

Summary

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most common pediatric soft-tissue sarcoma. Although the precise cell type from which the tumor originates is still a matter of debate, the evidence points towards the myogenic lineage.

RMS are divided in two main subgroups on the basis of histology: alveolar (ARMS) and embryonal (ERMS). ARMS, which is associated with a relatively high frequency of metastatic disease and needs an intensive therapeutic regimen, is the rhabdomyosarcoma subtype that carries the poorest prognosis. The most relevant feature of ARMS subtype is the presence of one of two possible chromosomal translocations, t(2;13)(q35;q14) and t(1;13)(p36;q14), which result in the expression of the chimeric PAX3/FKHR and PAX7/FKHR transcription factors, respectively. In contrast to ARMS, no specific genetic lesions have been identified in ERMS.

Several studies tried to identify novel candidate genes in carcinogenesis using array-based analysis and serial analysis of gene expression. Our previous meta-analysis on four microarray and two SAGE datasets of gene expression of RMS identified common regulatory pathways that could be responsible of tumor growth. In the list of common differential expressed genes, *bin1* was under-expressed in all of the studies.

The *bin1* (amphiphysin II) gene maps to the long arm of human chromosome 2 (2q14) and is characterized by 19 exons, six of which are alternately spliced. At least 10 different splice variants have been identified that differ widely in subcellular localization, tissue distribution, and ascribed functions. *bin1* has properties of a suppressor or negative modifier in cancer: its expression is often attenuated or abolished in breast and prostate cancers, colon cancer, astrocytomas, neuroblastomas and malignant melanoma, where its ectopic expression can inhibit proliferation and/or promote apoptosis. These *bin1* functions may depend on its interaction with the N-terminal region of Myc.

Many studies suggest that *bin1* may restrain cellular proliferation and survival in a contextual manner that is dependent on some features of neoplastic pathophysiology.

While a simple and readily classifiable function has yet to emerge for BIN1 tumor suppressor proteins, current information argues that they interact with vesicular membranes and act as scaffolds to integrate cellular signalling and trafficking.

My research focused on the study of *bin1* gene in RMS tumor.

bin1 expression level was evaluated in 8 biopsies of ARMS, which were analyzed in our previous study of expression profiling in RMS, by Sybr-Green based Real Time PCR, confirming its under-expression. Then we tested total transcripts levels in 7 RMS cell lines, 4 ARMS and 3 ERMS, and found that *bin1* was significantly under-expressed respect to fetal skeletal muscle.

Because different isoforms derived from *bin1* gene have been described, to examine patterns of *bin1* splicing, RT-PCR, cloning and sequencing techniques were performed using RNAs isolated by RC2, RH30 and RD cell lines. They represent ARMS positive for t(1;13), ARMS positive for t(2;13) and ERMS, respectively. We identified several isoforms and subsequently we analyzed protein expression levels.

Previous work had indicated that *bin1* mRNA and protein levels in murine skeletal muscle were higher than in most other tissues. Thus we examined BIN1 expression in 7 RMS cell lines and in C1C12 cells, a non transformed myoblast cell line derived from murine skeletal muscle, by western blot analysis. We revealed an intermediate level of BIN1 expression in RMS cell lines with respect to proliferating or differentiated C2C12. To identify the protein variants expressed in RMS cells, 293T were transiently transfected with vectors for 3 BIN1 splice isoforms and protein lysates were analysed, by immunoblotting, with 2 different BIN1 antibodies, 99D and 2F11. The second recognizes all the BIN1 isoforms while the first recognizes alternately spliced isoforms, characterized by exon 13. Only 2 variants were detected, the ubiquitous isoform BIN1-10 and the isoform associated to aberrant splicing BIN1+12A.

Because specific BIN1 proteins are associated to different localization in the cell we used sub-fraction analysis and immunofluorescence technique in 7 and 2 RMS cell lines respectively and showed a BIN1 expression in the nuclear soluble fraction.

Because RH30 cell line has high levels of NMYC and BIN1 interacts with c-MYC in a common portion of both proteins, we studied gene expression profiling of NMYC positive RH30 cells after infection with MSCVBIN-10 retrovirus. We identified a group 582 differentially expressed genes, 75% of them are down-regulated. The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) visualized enriched functional-related gene groups correlated with inflammation, immunity response and cell migration. Thus BIN1-10 overexpression may have an anti-tumor role in RMS

reducing inflammation and tumor invasivity and modulating immunity response by *indo* gene level. Other studies are warranted to confirm and integrate these data.

RIASSUNTO

Il rabdomiosarcoma (RMS) è una neoplasia a piccole cellule blu rotonde, che si sviluppa in età pediatrica da precursori del tessuto muscolare striato.

Il RMS presenta due principali sottotipi istologici: il rabdomiosarcoma embrionale (ERMS), che è l'istotipo più frequente e presenta buona prognosi e l'alveolare (ARMS), che è caratterizzato da prognosi più sfavorevole, da una maggiore aggressività locale ed una più spiccata tendenza alla disseminazione.

Mediante citogenetica classica sono state descritte anomalie cromosomiche in tutti i sottotipi di RMS, tuttavia alcune regioni cromosomiche sono coinvolte in modo non casuale in modificazioni strutturali. In particolare circa il 60-70% di tutti i casi di ARMS sono caratterizzati dalla traslocazione t(2;13)(q35;q14) da cui origina la proteina chimerica PAX3-FKHR, mentre un 10-20% di casi presenta la traslocazione t(1;13)(p36;q14) che codifica la proteina chimerica PAX7-FKHR.

Un interesse sempre maggiore è volto all'individuazione di geni rilevanti per la biologia del tumore e per il processo di tumorigenesi. A tal fine sono stati pubblicati negli ultimi anni diversi lavori che riportano lo studio di profili di espressione genica mediante *microarray* e l'analisi del trascrittoma tramite SAGE, sia su biopsie, che linee cellulari di RMS. Alcuni di questi lavori, compresa una nostra recente pubblicazione riguardante l'analisi del profilo trascrizionale di 10 biopsie di ARMS, tramite *microarray*, hanno evidenziato la sottoespressione significativa del gene *bin1* nel tessuto patologico rispetto al tessuto sano.

Il gene *bin1* mappa sul cromosoma umano 2 (2q14) ed è caratterizzato da 19 esoni, alcuni dei quali sono sottoposti a *splicing* alternativo. In letteratura sono già state descritte almeno 10 isoforme che differiscono ampiamente per localizzazione subcellulare, distribuzione tissutale e funzione.

BIN1 è sottoespresso in diversi tipi tumorali, quali: carcinoma prostatico, neuroblastoma, tumore mammario e l'espressione forzata in linee cellulari tumorali causa blocco della crescita e apoptosi.

Non sono ancora chiari i meccanismi attraverso i quali BIN1 svolge la funzione di oncosoppressore, ma è stata dimostrata l'importanza dell'interazione con il dominio MB1 di c-MYC nella regione NTD che regola l'attivazione del fattore di trascrizione.

Rimane inoltre da chiarire l'interazione di BIN1 con le membrane vescicolari, il coinvolgimento nel traffico intracellulare e il processo di differenziazione muscolare.

Lo scopo del mio dottorato di ricerca è stato approfondire lo studio del gene *bin1* nel RMS.

Abbiamo validato la sottoespressione di *bin1* tramite Real Time PCR in 8 biopsie, di cui avevamo studiato il profilo di espressione, rispetto all'RNA di muscolo scheletrico fetale e abbiamo valutato l'espressione relativa del trascritto in 7 linee cellulari di RMS, sia alveolari che embrionali, evidenziando la sottoespressione significativa della totalità dei trascritti di *bin1* in tutte le linee cellulari considerate.

Poiché *bin1* è sottoposto a *splicing* alternativo e può generare numerose isoforme, abbiamo valutato quali isoforme fossero espresse nelle linee cellulari RC2, RH30 e RD, rappresentative rispettivamente del RMS alveolare (ARMS) con la traslocazione t(1;13), ARMS con la traslocazione t(2;13) e RMS embrionale (ERMS).

Mediante *immunoblotting* abbiamo valutato l'espressione proteica di *bin1* nelle 7 linee cellulari di RMS precedentemente considerate, comparando i livelli di espressione delle linee cellulari di RMS a quelli della linea cellulare murina C2C12, sia in attiva proliferazione che dopo differenziamento. Abbiamo osservato un'espressione totale di BIN1 intermedia tra i due stadi di differenziamento dei mioblasti murini e si è confermato l'aumento sia per quantità che per numero di isoforme di BIN1 a seguito dell'induzione del differenziamento miogenico.

Non essendoci in commercio anticorpi specifici per le diverse isoforme di BIN1 abbiamo identificato le proteine prodotte dai diversi trascritti tramite *western blot* analisi, utilizzando come controllo lisati proteici ottenuti dalla linea cellulare 293T trasfettata con vettori in grado di esprimere tre isoforme di BIN1, le due ubiquitarie e l'isoforma muscolo specifica. Successivamente abbiamo valutato la localizzazione cellulare di BIN1 mediante immunofluorescenza, confermata dall'analisi dell'espressione proteica nelle frazioni citoplasmatiche e nucleare che ha rivelato l'espressione di BIN1 nel nucleo delle cellule di RMS.

Per valutare l'effetto della sovraespressione dell'isoforma ubiquitaria BIN1-10 abbiamo sottoposto la linea cellulare RH30 ad infezione con vettore retrovirale e dopo 96 ore è stato effettuato uno studio del profilo di espressione della stessa linea cellulare infettata con lo stesso vettore vuoto, utilizzando la tecnologia Affimetrix. Il *set* dei 582 geni

differenzialmente espressi, di cui ben il 75% erano sottoespressi, sono stati sottoposti all'individuazione di *clusters* di arricchimento rispetto alle categorie funzionali del genoma umano. L'analisi ha dimostrato la deregolazione di geni coinvolti nei processi di risposta immunitaria, infiammazione e migrazione cellulare.

In particolare la sovraespressione di BIN1-10 regola negativamente il processo infiammatorio e di invasività mentre, modulando l'espressione del gene *indo* regola positivamente la risposta immunitaria. Studi aggiuntivi sono necessari per confermare e integrare queste osservazioni.

