rab-coupling protein coordinates recycling of alpha5beta1 integrin and EGFR1 to promote cell migration in 3D microenvironments. *J. Cell Biol.* 183, 143–155 (2008).
152. Bridgewater, R.E. et al. Integrin trafficking at a glance. *J. Cell. Sci.* 125, 3695–3701 (2012).
153. Caswell, P.T. et al. Rab25 associates with alpha5beta1 integrin to promote invasive migration in 3D microenvironments. *Dev. Cell*. 13, 496–510 (2007).
154. Schwartz, M.A. Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a005066 (2010).
155. Roca-Cusachs, P. et al. Finding the weakest link: Exploring integrin-mediated mechanical molecular pathways. *J. Cell. Sci.* 125, 3025–3038 (2012).
156. Roca-Cusachs, P. et al. Clustering of alpha(5)beta(1) integrins determines adhesion strength whereas alpha(v)beta(3) and talin enable mechanotransduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106, 16245–16250 (2009).
157. Friedland, J.C. et al. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science*. 323, 642–644 (2009).
158. Mierke, C.T. et al. Integrin alpha5beta1 facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *J. Cell. Sci.* 124, 369–383 (2011).
159. Menon, S.; Beningo, K.A. Cancer cell invasion is enhanced by applied mechanical stimulation. *PLoS One*. 6, e17277 (2012).
160. Yang, J.T. et al. Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development*. 121, 549–560 (1995).
161. Bader, B.L. et al. Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell*. 95, 507–519 (1998).
162. Carlson, T.R. et al. Cell-autonomous requirement for beta1 integrin in endothelial cell adhesion, migration and survival during angiogenesis in mice. \square *Development*. 135, 2193–2202 (2008).
163. Yang, J.T. et al. Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient \square mice. *Development*. 119, 1093–1105 (1993).
164. Goh, K.L. et al. Mesodermal defects and cranial neural crest apoptosis in \square alpha5 integrin-null embryos. *Development*. 124, 4309–4319 (1997).
165. George, E.L. et al. Defects in \square mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. \square *Development*. 119, 1079–1091 (1993)
166. Van der Flier, A. Endothelial alpha5 and alphav integrins cooperate in remodeling of the

- vasculature during development. *Development*. 137, 2439–2449 (2010).
- 167.Li, L. et al. An □angiogenic role for the alpha5beta1 integrin in promoting endothelial cell proliferation during □cerebral hypoxia. *Exp. Neurol.* 237, 46–54 (2012).
- 168.Sudhakar, A. et al. Human tumstatin and □human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 4766–4771 (2003).
- 169.Orecchia, A. et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 is deposited in the extracellular matrix by endothelial cells and is a ligand for the alpha 5 beta 1 integrin. *J. Cell. Sci.* 116, 3479–3489 (2003).
- 170.Felcht, M. et al. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J. Clin. Invest.* 122, 1991–2005 (2012).
- 171.Kim, S. et al. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am. J. Pathol.* 156, 1345–1362 (2000).
- 172.Magnussen, A. et al. Rapid access of antibodies to alpha5beta1 integrin overexpressed on the luminal surface of tumor blood vessels. *Cancer Res.* 65, 2712–2721 (2005).
- 173.Zhang, H. et al. Expression of integrins and MMPs during alkaline-burn-induced corneal angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 955–962 (2002).
- 174.Bussolati, B. et al. Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells. *FASEB J.* 17, 1159–1161 (2003).
- 175.Parsons-Wingerter, P. et al. Uniform overexpression and rapid accessibility of alpha5beta1 integrin on blood vessels in tumors. *Am. J. Pathol.* 167, 193–211 (2005).
- 176.Klein, S. et al. Alpha 5 beta 1 integrin activates an NF-kappa B-dependent program of gene expression important for angiogenesis and inflammation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5912–5922 (2002).
- 177.Kim, S. et al. Inhibition of endothelial cell survival and angiogenesis by protein kinase A. *J. Clin. Invest.* 110, 933–941 (2002).
- 178.Stupack, D.G. et al. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J. Cell. Biol.* 155, 459–470 (2001).