Introduzione

1.1 I sarcomi dei tessuti molli

I casi di tumori maligni in età pediatrica (da 0 a 14 anni), diagnosticati ogni anno in Italia, corrispondono a circa 120-150/1.000.000 di soggetti in età inferiore a 15 anni e sebbene siano considerati un evento raro, sono comunque al secondo posto, dopo gli incidenti, tra le cause di morte di bambini con età superiore ad un anno. Negli ultimi anni si è registrata una diminuzione della mortalità infantile dovuta a tumore, determinata dall'affinamento delle modalità diagnostiche e terapeutiche.

I tumori che si riscontrano nel bambino si differenziano per vari aspetti da quelli dell'adulto, in particolar modo per queste cinque caratteristiche:

1. prevalenza di leucemie, linfomi e tumori embrionari;
2. la derivazione prevalentemente mesenchimale rispetto a quella epiteliale;
3. una più favorevole risposta alla terapia;
4. sede di localizzazione, in quanto le neoplasie infantili insorgono soprattutto nel tessuto emopoietico, nervoso e renale, mentre nell'adulto le sedi principali sono nell'apparato digerente, genitale e respiratorio;
5. compaiono in soggetti che hanno avuto una breve esposizione a fattori ambientali potenzialmente carcinogenetici.

Tra le neoplasie maligne, i sarcomi dei tessuti molli costituiscono un gruppo eterogeneo, derivante da cellule mesenchimali primordiali che normalmente danno origine al tessuto muscolare, cartilagineo, osseo e fibroso. Questi tumori presentano un'incidenza pari a 11 casi per anno su 1.000.000 di soggetti di età pediatrica e costituiscono la quinta neoplasia più comune, con una frequenza del 6,2%, dopo le leucemie acute, i tumori del sistema nervoso centrale, i linfomi e il neuroblastoma ¹. Sebbene i sarcomi dei tessuti molli presentino diversa istogenesi, sono caratterizzati da alcuni aspetti biologici quali:

- infiltrazione diffusa nei tessuti circostanti;
- tendenza alla recidiva locale;
- disseminazione frequente per via ematogena e rara per via linfatica ².

1.2 Il Rbdomiosarcoma: epidemiologia e clinica

Nella casistica dell'Associazione Italiana di Oncoematologia Pediatrica (AIEOP) oltre il 60% dei sarcomi dei tessuti molli sono Rbdomiosarcomi (RMS). In età adulta sono rari e non rappresentano più del 1.2% dei sarcomi.

Vi sono due picchi di incidenza, uno tra i 2 e i 5 anni di età e un altro, meno consistente, tra gli 11 e i 15 anni di età.

Il sesso maschile ha una leggera prevalenza rispetto al sesso femminile, con un rapporto maschi/femmine pari a 1,4:1.

Le sedi anatomiche di presentazione sono le più varie, ma le più frequentemente colpite sono: testa-collo (32% dei casi), tratto genito urinario (16%-23% dei casi), arti (16% dei casi), orbita (7% dei casi), addome, torace ed altre sedi (17-29% dei casi) (figura 1).

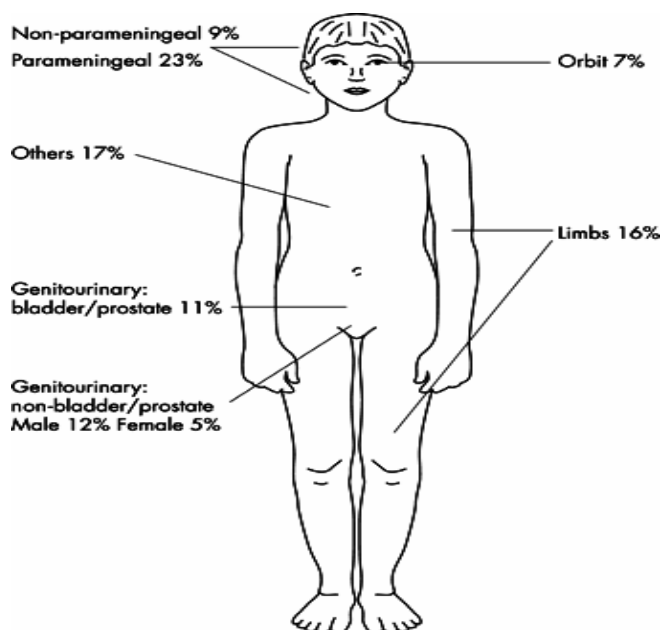


Figura 1. Distribuzione del RMS nelle sedi primarie ³.

La sede di origine del tumore, la sua estensione agli organi contigui e la presenza di metastasi determinano le caratteristiche di presentazione clinica del RMS. Il segno più comune è il riscontro di una tumefazione che può anche essere dolente. Circa il 20-30% dei casi rivela metastasi alla diagnosi; le sedi più frequenti sono: polmone e sistema nervoso centrale (percentuale complessiva 37%), linfonodi (35%), ossa (25%), fegato (16%), tessuti molli (9%), midollo osseo (7%) ².

I RMS localizzati alla testa e al collo tendono a diffondersi per contiguità al sistema nervoso centrale. I RMS del tratto genito-urinario, del retro-peritoneo e degli arti metastatizzano soprattutto per via linfatica. Polmoni, fegato ed ossa sono gli organi più frequentemente colpiti dalle metastasi per via ematica.

E' importante una precisa stadiazione dei RMS ⁴. Quella clinica si avvale essenzialmente di moderne tecniche di diagnostica per immagine (TAC, RMN, scintigrafia ossea con tecnezio 99 per la ricerca di metastasi); quella patologica viene invece effettuata sui campioni operatori.

1.3 Classificazione istologica

Il rhabdomyosarcoma fu per la prima volta descritto nel 1854 ⁵, ma i suoi vari sottotipi istologici furono riconosciuti molto più tardi.

La classificazione più frequentemente adottata ed attualmente in uso è la classificazione dell'*Intergroup Rhabdomyosarcoma Study* (IRS) che tiene conto delle varie e più recenti conoscenze e studi prognostici nel campo dei RMS, quali l'opportunità di classificare come RMS alveolari anche i casi in cui l'aspetto alveolare sia solo focale; la descrizione di varianti particolari di RMS, come quello a cellule fusate o leiomatoso, che presenta buona prognosi, e i RMS con aspetti rabdoidi.

In essa gli istotipi istologicamente riconoscibili sono assegnati ad uno dei seguenti 4 gruppi prognostici. Prognosi buona: RMS botroide (BRMS) e RMS a cellule fusate; prognosi intermedia: RMS embrionale (ERMS); prognosi cattiva: RMS alveolare (ARMS) e sarcoma indifferenziato; prognosi incerta: RMS con aspetti rabdoidi ⁶⁻⁷.

Il RMS embrionale è caratterizzato da un lasso stroma mixoide con cellule a diverso stadio di differenziazione; si osservano cellule mesenchimali indifferenziate frammiste ad un numero variabile di rhabdomyoblasti, che possono mostrare le tipiche striature trasverse, a grandi cellule poligonali e a cellule con nucleo eccentrico e citoplasma allungato.

Il RMS alveolare è un tumore composto da setti connettivali fibrovascolari che separano nidi di cellule neoplastiche più o meno densamente stipate, che nei casi più tipici sono aderenti al connettivo verso la periferia degli alveoli, mentre appaiono poco coesive e quindi disgregate verso il centro. Una variante morfologica, nota come variante solido-

alveolare, è al contrario sprovvista di tipici aspetti alveolari e appare costituita esclusivamente da aree solide. In questo sottotipo la diagnosi è basata essenzialmente sullo studio di aspetti citologici (nuclei ipercromici, nucleoli evidenti e scarso citoplasma) e non di quelli architetturali. Mentre in passato tumori con aspetti misti embrionali ed alveolari venivano classificati in base alle aree quantitativamente predominanti, attualmente anche un minimo e focale disegno alveolare è considerato sufficiente per classificare il tumore come ARMS. Gli ARMS dal punto di vista citologico sono abbastanza variabili in quanto possono mostrare vari gradi di miogenesi; si va infatti da casi con minima differenziazione muscolare che simulano un sarcoma di Ewing, a casi con miogenesi marcata e associata a presenza di cellule rabdomioblastiche ben differenziate.

1.4 Istogenesi

Il RMS origina da precursori miogenici, probabilmente da cellule satelliti, cellule staminali quiescenti situate tra sarcolemma e lamina basale, che hanno perso il controllo della crescita e della differenziazione cellulare, ma ancora oggi, resta una questione insoluta l'identificazione di tali progenitori ⁸⁻¹⁰.

I meccanismi molecolari implicati nel controllo della differenziazione miogenica potrebbero riflettersi nei meccanismi patogenetici dello sviluppo del RMS ¹¹⁻¹⁵.

Durante la gastrulazione, che ha luogo nel corso del differenziamento embrionale, avviene la collocazione dei tre foglietti embrionali, l'endoderma in profondità all'interno dell'embrione ed, interposte tra il foglietto ectodermico ed il foglietto mesodermico, le cellule mesenchimali. Dal mesoderma parassiale si separano i somiti dai quali si generano tutte le cellule muscolari ad eccezione di quelle che danno origine ai muscoli della testa.

I somiti si sviluppano in due diversi compartimenti cellulari: lo sclerotomo e il dermatomiotomo, che si specializza in dermatomo e miotomo ¹⁶. Da quest'ultimo si generano i muscoli scheletrici del tronco e degli arti.

Cellule multipotenti del mesoderma miogenico sono commissionate verso la linea miogenica rispondendo a segnali locali dei tessuti adiacenti ¹⁷.

Dal dermamiotomo si origina una popolazione di cellule progenitrici del muscolo scheletrico (MCP), che migrano sia sotto a quest'ultimo, per formare il vero e proprio miotomo, che agli abbozzi degli arti per formare la muscolatura appendicolare. Queste cellule esprimono i fattori di trascrizione PAX3 e PAX7 e bassi livelli del fattore di determinazione miogenico MYF5.

La formazione del miotomo, sotto l'influenza di vari fattori, come SHH e WNT, richiede che le cellule esprimano alti livelli di MYOD e MYF5, che sono richiesti per la determinazione miogenica e lo sviluppo in mioblasti¹⁸. Esse necessitano di ulteriori fattori regolativi per differenziarsi in miociti. Questa differenziazione, seguita dalla maturazione in miofibre, avviene sotto l'influsso di membri secondari della famiglia MRF, quali MRF4 e Miogenina, considerati fattori di differenziamento piuttosto che fattori di determinazione¹⁹.

Sebbene MYOD1 e MYF5 definiscano l'identità dei mioblasti, i precursori somitici sembrano commissionati verso la linea miogenica prima dell'espressione dei membri della famiglia MRF e un ruolo importante è assunto da PAX3 e PAX7²⁰⁻²².

La fusione in mioblasti per produrre miotubi è suddivisa in due fasi. La prima consiste nella migrazione cellulare, il riconoscimento di cellule ed il loro allineamento, mentre la seconda implica la fusione cellulare. Il fattore di trascrizione FKHR, appartenente alla famiglia FOXO, è coinvolto come fattore di trascrizione positivo in queste ultime fasi²³.

Il meccanismo attraverso il quale le cellule migrano dal dermamiotomo negli abbozzi degli arti è regolato da molti fattori. Direttamente a valle della via di segnale di PAX3 si è identificato c-MET, la cui espressione è necessaria nei precursori miogenici per un'esatta migrazione negli arti dove è espresso ad alti livelli il suo ligando HGF/SF^{24,25}. Le cellule satelliti giocano, invece, un ruolo molto importante nello sviluppo del muscolo scheletrico post-natale e nella rigenerazione in seguito a danno²⁶⁻²⁸. Localizzate fra lamina basale e il sarcolemma delle miofibre, sono piccole cellule mononucleate rotonde mitotiche quiescenti e, sebbene sembrino commissionate verso il destino miogenico, non esprimono marcatori del differenziamento finale. Una volta attivate da vari stimoli esterni, sovraesprimono MYOD1 e rientrano nel ciclo cellulare dando origine a vari precursori miogenici. Grazie a diversi cicli di replicazione formano

un pool di cellule precursori che alla fine si fondono con le miofibre esistenti o ne formano di nuove.

Vi sono evidenze che le cellule satelliti, un tempo considerate una popolazione omogenea, possono presentare diverse origini e derivare da cellule staminali di derivazione muscolare, ma anche da cellule associate alla vascolarizzazione.

Lo sviluppo della linea di cellule satelliti dipende dall'attività del fattore di trascrizione PAX7, che è espresso in queste cellule sia nello stato quiescente sia nello stato attivato.

Animali privi di PAX7 non presentano cellule satelliti.

I processi miogenici sono esemplificati in figura 2.

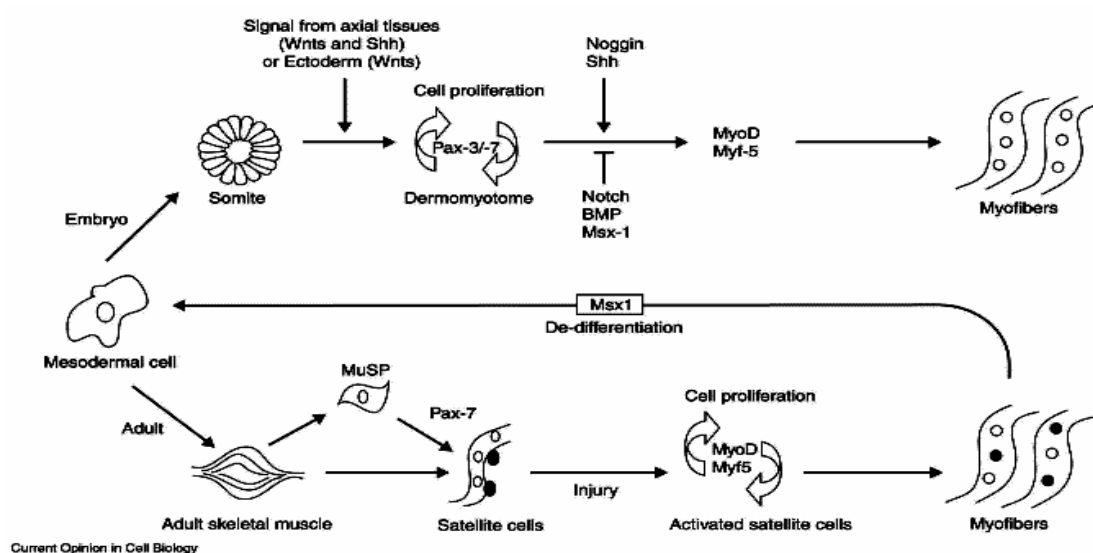


Figura 2 Comuni regolatori controllano la formazione dei progenitori cellulari muscolari nell'embrione e nell'adulto ²¹.

1.5 Aberrazioni cromosomiche associate al RMS.

Mediante citogenetica classica e analisi molecolari sono state osservate anomalie cromosomiche in tutti i sottotipi di RMS, tuttavia alcune regioni cromosomiche sono risultate coinvolte in modo non casuale in riarrangiamenti strutturali.

In circa il 70% dei casi di ARMS sono presenti due traslocazioni cromosomiche reciproche specifiche. Più frequentemente si riscontra la traslocazione che coinvolge il braccio lungo del cromosoma 13 e il braccio lungo del cromosoma 2, t(2;13)(q35;q14), e più raramente la traslocazione che coinvolge il braccio lungo del cromosoma 13 e il

braccio corto del cromosoma 1, t(1;13)(p36;q14). I geni coinvolti nelle traslocazioni sono stati identificati e clonati. *pax3* e *pax7*, localizzati rispettivamente sul cromosoma 2 ed 1, appartengono alla famiglia di geni regolatori *PAX* e mostrano tra loro una elevata omologia di sequenza. Entrambi sono caratterizzati da tre domini ben conservati: il paired box, l'omodominio e l'octapeptide. Si ritiene che questi geni abbiano un ruolo sia nel controllo dello sviluppo embrionale che nel mantenimento dell'espressione di geni tessuto specifici nei tessuti adulti.

Il gene localizzato sul cromosoma 13, denominato *fkhr*, appartiene alla famiglia di fattori di trascrizione "fork-head" e codifica una proteina nucleare che è caratterizzata da un dominio ben conservato denominato FD. In alcuni studi si è osservato il coinvolgimento di questa proteina nel processo miogenico.

Le traslocazioni codificano rispettivamente le proteine di fusione PAX3-FKHR e PAX7-FKHR che contengono le sequenze di legame al DNA di PAX3 e PAX7 intatte, la sequenza C-terminale del dominio FD, che non mantiene l'originale funzionalità e la regione C-terminale di FKHR. Le proteine chimeriche presentano un'alterata funzione trascrizionale e si pensa estendano il loro effetto oncogenico attraverso la regolazione dell'espressione genica^{15, 29-30}.

I prodotti reciproci delle traslocazioni non sono solitamente identificati nei tumori suggerendo che essi non abbiano un ruolo attivo nella trasformazione neoplastica.

Sporadicamente in casi di RMS si sono individuate altre traslocazioni cromosomiche, quali: inv(2)(p15q35), t(2;8)(q37q13), t(2;2)(q35p23)^{31,32}.

Non si sono finora identificate traslocazioni specifiche associate al ERMS, che invece presenta nella maggior parte dei casi perdita di eterozigotità nella regione cromosomica 11p15.5 con duplicazione del materiale genetico paterno e perdita del materiale genetico materno. La perdita di alleli materni porta al mancato funzionamento del gene *h19*, che svolge una funzione di soppressore tumorale e un aumento dell'espressione di *igf2*, gene coinvolto nella crescita cellulare.

Amplificazioni delle regioni 12q13, che interessano diversi geni come: *gli*, *sas*, *cdk4*, comunemente riscontrate nei sarcomi, sono state evidenziate anche in casi di RMS³³⁻³⁴.

Frequente è anche l'amplificazione della regione 2p24 sia negli ARMS che negli ERMS. Tale aberrazione cromosomica comporta nella maggior parte dei casi

sovraespressione dell'oncogene *mycn* che nei casi di ARMS è associata ad una prognosi più infausta ³⁵⁻³⁶

In alcuni casi di RMS sono state individuate mutazioni del gene *p53*, che regola la crescita cellulare, specificatamente la transizione dalla fase G0 a G1. Alcune famiglie predisposte all'insorgenza di RMS presentano mutazioni missenso nella linea germinale ³⁷.

Si sono inoltre rilevate mutazioni attivanti degli oncogeni *n-ras* e *k-ras* ³⁸ e in linee cellulari di RMS e modelli murini di ARMS si è osservata una sovraespressione di *met*, che a valle del fattore di crescita HGF/SF promuove la motilità cellulare e la resistenza alla chemioterapia ³⁹⁻⁴⁰.

1.6 Perché utilizzare approcci genomici per lo studio del RMS

Nello studio di una patologia complessa come il RMS, che comprende sia processi di carcinogenesi che i meccanismi di differenziazione muscolare, si rende necessario un approccio di tipo genomico, tale da poter indagare diversi aspetti della biologia. A tal proposito, diversi gruppi di ricercatori utilizzano la tecnologia dei *microarray*, che permette di monitorare contemporaneamente il livello di espressione di un numero elevato di geni, ossia il livello relativo dell'espressione di ogni trascritto tra due o più campioni in esame. Tale tecnologia consente di analizzare i profili di espressione in diversi tessuti e l'individuazione di geni tessuto specifici o di gruppi genici attivati o repressi in particolari situazioni, ad esempio dopo un trattamento farmacologico o durante il ciclo cellulare ⁴¹⁻⁴².

Le applicazioni dei *microarray* hanno avuto un enorme sviluppo in campo oncologico negli ultimi anni. Tramite questa tecnologia si sono potuti identificare nuovi marcatori per diverse forme tumorali ⁴³ ed essa si è anche affiancata a metodi già in uso per analisi diagnostiche.

Con l'utilizzo di questa tecnica è stata confermata la classificazione clinica di alcune patologie e si è riusciti a dimostrare l'associazione inequivocabile tra alcuni sottotipi e particolari anomalie cromosomiche ⁴⁴.

Numerosi passi avanti sono stati fatti riguardo l'identificazione di nuovi sottotipi all'interno della stessa classe tumorale, distinti in base al diverso profilo trascrizionale dei pazienti e mediante l'identificazione del tipo di cellule di origine ^{45, 31}.