- 179.Bhaskar, V. et al. A function blocking anti-mouse integrin alpha5beta1 antibody inhibits angiogenesis and impedes tumor growth in vivo. *J. Transl. Med.* 5, 61 (2007).
- 180.Varner, J.A. et al. Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: Reversal by attachment to fibronectin. *Mol. Biol. Cell.* 6, 725–740 (1995).
- 181.O'Brien, V. et al. Expression of the integrin alpha 5 subunit in HT29 colon carcinoma cells suppresses apoptosis triggered by serum deprivation. *Exp. Cell. Res.* 224, 208–213 (1996).
- 182.Schmidt, R. et al. De novo expression of the alpha5beta1- fibronectin receptor in HT29 colon-cancer cells reduces activity of C-SRC. Increase of C-SRC activity by attachment on fibronectin. *Int. J. Cancer.* 76, 91–98 (1998).
- 183.Schirner, M. et al. Integrin alpha5beta1: A potent inhibitor of experimental lung metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 16, 427–435 (1998).
- 184.Chantret, I. et al. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: A survey of twenty cell lines. *Cancer Res.* 48, 1936–1942 (1988).
- 185.Gong, J. et al. Role of alpha 5 beta 1 integrin in determining malignant properties of colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ.* 8, 83–90 (1997).
- 186.Murillo, C.A. et al. Inhibition of alpha5 integrin decreases PI3K activation and cell adhesion of human colon cancers. *Surgery.* 136, 143–149 (2004).
- 187.Toquet, C. et al. ADAM15 to alpha5beta1 integrin switch in colon carcinoma cells: A late event in

- cancer progression associated with tumor dedifferentiation and poor prognosis. *Int. J. Cancer.* 130, 278–287 (2012).
- 188.Koike, T. et al. Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 8132–8137 (2004)
- 189.Anderson, J.A. et al. PTHrP increases transcriptional activity of the integrin subunit alpha5. *Br. J. Cancer.* 96, 1394–1403 (2007).
- 190.Nam, E.H. et al. ZEB2 upregulates integrin alpha5 expression through cooperation with Sp1 to induce invasion during epithelial-mesenchymal transition of human cancer cells. *Carcinogenesis.* 33, 563–571 (2012).
- 191.Reyes-Reyes, M.E. et al. P-selectin activates integrin-mediated colon carcinoma cell adhesion to fibronectin. *Exp. Cell. Res.* 312, 4056–4069 (2006).
- 192.Camacho-Leal, P. et al. A co-clustering model involving alpha5beta1 integrin for the biological effects of GPI-anchored human carcinoembryonic antigen (CEA). *J. Cell. Physiol.* 211, 791–802 (2007).
- 193.Dia, V.P.; Mejia, E.G. Lunasin promotes apoptosis in human colon cancer cells by mitochondrial pathway activation and induction of nuclear clusterin expression. *Cancer Lett.* 295, 44–53 (2011).
- 194.Shibata, K. et al. Fibronectin secretion from human peritoneal tissue induces Mr 92,000 type IV collagenase expression and invasion in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* 57, 5416–5420 (1997).
- 195.Casey, R.C. et al. Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. *Am. J. Pathol.* 159, 2071–2080 (2001).
- 196.Burleson, K.M. et al. Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers. *Gynecol. Oncol.* 93, 170–181 (2004).
- 197.Yokoyama, Y.; Ramakrishnan, S. Binding of endostatin to human ovarian cancer cells inhibits cell attachment. *Int. J. Cancer.* 121, 2402–2409 (2007).
- 198.Yokoyama, Y. et al. Endostatin binding to ovarian cancer cells inhibits peritoneal attachment and dissemination. *Cancer Res.* 67, 10813–10822 (2007).
- 199.Dong, Y. et al. Kallikrein-related peptidase 7 promotes multicellular aggregation via the alpha(5)beta(1) integrin pathway and paclitaxel chemoresistance in serous epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 70, 2624–2633 (2010).
- 200.Sawada, K. et al. Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via alpha 5-integrin, which is a therapeutic target. *Cancer Res.* 68, 2329–2339 (2008).
- 201.Li, Q. et al. Expression and correlation of Lewis y antigen and integrins alpha5 and beta1 in ovarian serous and mucinous carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 20, 1482–1489 (2010).
- 202.Mitra, A.K. et al. Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and alpha(5)beta(1)-integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene.* 30, 1566–1576 (2011).
- 203.Deng, B. et al. Adrenomedullin expression in epithelial ovarian cancers and promotes HO8910 cell migration associated with upregulating integrin alpha5beta1 and phosphorylating FAK and paxillin. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 31, 19 (2012).
- 204.Sawada, K. et al. Integrin inhibitors as a therapeutic agent for ovarian cancer. *J. Oncol.* 915140 (2012).
- 205.Seftor, R.E. et al. Maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma. *Cancer Res.* 58, 5681–5685 (1998).
- 206.Ignatoski, K.M. et al. ERBB-2 overexpression confers PI 3' kinase-dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells. *Br. J. Cancer.* 82, 666–674 (2000).
- 207.Jia, Y. et al. Integrin fibronectin receptors in matrix metalloproteinase-1-dependent invasion by breast

- cancer and mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 64, 8674–8681 (2004).
208. Maschler, S. et al. Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization. *Oncogene.* 24, 2032–2041 (2005).
209. Spangenberg, C. et al. ERBB2-mediated transcriptional up-regulation of the alpha5beta1 integrin fibronectin receptor promotes tumor cell survival under adverse conditions. *Cancer Res.* 66, 3715–3725 (2006).
210. Qin, L. et al. Steroid receptor coactivator-1 upregulates integrin alpha(5) expression to promote breast cancer cell adhesion and migration. *Cancer Res.* 71, 1742–1751 (2011).
211. Baranwal, S. et al. Molecular characterization of the tumor-suppressive function of nischarin in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 1513–1528 (2011).
212. Wong, A.W. et al. Alcohol promotes breast cancer cell invasion by regulating the Nm23-ITGA5 pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30, 75 (2011).
213. *Cancers* 5 42 (2013).
214. Wu, H. et al. Positive expression of E-cadherin suppresses cell adhesion to fibronectin via reduction of alpha5beta1 integrin in human breast carcinoma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 132, 795–803 (2006).
215. Imanishi, Y. et al. Angiopoietin-2 stimulates breast cancer metastasis through the alpha(5)beta(1) integrin-mediated pathway. *Cancer Res.* 67, 4254–4263 (2007).
216. Morozovich, G. et al. Integrin alpha5beta1 controls invasion of human breast carcinoma cells by direct and indirect modulation of MMP-2 collagenase activity. *Cell Cycle* 8, 2219–2225 (2009).
217. Baranwal, S. et al. Molecular characterization of the tumor-suppressive function of nischarin in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 1513–1528 (2011).
218. Nam, J.M. et al. Breast cancer cells in three-dimensional culture display an enhanced radioresponse after coordinate targeting of integrin alpha5beta1 and fibronectin. *Cancer Res.* 70, 5238–5248 (2010).
219. Myhre, K. et al. TbetaRIII/beta-arrestin2 regulates integrin alpha5beta1 trafficking, function, and localization in epithelial cells. *Oncogene.* doi:10.1038/onc.2012.157 (2012).
220. Wang, Y. et al. Integrin subunits alpha5 and alpha6 regulate cell cycle by modulating the chk1 and Rb/E2F pathways to affect breast cancer metastasis. *Mol. Cancer.* 10, 84 (2011).
221. Dingemans, A.M. et al. Integrin expression profiling identifies integrin alpha5 and beta1 as prognostic factors in early stage non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer.* 9, 152 (2010).
222. Adachi, M. et al. Significance of integrin alpha5 gene expression as a prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 6, 96–101 (2000).
223. Han, J.Y. et al. Immunohistochemical expression of integrins and extracellular matrix proteins in non-small cell lung cancer: Correlation with lymph node metastasis. *Lung Cancer.* 41, 65–70 (2003).
224. Lawson, M.H. et al. Bcl-2 and beta1-integrin predict survival in a tissue microarray of small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 103, 1710–1715 (2010).
225. Roman, J. et al. alpha5beta1-integrin expression is essential for tumor progression in experimental lung cancer. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 43, 684–691 (2010).