A tal proposito, in un nostro recente lavoro ²⁹, è stata utilizzata la tecnica dei *microarray* a cDNA per studiare il profilo di espressione genica in pazienti affetti da ARMS. Un risultato interessante è che i profili di trascrizione genica ottenuti dagli esperimenti discriminano chiaramente i pazienti con biopsia positiva alla traslocazione t(2;13) dai pazienti con biopsia negativa. Con l'ausilio di un *software* apposito è stato identificato un gruppo di geni differenzialmente espressi comuni a tutte le 14 biopsie rispetto al muscolo scheletrico fetale. La maggior parte dei geni sottoespressi erano coinvolti nella morfogenesi e motilità cellulare ma altri erano coinvolti nella crescita e mantenimento cellulare. Tra questi è stato identificato un gene, *bin1*, che è stato confermato anche in altri lavori di analisi dei profili trascrizionali associati al RMS ^{31, 46}, ma la cui funzione non è ancora chiara.

1.7 Bridging integrator protein-1 o BIN1

BIN1 o ANPHYPHYSIN II è stato originariamente identificato nel 1996 da Sakamuro et al. grazie all'interazione con C-MYC, individuata tramite il saggio del doppio ibrido di lievito ⁴⁷ (figura 3).

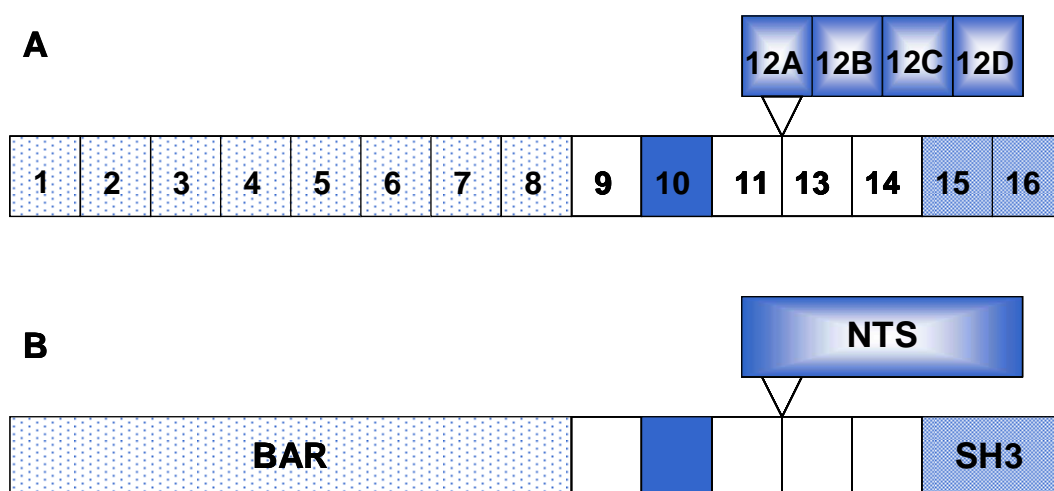


Figura 3. Struttura del gene e della proteina BIN1. A. 19 esoni danno luogo ad almeno 10 diverse isoforme. B. Domini proteici che possono essere inclusi nelle diverse isoforme di BIN1.

Il gene umano *bin1* è localizzato sul braccio corto del cromosoma 2 ed è costituito da 19 esoni, di cui gli esoni 10, 12A, 12B, 12C, 12D e 13 sono sottoposti a *splicing* alternativo (figura 3). Finora sono state individuate almeno 10 isoforme diverse, le cui localizzazioni e funzioni sembrano essere tessuto specifiche⁴⁸⁻⁵¹.

Il promotore del gene è ricco di regioni CpG che lo rendono altamente suscettibile allo stato di metilazione che può determinare una bassa espressione o totale assenza di trascritto⁵¹⁻⁵². Sul promotore sono inoltre presenti siti di riconoscimento per MYOD/MYF, SRF e NF-κB⁵³.

BIN1 appartiene ad una famiglia di proteine adattatrici, che sono caratterizzate da un dominio nella regione N-terminale, altamente conservato, detto BAR (BIN1/AMPHIPHYSIN/RVS), la cui funzione non è ancora del tutto chiara (figura 3). Studi recenti ne hanno dimostrato un ruolo nei processi di dimerizzazione delle proteine, di legame alla membrana cellulare e di ripiegamento di quest'ultima⁵⁴⁻⁵⁶. In particolare, tramite il dominio BAR, BIN1 è in grado di legarsi ai liposomi che contengono fosfatidilinositolo 4,5 bifosfato, PI(4,5)P₂. Questo legame è più forte nelle isoforme che presentano l'esone 10, che contiene aminoacidi altamente basici e ricorda una sequenza aminoacidica di legame al fosfatidilinositolo 4,5 bifosfato^{57,58}.

Sebbene BIN1 sia espresso in molti tessuti⁵⁹, l'esone 10 caratterizza isoforme presenti prevalentemente nel tessuto muscolare. Altamente espresso nel muscolo scheletrico adulto, BIN1 si localizza prevalentemente a livello dei tubuli T. Tale localizzazione potrebbe essere spiegata dal coinvolgimento di BIN1 sia nell'organizzazione che nel mantenimento della normale morfologia dei tubuli T, già dimostrato nella linea cellulare murina C2C12 differenziata e in *Drosophila*^{57, 60, 61}. Studi in cui è stato analizzato l'effetto dell'espressione della proteina in C2C12 posti in terreno di differenziamento dimostrano un ruolo di BIN1 nell'accelerare l'espressione del programma di differenziamento⁶⁰. *In vivo*, la mancata espressione di BIN1 in topo comporta la morte perinatale degli embrioni, prevalentemente caratterizzati da cardiomiopatia ventricolare. Gli animali *wild-type* rivelano un'espressione della proteina prevalentemente nucleare nei cardiomiociti ventricolari. Sebbene la mancata espressione di BIN1 abbia un effetto meno drastico sul muscolo scheletrico, comporta una errata organizzazione delle miofibrille, che presentano sarcomeri con diffuse linee z e mancata presenza di bande A⁶². Nell'uomo, mutazioni del gene *bin1*, che comportano la mancata associazione con la

proteina Dinamina 2 a livello dei tubuli T, sono associate a miopatie centronucleari autosomiche recessive⁶³.

BIN1 è inoltre caratterizzato da un dominio SH3 non catalitico (figura 3) di interazione proteina-proteina nella regione C-terminale. Attraverso questo dominio BIN1 è in grado di interagire fisicamente con la proteina Dinamina 2 e con l'oncogene C-MYC, che presenta un motivo di legame al dominio SH3 nella regione MB1. Il legame è possibile solo se il residuo serinico 62 di C-MYC non è fosforilato, suggerendo che l'interazione possa essere regolata da specifiche condizioni fisiologiche a cui sono sottoposte le cellule^{64, 50}. La regione nel dominio SH3, riconosciuta da c-MYC per l'interazione, è il primo determinante necessario per il legame tra le due proteine sebbene lavori precedenti a quello pubblicato da Pineda-Lucena et al nel 2005⁶⁴ dimostrino che il *MYC Binding Domain* (MBD) di BIN1 è localizzato nella regione codificante rappresentata dagli esoni 13-14.

Alcune isoforme di BIN1 espresse prevalentemente nel citoplasma del tessuto cerebrale sono caratterizzate da un dominio NTS, codificato dagli esoni 12A-12D, che è richiesto per i processi di endocitosi grazie ad interazioni con proteine endocitiche quali la clatrina^{56, 65-68}, (immagine3). L'esone 12A codifica un motivo di legame al dominio SH3 e compete con C-MYC per il legame al dominio SH3 di Bin1 stesso attraverso una via intramolecolare⁶⁴.

L'associazione di BIN1 a membri della famiglia MYC influenza la suscettibilità delle cellule all'apoptosi sebbene il meccanismo non sia stato ancora chiarito. In linea con tale assunzione è stata osservata la sottoespressione di BIN1 in diversi tessuti tumorali e la presenza in essi di isoforme caratterizzate dall'esone 12A^{69, 70}.

La sovraespressione di Bin1 in linee cellulari di fibroblasti embrionali murini e di pollo trasformati, di osteosarcoma, melanoma, neuroblastoma, tumore prostatico e alla mammella porta a una riduzione della crescita e/o a morte cellulare che coinvolge sia meccanismi caspasi dipendenti che meccanismi caspasi indipendenti⁷¹⁻⁷⁷. BIN1 non è un fattore proapoptotico di per sé, ma la sua azione dipende sia dall'espressione di MYC che dalla trasformazione neoplastica⁷⁸. Infatti, non si osservano fenomeni di morte cellulare in linee cellulari non trasformate, quali C2C12, fibroblasti diploidi umani IMR90 e melanociti umani normali in cui è stata indotta una sovraespressione del gene.

E' stato dimostrato un ruolo di BIN1 nell'apoptosi sia mediata da inibitori dell'enzima farnesiltransferasi che dal fattore TNF ^{79, 80}. Comparando gli effetti del TNF su fibroblasti embrionali di topo *wild type* (MEF *bin1*^{+/+}) e ingegnerizzati per non esprimere Bin1 (MEF *bin1*^{-/-}), entrambi trasformati con H-RAS e C-MYC, solo nei MEF *bin1*^{+/+} si è osservato la frammentazione della proteina PARP e l'attivazione della proteasi caspasi 3, segnali che indicano l'attuazione del processo di morte cellulare.

Oltre ad un ruolo nel blocco della crescita cellulare e dell'apoptosi, BIN1 svolge un'azione di soppressore tumorale attraverso altre vie. Infatti, controlla negativamente l'espressione del gene *indo*, che codifica l'importante enzima immunoregolatore indolamina 2,3 diossigenasi. INDO catalizza lo *step* iniziale del catabolismo del triptofano. Promuovendo l'eliminazione del triptofano dal microambiente, INDO può bloccare l'attivazione dei linfociti T causando il mancato riconoscimento da parte del sistema immunitario delle cellule tumorali ⁸¹.