226. Han, S. et al. Fibronectin stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways. *Cancer Res.* 66, 315–323 (2006).
227. Ritzenthaler, J.D. et al. Stimulation of lung carcinoma cell growth by fibronectin-integrin signalling. *Mol. Biosyst.* 4, 1160–1169 (2008).
228. Caccavari, F. et al. Integrin signaling and lung cancer. *Cell Adh. Migr.* 4, 124–129 (2009).
229. Sethi, T. et al. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: A

- mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat. Med.* 5, 662–628 (1999).
230. Rintoul, R.C.; Sethi, T. Extracellular matrix regulation of drug resistance in small-cell lung cancer. *Clin. Sci. (Lond.)* 102, 417–424 (2002).
231. Buttery, R.C. et al. Small cell lung cancer: The importance of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1154–1160 (2004).
232. Hodkinson, P.S. et al. ECM overrides DNA damage-induced cell cycle arrest and apoptosis in small-cell lung cancer cells through beta1 integrin-dependent activation of PI3-kinase. *Cell Death Differ.* 13, 1776–1788 (2006).
233. Gingras, M.C. et al. Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J. Neuroimmunol.* 57, 143–153 (1995).
234. Riemenschneider, M.J. et al. In situ analysis of integrin and growth factor receptor signaling pathways in human glioblastomas suggests overlapping relationships with focal adhesion kinase activation. *Am. J. Pathol.* 167, 1379–1387 (2005).
235. Kita, D. et al. Expression of dominant-negative form of Ets-1 suppresses fibronectin-stimulated cell adhesion and migration through down-regulation of integrin alpha5 expression in U251 glioma cell line. *Cancer Res.* 61, 7985–7991 (2001).
236. Janouskova, H. et al. Integrin alpha5beta1 plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma. *Cancer Res.* 72, 3463–3470 (2012).
237. Cosset, E.C. et al. Involvement of the TGFbeta pathway in the regulation of alpha5 beta1 integrins by caveolin-1 in human glioblastoma. *Int. J. Cancer* 131, 601–611 (2012).
238. Holmes, K.M. et al. Insulin-like growth factor-binding protein 2-driven glioma progression is prevented by blocking a clinically significant integrin, integrin-linked kinase, and NF-kappaB network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 3475–3480 (2012).
239. Martin, S. et al. Caveolin-1 regulates glioblastoma aggressiveness through the control of alpha(5)beta(1) integrin expression and modulates glioblastoma responsiveness to SJ749, an alpha(5)beta(1) integrin antagonist. *Biochim. Biophys. Acta.* 1793, 354–367 (2009).
240. Martinkova, E. et al. alpha5beta1 integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells. *Int. J. Cancer.* 127, 1240–1248 (2010).
241. Maglott, A. et al. The small alpha5beta1 integrin antagonist, SJ749, reduces proliferation and clonogenicity of human astrocytoma cells. *Cancer Res.* 66, 6002–6007 (2006).
242. Kesanakurti, D. et al. Role of MMP-2 in the regulation of IL-6/Stat3 survival signaling via interaction with alpha5beta1 integrin in glioma. *Oncogene.* doi:10.1038/onc.2012.52 (2012).
243. Chahal, M. et al. O(6)-Methylguanine-DNA Methyltransferase Is a Novel Negative Effector of Invasion in Glioblastoma Multiforme. *Mol. Cancer Ther.* 11, 2440–2450 (2012).
244. Qian, F. et al. Interaction between integrin alpha(5) and fibronectin is required for metastasis of B16F10 melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 1269–1275 (2005).
245. McKenzie, J.A. et al. Survivin enhances motility of melanoma cells by supporting Akt activation and {alpha}5 integrin upregulation. *Cancer Res.* 70, 7927–7937 (2010).
246. Arpaia, E. et al. The interaction between caveolin-1 and Rho-GTPases promotes metastasis by controlling the expression of alpha5-integrin and the activation of Src, Ras and Erk. *Oncogene.* 31, 884–896 (2012).
247. Beliveau, A. et al. Expression of integrin alpha5beta1 and MMPs associated with epithelioid morphology and malignancy of uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 2363–2372 (2000).

248. Beliveau, A. et al. Tumorigenicity of the mixed spindle-epithelioid SP6.5 and epithelioid TP17 uveal melanoma cell lines is differentially related to alpha5beta1 integrin expression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 3058–3065 (2001).
249. Landreville, S. et al. Suppression of alpha5 gene expression is closely related to the tumorigenic properties of uveal melanoma cell lines. *Pigment. Cell Melanoma Res.* 24, 643–655 (2011).
250. Ramakrishnan, V. et al. Preclinical evaluation of an anti-alpha5beta1 integrin antibody as a novel anti-angiogenic agent. *J. Exp. Ther. Oncol.* 5, 273–286 (2006).
251. Bhaskar, V. et al. Volociximab, a chimeric integrin alpha5beta1 antibody, inhibits the growth of VX2 tumors in rabbits. *Invest. New Drugs.* 26, 7–12 (2008).
252. Almokadem, S.; Belani, C.P. Volociximab in cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 12, 251–257 (2011).
253. Besse, B. et al. Phase Ib safety and pharmacokinetic study of volociximab, an anti-alpha5beta1 integrin antibody, in combination with carboplatin and paclitaxel in advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* doi:10.1093/annonc/mds281 (2012).
254. Ricart, A.D. et al. Volociximab, a chimeric monoclonal antibody that specifically binds alpha5beta1 integrin: A phase I, pharmacokinetic, and biological correlative study. *Clin. Cancer Res.* 14, 7924–7929 (2008).
255. Bell-McGuinn, K.M. et al. A phase II, single-arm study of the anti-alpha5beta1 integrin antibody volociximab as monotherapy in patients with platinum-resistant advanced epithelial ovarian or primary peritoneal cancer. *Gynecol. Oncol.* 121, 273–279 (2011).
256. Yazji, S. et al. Final results from phase II study of volociximab, an $\alpha 5 \beta 1$ anti-integrin antibody, in refractory or relapsed metastatic clear cell renal cell carcinoma (mCCRCC). *J. Clin. Oncol.* 25, Abstract 5094 (2007).
257. Li, G. et al. Dual functional monoclonal antibody PF-04605412 targets integrin alpha5beta1 and elicits potent antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Res.* 70, 10243–10254 (2010).
258. Smallheer, J.M. et al. Synthesis and biological evaluation of nonpeptide integrin antagonists containing spirocyclic scaffolds. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 383–387 (2004).
259. Marinelli, L. et al. Ligand binding analysis for human alpha5beta1 integrin: Strategies for designing new alpha5beta1 integrin antagonists. *J. Med. Chem.* 48, 4204–4207 (2005).
260. Heckmann, D. et al. Probing integrin selectivity: Rational design of highly active and selective ligands for the alpha5beta1 and alphavbeta3 integrin receptor. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46, 3571–3574 (2007).
261. Heckmann, D. et al. Rational design of highly active and selective ligands for the alpha5beta1 integrin receptor. *Chembiochem* 9, 1397–1407 (2008).
262. Meyer, A. et al. Targeting RGD recognizing integrins: Drug development, biomaterial research, tumor imaging and targeting. *Curr. Pharm. Des.* 12, 2723–2747 (2006).
263. Stragies, R. et al. Design and synthesis of a new class of selective integrin alpha5beta1 antagonists. *J. Med. Chem.* 50, 3786–3794 (2007).
264. Umeda, N. et al. Suppression and regression of choroidal neovascularization by systemic administration of an alpha5beta1 integrin antagonist. *Mol. Pharmacol.* 69, 1820–1828 (2006).
265. Muether, P.S. et al. The role of integrin alpha5beta1 in the regulation of corneal neovascularization. *Exp. Eye Res.* 85, 356–365 (2007).
266. Zahn, G. et al. Preclinical evaluation of the novel small-molecule integrin alpha5beta1 inhibitor JSM6427 in monkey and rabbit models of choroidal neovascularization. *Arch. Ophthalmol.* 127, 1329–1335 (2009).
267. Zahn, G. et al. Assessment of the integrin alpha5beta1 antagonist JSM6427 in proliferative

- vitreo-retinopathy using in vitro assays and a rabbit model of retinal detachment. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010, 51, 1028–1035 (2010).