La recente individuazione dell'associazione fisica tra BIN1 e KU70 e KU80, proteine coinvolte in processi di apoptosi, risposta in seguito a danno del DNA e mantenimento della lunghezza dei telomeri, fa supporre una connessione tra BIN1 e la fisiologia dei telomeri. Ciò sembra evidente anche analizzando l'azione del gene omologo nel lievito *hob1*, a monte della via di segnale di RAD6-SET1, che svolge un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi dei telomeri e nel mantenimento della repressione trascrizionale dell'eterocomatina ⁸²⁻⁸⁴.

E' importante individuare le vie di segnale che coinvolgono BIN1 al fine di chiarire i meccanismi che stanno alla base delle funzioni svolte dalla proteina sia nelle cellule tumorali che in tessuti sani.

Scopo della tesi

Diversi lavori sono stati effettuati nel RMS per individuare geni differenzialmente espressi nel tessuto patologico rispetto al tessuto sano al fine di delucidare l'eziopatogenesi di questa neoplasia. Tra essi è stata confermata la sottoespressione nel tumore del gene *bin1*, considerato un onco-soppressore, la cui azione è ancora poco chiara.

Questo studio si propone di analizzare l'espressione sia quantitativa che qualitativa del trascritto di *bin1* in linee cellulari di RMS, alveolare ed embrionale, e di valutarne l'espressione proteica.

L'analisi, inoltre, si prefigge di caratterizzare *pathways* influenzati dall'espressione di BIN1 per chiarire il suo ruolo funzionale nella patologia RMS.

MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari

Le linee cellulari umane di ARMS, RH30, RH28, RH4, che presentano la traslocazione t(2;13)(p15;q35) e RC2, positiva per la traslocazione t(1;13), le linee cellulari di ERMS, RD, SMS-CTR,CCA, la linea cellulare di fibroblasti murini 293T e la linea cellulare di fibroblasti di scimmia COS7 sono state mantenute in coltura con RPMI addizionato di glutammina (2mM), penicillina (100U/ml) e streptomina (100ug/ml), 10% FCS inattivato, a 37°C e 5% di CO₂.

3.2 Reagenti ed anticorpi

I reagenti per la quantificazione proteica (BCATM *protein quantitation assay*) sono stati acquistati da Pierce (Pierce Chemical Co., USA), mentre la soluzione chemiluminescente impiegata per la determinazione delle proteine sulle membrane di nitrocellulosa è stata acquistata da GeHealthcare (GeHealthcare, UK).

Gli anticorpi monoclonali anti-BIN1 (99D e 2F11) sono stati acquistati da Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) così come l'anticorpo policlonale anti-HDAC (H-51). L'anticorpo monoclonale anti-ACTINA (AB-1) è stato acquistato da Oncogene (Oncogene Research Products, USA).

La Sybr Green PCR Master Mix utilizzata per effettuare la PCR quantitativa è stata acquistata da Applied Biosystem (AB Applied Biosistem, USA), mentre i *primers* sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., USA).

Il *kit* Topo TA *Cloning* utilizzato per il subclonaggio dei prodotti di PCR e i batteri DH5 α necessari per la trasformazione batterica e le LipofectamineTM 2000 utilizzate per le trasfezioni sono stati acquistati da Invitrogen (Invitrogen Corporation, USA).

Per gli esperimenti di *microarray* si sono utilizzati i *chips* U133Plus dell'Affimetrix, Inc (Affimetrix Inc., USA) e il *software* Gene Chip Operating Software (Affimetrix Inc., USA), mentre per la preparazione dei campioni da ibridare si sono utilizzati i seguenti *kits*: SuperScript Choice System di Invitrogen (Invitrogen Corporation, USA), MEGAscript T7 High Yield Transcription *kit* (Ambion Inc., USA), *Rneasy Kit* di

Qiagen. Nel cRNA sono stati incorporati i nucleotidi marcati *biotin-11-CTP* e *biotin-11-UTP* acquistati da Perkin Elmer (Perkin Elmer, USA). Il reagente TRIzol per l'estrazione dell'RNA totale è stato acquistato da Invitrogen (Invitrogen Corporation, USA).

I plasmidi MSCV, MSCVBIN1-10, MSCVBIN1-10-13 e PCDNA3BIN1+10 ci sono stati gentilmente offerti dal Dr. G. Prendergast (Lankenau Institute, Wynnewood, Pennsylvania, USA).

3.3 Identificazione dei trascritti di *bin1* nelle linee cellulari di RMS

Dopo avere estratto l'RNA, tramite Trizol e cloroformio da 7 linee cellulari di RMS (RC2, RH30, RH4, RH28, RD, CCA, SMS-CTR) e avere effettuato la retrotrascrizione a partire da 1µg di RNA, si sono amplificate tramite PCR separate le porzioni di *bin1* comprese tra gli esoni 9-11 e 9-10 con le seguenti coppie di *primers* :

1 *Forward*-CTCAACCAGAACCTCAATGA

1 *Reverse*-CGCGTTGTCACCTGTTCTTTT

2 *Forward*-GAGCAACACCTTCACGGTCAAC

2 *Reverse*-TCGTGGTTGACTCTGATCTCGG.

Il ciclo di amplificazione è il seguente:

1. 95°C 2 min
2. 95°C 30 sec
3. 60°C 30 sec
4. 72°C 30 min
5. 72°C 10 min
6. 4°C 5 min

I punti 2, 3 e 4 sono stati ripetuti per 35 cicli.

La verifica della presenza degli amplificati e della grandezza di quest'ultimi è stata eseguita con corsa elettroforetica su gel di agarosio. I prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione, ad eccezione di quelli derivati dalle RC2, sono stati purificati tramite gli enzimi, fosfatasi alcalina (2U/µl) e esonucleasi I (10U/µl) e sequenziati a partire dall'estremità 5' utilizzando la chimica del BIGDYE Dye-Deoxy-Terminatot e

analizzati tramite un sequenziatore automatico ABI 3700²⁸. I prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione in RC2 sono stati clonati in un vettore plasmidico tramite il kit Topo TA Cloning (materiali e metodi 5.2) come da manuale (TOPO TA Cloning Manuale d'istruzione 25-0184) e con la ligazione ottenuta si è proceduto alla trasformazione di batteri DH5a tramite *shock* termico (30 min in ghiaccio, 1 min a 42°C, 2 min in ghiaccio). Dopo 1 ora di incubazione a 37°C e in agitazione a 100 rpm i batteri trasformati sono stati piastrati su terreno di crescita solido LB addizionato di ampicillina ad una concentrazione 0,05 mg/ml e incubati a 37°C per circa 16 ore. I batteri formanti le colonie sono stati ripresi in terreno di crescita liquido LB ed incubati ancora a 37°C per due ore. E' seguita l'amplificazione tramite PCR della regione *polilinker* del vettore, utilizzando una coppia di primer esterni al sito di clonaggio e come template i batteri stessi. Il ciclo di amplificazione è il seguente:

1. 95°C 5 min
2. 95°C 30 sec
3. 58°C 30 sec
4. 72°C 1 min
5. 72°C 10 min
6. 4°C 5 min

I punti 2, 3 e 4 sono stati ripetuti per 35 cicli.

La verifica della presenza dell'inserito e della grandezza di questo è stata eseguita con corsa elettroforetica su gel di agarosio. Il prodotto di PCR è stato purificato tramite gli enzimi e sequenziato come descritto sopra.

A partire dal cDNA ottenuto, dopo retrotrascrizione, da RC2, RH30 e RD si sono utilizzati i primers in tabella 1 per l'amplificazione tramite PCR della regione N-terminale (da esone 1 a esone 9), centrale (da esone 9 a esone 14) e T-terminale (da esone 14 a esone 16). Al fine di individuare isoforme caratterizzate dall'esone 10 in RH30 e RD si è effettuata un'amplificazione della regione dall'esone 10 all'esone 14 (tabella1).

Tabella 1. Primers utilizzati per l'amplificazione dei trascritti di BIN1 nelle tre linee cellulari di RMS

Amplificazione della regione N-terminale (1-9)	<i>Primer forward:</i> GCAGAGATGGGCAGTAAAGG <i>Primer reverse:</i> TGACCGTGAAGGTGTTGCT
Amplificazione della regione centrale (9-14/10-14)	<i>Primer forward:</i> GAGCAACACCTTCACGGTCAAG <i>Primer reverse:</i> ACCACGACAGCAGGAAGAGA <i>Primer forward:</i> AAAGTAAACTGTTTTTCGCGGCT <i>Primer reverse:</i> CTCCACGGTGCCATTAC
Amplificazione della regione C-terminale (14-16)	<i>Primer forward:</i> TCTCTTCCTGCTCTCGTGGT <i>Primer reverse:</i> TGGTTCCAGTCGCTCTCCTT

Il ciclo di amplificazione è il seguente:

1. 95°C 2 min
2. 95°C 30 sec
3. 60°C 30 sec
4. 72°C 1 min
5. 72°C 10 min
6. 4°C 5 min

I punti 2, 3 e 4 sono stati ripetuti per 35 cicli.

I prodotti di PCR ottenuti dalla porzione centrale del trascritto BIN1 sono stati clonati in un vettore plasmidico tramite il *kit* Topo TA *Cloning* (vedi sopra) e dopo amplificazione della regione che comprende il *polylinker* a partire dai batteri trasformati si è effettuato una verifica degli amplificati tramite gel di agarosio e sequenziamento.

I prodotti di PCR, derivanti dalla porzione N-terminale e C-terminale sono stati sottoposti a sequenziamento diretto utilizzando la metodica sopra indicata.

3.4 Real Time PCR

L'espressione totale di *bin1* (tutte le isoforme) e di *gapdh* sono state analizzate utilizzando la *real-time* PCR con metodica di rilevazione dell'amplificato che si basa sull'utilizzo del Sybr Green.

I primers sono stati disegnati utilizzando il *software* Primer Express (PE Biosystems, USA) e sono riportati in tabella 2.

Tabella 2. Sequenze dei primers utilizzati in PCR quantitativa.

GAPDH	<i>Primer forward:</i> TCCTCTGACTTCAACAGCGA <i>Primer reverse:</i> GGGTCTTACTCCTTGGAGGC
BIN1	<i>Primer forward:</i> CTACACGGCCACTGACACAGA <i>Primer reverse:</i> TGGTTCCAGTCGCTCTCCTT

Come gene di riferimento per la normalizzazione dei dati è stato utilizzato il gene *gapdh* e la reazione di amplificazione per ogni campione è stata effettuata in triplicato.

Il ciclo di amplificazione è il seguente:

1. 50°C 2 min
2. 95°C 10 sec
3. 95°C 15 sec
4. 60°C 1 min

I passaggi 3 e 4 sono stati ripetuti per 40 cicli.

Al termine dei 40 cicli è stato effettuato il protocollo di dissociazione che rivela la presenza di amplificati aspecifici come eventuali contaminazioni di DNA o dimeri di primers.

Si è effettuata una quantificazione relativa dell'RNA dei geni bersaglio nei campioni di interesse (tessuto patologico e linee cellulari di RMS per l'analisi di *bin1* e la linea cellulare RH30 infettata con il vettore MSCVBIN1-10 rispetto ai campioni di controllo (muscolo scheletrico fetale e la linea cellulare RH30 infettata con il vettore vuoto MSCV).

Per ottenere il rapporto di espressione dei campioni *target* rispetto al campione di riferimento si è utilizzato il modello matematico comparativo del $\Delta\Delta CT$, dopo aver verificato che l'efficienze delle reazioni di amplificazione per ogni gene testato avesse il valore ottimale di 2.

3.5 Immunoblotting

Dopo abbondante lavaggio in PBS 1X, le cellule sono state risospese in buffer di lisi (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5; NaCl 140 mM; 1% TritonX-100; EDTA 5 mM; sodio fosfato 25 mM, pH 7.5; sodio ortovanadato 5 mM; EGTA 5 mM; DTT 1mM; MgCl₂ 1,5 mM; glicerolo 10%; sodio pirofosfato 1 mM; glicerofosfato 25 mM; aprotinina 20µg/ml; leupeptina 20µg/ml; PMSF 1mM) ed incubate in ghiaccio per 20 minuti. I lisati cellulari sono stati poi purificati mediante centrifugazione a 4°C (14.000 x g per 30 min.). Il surnatante contiene il *pool* proteico cellulare rappresentativo sia della frazione citosolica che di quella nucleare solubile. La concentrazione proteica è stata determinata mediante saggio colorimetrico con BCA (acido bicinconinico, 540 nm), utilizzando l'albumina sierica bovina (2 mg/ml BSA) come *standard* di riferimento. Una volta determinate le concentrazioni proteiche dei campioni, 50µg di lisato proteico, diluito in soluzione riducente RLB (*Reducing Loading Buffer*: DTT 77µg/ml; 1g/ml SDS; 50% glicerolo; 40% Tris-HCl 1M pH 6.8), sono stati separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide (12% SDS-PAGE). In condizioni denaturanti riducenti infatti, le proteine contenute negli estratti si separano lungo il gel esclusivamente in base al loro peso molecolare, indipendentemente dalla loro carica o conformazione, e proprio grazie a questo possono essere identificate.

Le proteine sono state poi trasferite O.N. su membrana di nitrocellulosa mediante elettroforesi mantenendo all'interno della camera di trasferimento temperatura (4°C) e voltaggio (50V) costanti. Le proteine cariche negativamente sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa, successivamente saturata in una soluzione bloccante di latte deidratato privo di grassi al 5% (2 H) per evitare il legame aspecifico dell'anticorpo con la superficie porosa della membrana. La membrana di nitrocellulosa è stata quindi ibridata con l'anticorpo specifico diretto contro la proteina di interesse, diluito opportunamente in una soluzione di latte deidratato (costituita da 2.5% latte deidratato privo di grassi), per 1 H e 30 min seguita da abbondanti lavaggi in TNE 1X, per eliminare l'eccesso di anticorpo non ibridatosi con la proteina. Per l'individuazione della proteina è stato poi impiegato il metodo della chemiluminescenza. Questa metodologia si basa sull'utilizzo di una perossidasi associata ad un anticorpo secondario che riconosce il frammento cristallizzabile (Fc) della specie biologica dalla quale deriva

l'anticorpo primario. In presenza di perossido di idrogeno, la perossidasi catalizza l'ossidazione di un diacil-idrazide ciclico creando un intermedio instabile che decade con l'emissione di luce. Questa luminescenza può essere rilevata tramite l'esposizione di una lastra per raggi-X poi processata con liquidi di sviluppo fotografico (reagenti di fissaggio e sviluppo).

3.6 Subfrazionamento cellulare

Per purificare la frazione citosolica e quella nucleare solubile, le cellule sono state lavate abbondantemente PBS 1X freddo, e quindi mantenute in ghiaccio secco per 2 min. Successivamente sono stati aggiunti 600 μ l di *Hypo-buffer* (per piastra p100) [pH 7.9] (10 mM HEPES; 10 mM KCl; 0.2 mM EDTA; 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, aprotinina 20 μ g/ml, leupeptina 20 μ g/ml, PMSF 1 mM) ed i campioni sono stati incubati, in agitazione, in ghiaccio per 5 minuti. E' stato quindi aggiunto il detergente non-ionico NP40 ad una concentrazione finale del 2% ed i campioni sono stati lasciati in agitazione a 4°C per ulteriori 5 min.

Per favorire la frammentazione delle strutture di membrana pur mantenendo l'integrità nucleare, i campioni sono stati quindi passati attraverso un ago 26.5 *gauge* per una decina di volte (in ghiaccio) e poi centrifugati per 2 min. a 10000 g. Il surnatante ottenuto, che rappresenta la frazione citosolica (citoplasmatica solubile), è stato trasferito in provetta, mentre il *pellet*, costituito da nuclei integri, dopo due lavaggi con PBS 1X, è stato risospeso in 30 μ l di *Hyper-buffer* (20 mM HEPES; 0.4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; aprotinina 20 μ g/ml, leupeptina 20 μ g/ml, PMSF 1 mM). I nuclei sono stati poi disgregati meccanicamente per mezzo di un pestello elettrico e, quindi, lasciati a roteare a 4°C per 30 min. Al termine la frazione nucleare solubile è stata purificata mediante centrifugazione a 10000 g, a 4°C per 5 min.

3.7 Immunofluorescenza

Le cellule sono state seminate ad una concentrazione di $0,08 \times 10^6$ in apposite camerette (Culture Slides Falcon, BD Bioscience, USA) e, dopo 24 ore, lavate per due volte in PBS 1X e fissate in una soluzione di paraformaldeide al 3.7% per 20 min. Dopo 4

lavaggi di 5 min in PBS 1X, sono state permeabilizzate in una soluzione di Triton X-100 allo 0,2% in PBS 1X, per 10 min. Questo processo è stato quindi interrotto con incubazione di 10 min in una soluzione 100 mM di glicina, seguita da una successiva incubazione di 10 min in FCS al 10%. Le cellule sono state incubate a 37°C per 1 ora con una soluzione contenente l'anticorpo primario BIN1 99D (anti-*muose*) ad una diluizione 1/50 e FCS 2% in PBS 1X. Dopo 4 lavaggi da 10 min in PBS 1X per rimuovere l'eccesso di anticorpo libero, le cellule sono state incubate a 37°C per 1 ora con una soluzione contenente l'anticorpo secondario anti-*mouse* (Alexa Fluor 546, Molecular Probes Inc., OR, USA), FCS 2% e DAPI (6,6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride), un colorante fluorescente blu che si intercala ai filamenti di DNA e caratterizza quindi distintamente il nucleo dalla frazione citoplasmatica, ad una diluizione 1/500 in PBS 1X.

Dopo 3 lavaggi di 10 minuti in PBS 1X, il vetrino è stato montato utilizzando una soluzione di glicerolo/PBS in rapporto 1/1. Le immagini sono state acquisite con telecamera digitale Leica DC 300, montata su microscopio Leica DMLB, ad ingrandimento 40X. L'analisi dell'immagine è stata eseguita con *software* Leica IM1000 (Leica Microsystem Ltd, Switzerland).

3.8 Trasfezione della linea cellulare 293T

Per analizzare l'espressione proteica di BIN1 nelle linee cellulari di RMS, è stata utilizzata come controllo positivo la linea cellulare di fibroblasti murini 293T trasfettati con plasmidi in grado di esprimere tre isoforme di BIN1 (MSCVBIN-10, MSCVBIN1-10-13, PCDNA3BIN1+10). La linea cellulare 293T è stata seminata ad una concentrazione di $0,7 \times 10^6$ in piastre da 6 pozzetti e dopo 24 ore le cellule sono state lavate 2 volte in PBS 1X e incubate 2 ore in terreno di coltura RPMI a 37°C. Sono stati preparati 500 μ l per pozzetto di terreno di crescita RPMI contenente 20 μ l di lipofectamine e dopo 5 min è stata addizionata ad una soluzione di 500 μ l per pozzetto di RPMI contenente 8 μ g del plasmide di interesse. Dopo un'incubazione di 30 min a temperatura ambiente alla *mix* è stato aggiunto 1 ml per pozzetto di RPMI e FCS tale da avere una concentrazione finale di FCS del 15%. Si è sostituito il terreno di crescita delle cellule con la soluzione di trasfezione e la valutazione della trasfezione effettuata è

avvenuta dopo 24 ore. L'utilizzo di un plasmide in grado di esprimere la proteina GFP, in grado di fluorescere naturalmente è stato utilizzato come controllo positivo della metodica di trasfezione.

3.9 Produzione di vettori retrovirali e infezioni

Per la produzione dei vettori retrovirali la linea *packaging* 293T è stata trasfettata con il DNA plasmidico, utilizzando la tecnica della co-precipitazione del calcio/fosfato. A tal fine si sono seminate 4×10^6 cellule in piastre p100 e dopo 24 ore sono state trasfettate con 12 μg di DNA plasmidico di interesse (MSCV/MSCVBIN1-10), 6 μg di plasmide codificante i geni gag e pol e 1 μg di plasmide esprime le proteine dell'envelop, mescolati con una soluzione 2 M di CaCl_2 e con *buffer* fosfato in modo da formare un fine precipitato poi disperso sopra la coltura cellulare. La *mix* di trasfezione è stata incubata 20 min a temperatura ambiente. Dopo 18 ore si è sostituito il terreno di coltura delle cellule e dopo ulteriori 24 ore si è raccolto il sovrinatante virale. Questo è stato centrifugato per 10 min a 1800 rpm per eliminare eventuali cellule in sospensione, filtrato con filtri di 0,45 μm di diametro e conservato a -80°C .