- 268.Okazaki, T. et al. alpha5beta1 Integrin blockade inhibits lymphangiogenesis in airway inflammation. *Am. J. Pathol.* 174, 2378–2387 (2009).
- 269.Zischinsky, G. et al. SAR of N-phenyl piperidine based oral integrin alpha5beta1 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 65–68 (2010).
- 270.Zischinsky, G. et al. Discovery of orally available integrin alpha5beta1 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 380–382 (2010).
- 271.Delouvie, B. et al. Structure-activity relationship of a series of non peptidic RGD integrin antagonists targeting alpha5beta1: Part 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 4111–4116 (2012).
- 272.Delouvie, B. et al. Structure-activity relationship of a series of non peptidic RGD integrin antagonists targeting alpha5beta1: Part 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 4117–4121 (2012).
- 273.Livant, D.L. et al. Anti-invasive, antitumorigenic, and antimetastatic activities of the PHSCN sequence in prostate carcinoma. *Cancer Res.* 60, 309–320 (2000).
- 274.Livant, D.L. et al. The PHSRN sequence induces extracellular matrix invasion and accelerates wound healing in obese diabetic mice. *J. Clin. Invest.* 105, 1537–1545 (2000).
- 275.Zeng, Z.Z. et al. alpha(5)beta(1) Integrin Ligand PHSRN Induces Invasion and alpha(5) mRNA in Endothelial Cells to Stimulate Angiogenesis. *Transl. Oncol.* 2, 8–20 (2009).
- 276.Van Golen, K.L. Suppression of tumor recurrence and metastasis by a combination of the PHSCN sequence and the antiangiogenic compound tetrathiomolybdate in prostate carcinoma. *Neoplasia* 4, 373–379 (2002).
- 277.Stoeltzing, O. et al. Liu, Inhibition of integrin alpha5beta1 function with a small peptide (ATN-161) plus continuous 5-FU infusion reduces colorectal liver metastases and improves survival in mice. *Int. J. Cancer.* 104, 496–503 (2003).
- 278.Khalili, P. et al. A non-RGD-based integrin binding peptide (ATN-161) blocks breast cancer growth and metastasis in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 5, 2271–2280 (2006).
- 279.Wang, W. et al. The antiangiogenic effects of integrin alpha5beta1 inhibitor (ATN-161) in vitro and in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 7213–7220 (2011).
- 280.Cianfrocca, M.E. et al. Phase 1 trial of the antiangiogenic peptide ATN-161 (Ac-PHSCN-NH(2)), a beta integrin antagonist, in patients with solid tumours. *Br. J. Cancer.* 94, 1621–1626 (2006).
- 281.Siegel, R. et al. Cancer statistics, 2011. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61:212–236. doi: 10.3322/caac.20121 □ Sogaard KK (2011).
- 282.Cronin-Fenton, D.P. et al. Survival in Danish patients with breast cancer and inflammatory bowel disease: a nationwide cohort study. *Inflamm Bowel Dis.* 14:519-525 (2008).
- 283.Louwman, W.J. et al. On the rising trends of incidence and prognosis for breast cancer patients diagnosed 1975-2004: a long-term population-based study in southeastern Netherlands. *Cancer Causes Control* 19:97-106 □ (2008).
- 284.Coleman, R.E.; Rubens, R.D. The clinical course of bone metastases from breast cancer. *Br J Cancer* 55:61-66 (1987).
- 285.Tubiana-Hulin, M. Incidence, prevalence and distribution of bone metastases. *Bone.* 12 (Suppl 1) □ (1991).
- 286.Coleman, R.E. et al. Clinical course and prognostic factors following recurrence from breast cancer. *J Cancer.* 17:336-340 (1998).
- 287.Coleman, R.E. Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 80:1588-1594 □ (1997).
- 288.Dent, R. et al. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*

- 115:423-428 (2008).
- 289.Hortobagyi, G.N. et al. Long-term prevention of skeletal complications of metastatic breast cancer with pamidronate. Protocol 19 Aredia Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 16:2038-2044 (1998).
- 290.Hortobagyi, G.N. et al. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal complications in patients with breast cancer and lytic bone metastases. Protocol 19 Aredia Breast Cancer Study Group. *N Engl J Med.* 335:1785-1791 (1996).