Per effettuare l'infezione $0,1 \times 10^6$ cellule di RH30 sono state seminate in piastre da 6 pozzetti e dopo 24 ore è stato sostituito il terreno di crescita con 1 ml di sovrinatante virale. Dopo 6 ore è stato eliminato il terreno contenente il virus e si è aggiunto alle cellule 2 ml di terreno di crescita. L'infezione è stata analizzata sia 72 ore che a 96 ore.

3.10 Valutazione del profilo trascrizionale di RH30 a seguito di infezione retrovirale con MSCVBIN-10

3.10.1 Generazione del profilo di trascrizione genica

Sono state effettuate tre infezioni in parallelo di RH30 sia con il vettore retrovirale MSCVBIN1(-10) che con il vettore MSCV vuoto (controllo). L'RNA totale è stato estratto alle 96 ore di infezione usando il reagente TRIzol ed è stato purificato usando l'*Rneasy Kit*. Da 5 μg di RNA totale è stato generato il cDNA a doppio filamento utilizzando il SuperScript Choice System e un oligonucleotide poli-dT che contiene il

sito di riconoscimento della T7 RNA polimerasi. Successivamente il cDNA è servito da template per generare un cRNA biotinilato attraverso una trascrizione in vitro per mezzo del MEGAscript T7 High Yield Transcription *kit* e i nucleotidi marcati con la biotina *biotin-11-CTP* e *biotin-11-UTP*. Il cRNA marcato è stato purificato e frammentato in accordo con il protocollo Affimetrix, Inc. Infine 15 µg di cRNA frammentato e i *chips* U133Plus 2.0 sono stati utilizzati per le ibridazioni.

I valori di espressione sono stati determinati attraverso il Gene Chip Operating Software nel quale sono incluse le procedure di normalizzazione.

3.10.2 Individuazione e analisi dei geni differenzialmente espressi

E' stato utilizzato il *software* TMeV sviluppato al TIGR (*The Institute for Genomic Research*), che permette di avere una visione globale dell'espressione genica di un gran numero di esperimenti contemporaneamente. Sono disponibili diversi algoritmi utili ad esempio per filtrare i valori a bassa intensità, per il raggruppamento (*cluster*) di geni di esperimenti simili e per l'individuazione di geni significativi da un punto di vista dell'espressione differenziale. Per determinare i geni differenzialmente espressi è stato utilizzato il programma statistico SAM (*Significance Analysis of Microarrays*), implementato in TMEV. SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) utilizza un approccio non parametrico che si basa su un set di t-test gene specifici. Il programma associa ad ogni gene un valore (d_i), sulla base della media e delle deviazioni *standard* di misure ripetute e confronta questo valore con un indice atteso. In base alla differenza tra questi valori identifica i geni differenzialmente espressi. Il valore atteso viene calcolato effettuando delle permutazioni, dividendo i dati forniti in due gruppi. Il programma fornisce una serie di valori delta (Δ), che rappresentano diversi gradi di differenza tra i valori attesi ed osservati ed a essi associa la percentuale di falsi positivi. I geni i cui valori delle diverse repliche risultano disomogenei non vengono considerati.

Successivamente, l'analisi delle categorie funzionali e di *pathways* associati ai geni differenzialmente espressi è stata effettuata utilizzando DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated discovery*). Questo programma è accessibile in rete e, integrando le informazioni presenti nei diversi *database* di annotazione, è molto

utile nell'interpretazione di dati prodotti su scala genomica, inclusi quelli ottenuti da esperimenti di *microarray* e da studi di proteomica. Al programma viene sottoposta una lista di geni, in questo caso i geni differenzialmente espressi individuati con SAM, i quali vengono annotati in accordo con le categorie della *GeneOntology*, i domini proteici e i *pathways* biochimici a cui appartengono. In particolare, l'annotazione dei geni mediante integrazione dei *databases* disponibili prevede la costruzione di classi di arricchimento, ovvero di categorie funzionali e di *pathways* particolarmente rappresentati nel *dataset* in esame e pertanto statisticamente significativi. Ciò si rivela molto utile nell'analisi dei dati di espressione, in quanto le categorie funzionali particolarmente arricchite rappresentano una chiara indicazione di co-regolazione di geni nei diversi campioni e/o pazienti analizzati.

Risultati

4.1 Validazione della sottoespressione di *bin1*.

In un nostro precedente lavoro sullo studio di espressione di 10 biopsie di pazienti affetti da ARMS avevamo osservato la sottoespressione significativa del gene *bin1* nei tumori rispetto al muscolo scheletrico fetale²⁹.

Per validare la deregolazione di *bin1* abbiamo utilizzato la tecnica della PCR quantitativa e, come template, l'RNA estratto da 8 biopsie precedentemente analizzate; 4 sono caratterizzate dalla traslocazione t(2;13) e 4 prive di traslocazioni. Come controllo abbiamo scelto, come nel precedente lavoro, l'RNA di muscolo scheletrico fetale commercialmente disponibile e come gene di riferimento, per normalizzare i valori di espressione, il GAPDH (figura 4).

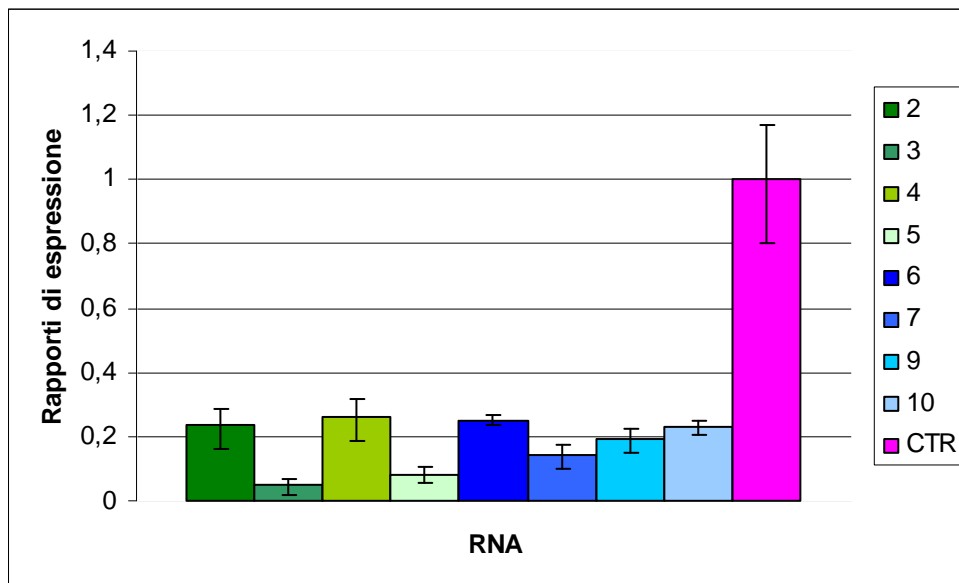


Figura 4. Espressione di *bin1* in 8 biopsie di ARMS rispetto al muscolo scheletrico fetale. I campioni sono numerati secondo l'ordine riportato nella pubblicazione di De Pittà et al, nella quale si ritrova anche la descrizione delle caratteristiche cliniche dei pazienti. Gli RNA 2, 3, 4, 5 sono stati estratti da biopsie caratterizzate dalla traslocazione t(2;13), mentre gli RNA 6, 7, 9, 10 derivano da biopsie negative alle traslocazioni. Per ogni campione è stato graficato l'intervallo di confidenza del 95% sulla base di tre repliche.

In tutte le 8 biopsie *bin1* (totale) risulta sottoespresso con rapporti di espressione rispetto al muscolo scheletrico fetale che, in valore assoluto, vanno da un minimo di

0,26 per il campione 4, che corrisponde ad una sottoespressione di 1,9 volte, ad un massimo di 0,05 per il campione 3, che corrisponde ad una sottoespressione di 4,3 volte. Non si osservano differenze importanti tra l'espressione del trascritto nei campioni positivi alla traslocazione (2, 3, 4, 5) rispetto a quelli negativi (6, 7, 9, 10). Abbiamo quindi valutato l'espressione di *bin1* in 7 linee cellulari di RMS rispetto al muscolo scheletrico fetale (tabella 3), 4 ARMS e 3 ERMS.

Tabella 3. Rapporti di espressione di *bin1* in RNA estratto da linee cellulari RMS rispetto all' RNA commerciale di muscolo scheletrico fetale.

	Rapporti di espressione	Log₂ del rapporto
RC2	0,10	- 3,35
RH30	0,17	- 2,57
RH4	0,22	- 2,19
RH28	0,11	- 3,24
RD	0,13	- 2,96
CCA	0,12	- 3,11
SMS-CTR	0,09	-3,49
Muscolo scheletrico fetale	1	0

Si conferma la sottoespressione di *bin1* in tutte le linee cellulari analizzate, con valori del rapporto di espressione che, in valore assoluto, vanno da un minimo di 0,22, che corrisponde ad una sottoespressione di 2,19 volte in RH4 al valore massimo di 0,09, che corrisponde ad una sottoespressione di 3,49 volte. Non si evidenziano differenze importanti tra le linee cellulari di ARMS (RC2, RH30, RH4, RH28) rispetto alle linee cellulari di ERMS (RD, CCA, SMS-CTR) (figura 5).