- 291.Jensen, A.Ø. et al. Incidence of bone metastases and skeletal-related events in breast cancer patients: a population-based cohort study in Denmark. *BMC Cancer.* 11:29 (2011).
- 292.Liotta, L.A. & Kohn, E.C. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature.* 411:375-379 (2001).
- 293.Liotta, L.A. & Kohn E.C. Cancer invasion and metastases. *JAMA.* 263:1123-1126 (1990).
- 294.Zetter, B.R. The cellular basis of site-specific tumor metastasis. *N Engl J Med.* 322,605-612 Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev* (1990).
- 295.Yoneda, T.; Hiraga, T. Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 679-687 (2005).
- 296.Nam, E.H. et al. ZEB2 upregulates integrin $\alpha 5$ expression through cooperation with Sp1 to induce invasion during epithelial-mesenchymal transition of human cancer cells. *Carcinogenesis.* 33(3):563-71 (2012).
- 297.Kim, S. et al. Tmprss4 induces invasion and epithelial-mesenchymal transition through upregulation of integrin $\alpha 5$ and its signaling pathways. *Carcinogenesis.* 31(4):597-606. Epub 2010 Jan 29. PubMed (2010).
- 298.Maschler, S. et al. Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization. *Oncogene.* Mar 17; 24(12):2032-41 (2005).
- 299.Gherardi, E. et al. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer.* Jan 24; 12(2):89-103 (2012).
- 300.Van der Velde-Zimmermann, D. et al. Fibronectin distribution in human bone marrow stroma: matrix assembly and tumor cell adhesion via $\alpha 5$ beta1 integrin, *Exp Cell Res* 230:111-120 (1997).
- 301.Martin-Thouvenin, V. et al. Phorbol ester-induced promyelocytic leukemia cell adhesion to marrow stromal cells involves fibronectin specific alpha 5 beta 1 integrin receptors, *J Cell Physiol* 153, 95-102 (1992).
- 302.Korah, R. et al.. Integrin $\alpha 5$ beta1 promotes survival of growth-arrested breast cancer cells: an in vitro paradigm for breast cancer dormancy in bone marrow, *Cancer Res* 64, 411-422 (2004).
- 303.Barkan, D. et al. Inhibition of metastatic outgrowth from single dormant tumor cells by targeting the cytoskeleton. *Cancer Res.* 68:6241-50 (2008).
- 304.Shibue, T.; Weinberg, R.A. Integrin beta1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:10290-5 (2009).
- 305.Barkan, D. et al. Metastatic growth from dormant cells induced by a col-I-enriched fibrotic environment. *Cancer Res.* 70:5706-16 (2010).
- 306.Aguirre-Ghiso, J.A. et al. Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. *Mol Biol Cell.* 12:863-79 (2001).
- 307.Rucci, N.; Teti, A. Osteomimicry: how tumor cells try to deceive the bone. *Front Biosci.* 2:907-15 (2010).
- 308.Barnes, G.L. et al. Osteoblast-related transcription factors Runx2 (Cbfa1/AML3) and MSX2 mediate

- the expression of bone sialoprotein in human metastatic breast cancer cells. *Cancer Res.*, 63, 2631–2637 (2003).
309. Barnes, G.L. et al. Fidelity of Runx2 activity in breast cancer cells is required for the generation of metastases-associated osteolytic disease. *Cancer Res.*, 64, 4506–4513 (2004).
310. Javed, A. et al. Impaired intranuclear trafficking of Runx2 (AML3/ CBFA1) transcription factors in breast cancer cells inhibits osteolysis in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 102, 1454–1459 (2005).
311. Cawthorn, T.R. et al. Mechanisms and pathways of bone metastasis: challenges and pitfalls of performing molecular research on patient samples. *Clin Exp Metastasis*. 26(8):935-43 (2009).
312. Hamidouche, Z. et al. Priming integrin $\alpha 5$ promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(44):18587-91 (2009).
313. Chen, J. et al. Protein interaction network underpins concordant prognosis among heterogeneous breast cancer signatures. *J Biomed Inform*. 2010;43(3):385-96 (2010).