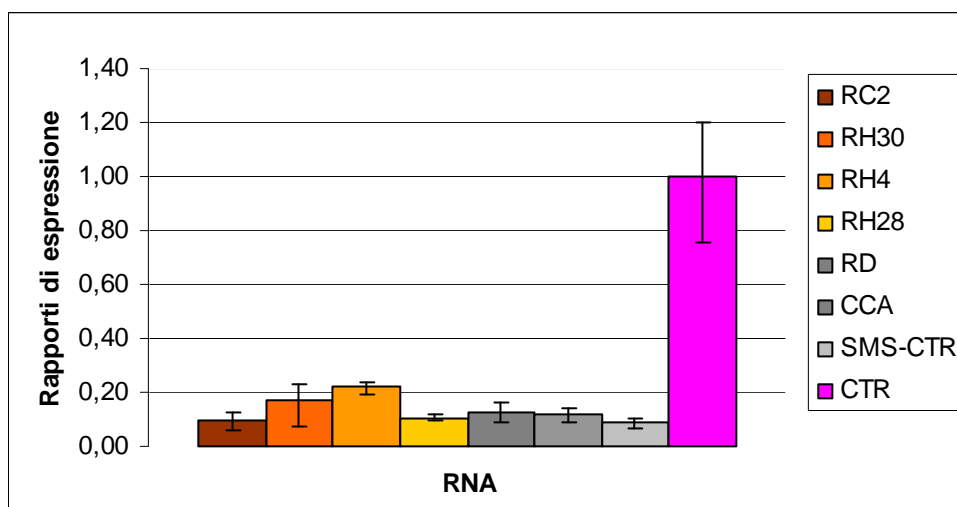


Figura 5. Rapporti di espressione di *bin1* in linee cellulari di RMS rispetto al muscolo scheletrico fetale. Le linee cellulari sono state mantenute in coltura per almeno 2 settimane e l'RNA è stato estratto in fase di crescita esponenziale. Per ogni campione è graficato l'intervallo di confidenza del 95% calcolato sulla base di tre misure ripetute.

4.2 Analisi dello *splicing* alternativo dei trascritti di *bin1*.

L'analisi del *pattern* di espressione di *bin1* nelle sette linee cellulari di RMS è stata ottenuta mediante PCR del trascritto a partire da cDNA ottenuti tramite RT-PCR. L'RNA utilizzato è stato estratto dalle linee cellulari di RMS (RC2, RH30, RH4, RH28, RD, CCA, SMS-CTR) e come controllo si è utilizzato l'RNA commerciale di muscolo scheletrico adulto. L'analisi qualitativa dei campioni, attraverso corsa su gel di agarosio, ha rivelato un'ottima qualità degli RNA poiché si individuano chiaramente tre bande distinte che rappresentano, a partire da quella a peso molecolare maggiore, l'rRNA 28S, l'rRNA 18S e l'rRNA 5S (*) (figura 6).

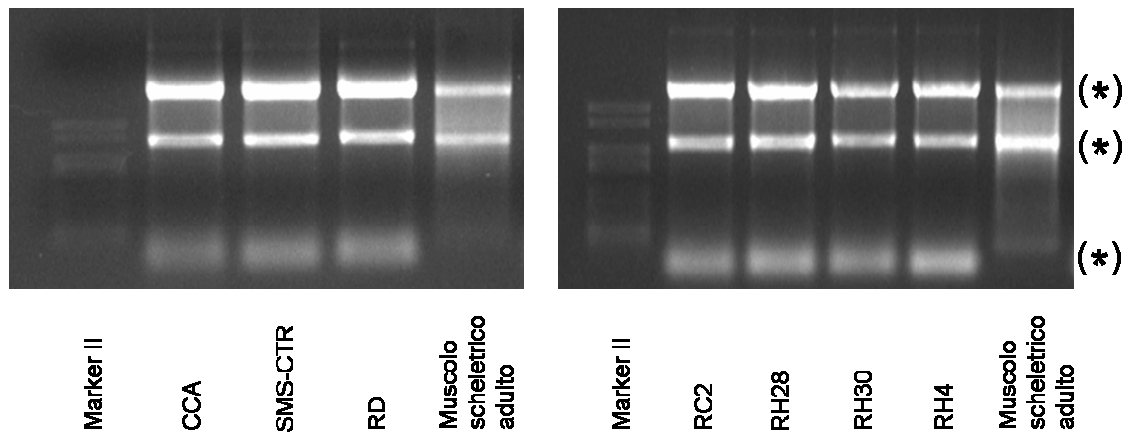


Figura 6. Valutazione della qualità dell'RNA dei campioni utilizzati per lo *screening* delle isoforme di *bin1* attraverso corsa elettroforetica in gel di agarosio.

L'amplificazione della porzione di *bin1* compresa tra gli esoni 9-11 (materiale e metodi) evidenzia la presenza sia di frammenti di trascritti caratterizzati dall'esone 10 che di isoforme caratterizzate dalla mancanza di tale esone in tutte le linee cellulari (figura 7). Data quindi la possibilità dell'espressione di un numero elevato di isoforme diverse lo studio si è concentrato sull'analisi dei trascritti di *bin1* nelle linee cellulari RC2, RH30 e RD.

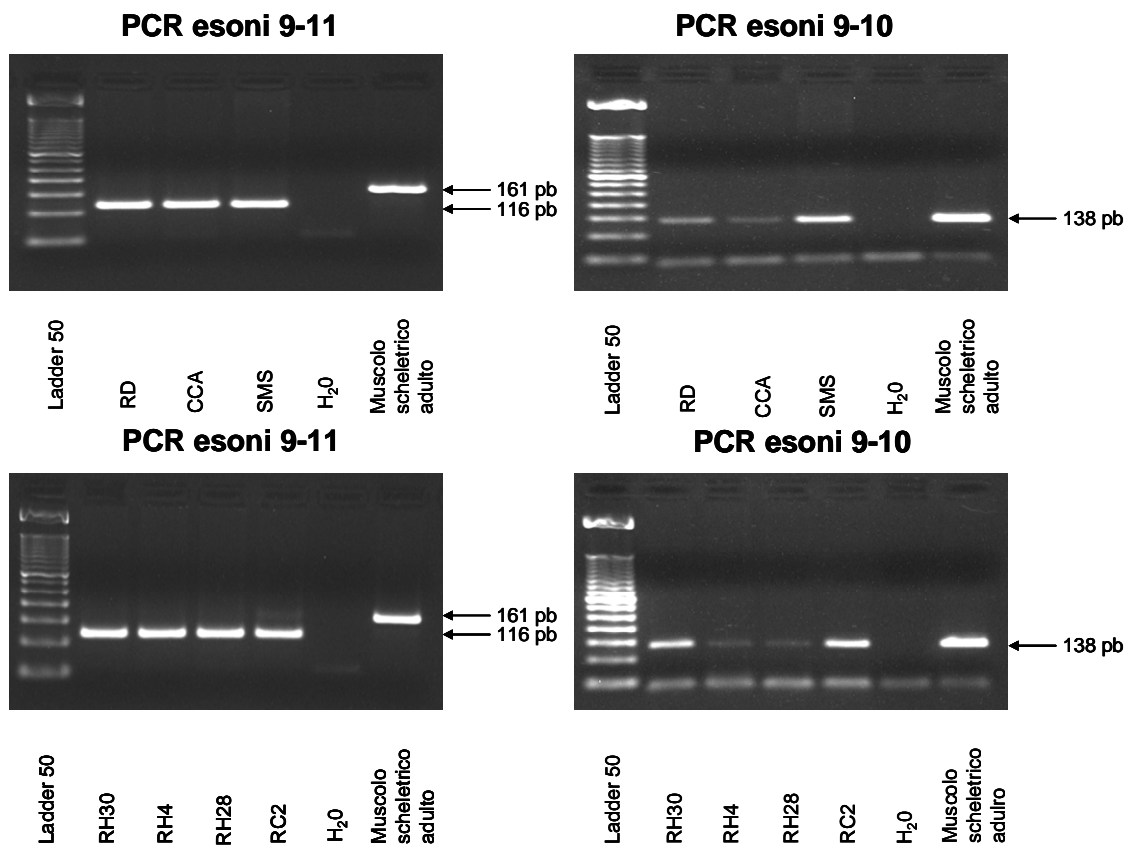


Figura 7. Amplificazione della porzione 9-11 del trascritto di *bin1* in linee cellulari di RMS. Come controllo per l'amplificazione si è utilizzato l'RNA commerciale di muscolo scheletrico adulto che esprime isoforme specifiche del muscolo caratterizzate dalla presenza dell'esone 10.

Il sequenziamento dei prodotti di PCR ottenuti dalle amplificazioni delle porzioni N-terminale, C-terminale e centrale di *bin1* in RC2, RH30 e RD dimostra la presenza di un numero elevato di trascritti (tabelle 4.1, 4.2, 4.3). Le amplificazioni delle porzioni comprese tra gli esoni 1-9 e 14-16 hanno evidenziato un singolo prodotto, indicando che queste regioni non sono sottoposte a *splicing* alternativo nelle linee cellulari osservate. Al contrario, l'amplificazione della regione centrale evidenzia nella linea cellulare RD l'espressione di 8 trascritti. In RC2 lo *splicing* alternativo produce 7 isoforme, mentre in RH30 da luogo a 5 diversi prodotti. Nelle tre linee cellulari esaminate lo *splicing* alternativo coinvolge l'esone 10, che caratterizza isoforme muscolo specifiche, 12A, che viene espresso nel tessuto nervoso o in tessuti tumorali probabilmente a causa di uno *splicing* aberrante, e 13, che fa parte di un porzione di *bin1* che si considerava

necessaria per l'interazione di BIN1 con c-MYC, ma che Kojma et al hanno in parte smentito.

Tabella 4.1 Isoforma identificata nella linea cellulare RD

Esoni	RD
1-9	+
10	+
11	+
12	+
13	-
14	+
15-16	+
Isoforme di <i>bin1</i>	<i>bin1(+10+12A-13)</i>

Tabella 4.2 Isoforme identificate nelle linee cellulari RC2 e RD

Esoni	RC2-RD	
1-9	+	+
10	-	+
11	+	+
12	+	-
13	-	-
14	+	+
15-16	+	+
Isoforme di <i>bin1</i>	<i>bin1(-10+12A-13)</i>	<i>bin1(-13)</i>

Tabella 4.3 Isoforme identificate nelle linee cellulari RC2, RH30 e RD

Esoni	RC2-RH30-RD				
1-9	+	+	+	+	+
10	-	-	-	+	+
11	+	+	+	+	+
12	-	-	+	-	+
13	-	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+
15-16	+	+	+	+	+
Isoforme di <i>bin1</i>	<i>bin1(-10-13)</i>	<i>bin1(-10)</i>	<i>bin1(-10+12A)</i>	<i>bin1(+10)</i>	<i>bin1(+10+12A)</i>

4.3 Analisi dell'espressione proteica di BIN1 nelle linee cellulari di RMS.

Tramite *western blotting* analisi, utilizzando due anticorpi che individuano diversi epitopi di BIN1 si è confermata l'espressione proteica di BIN1 nel lisato totale ottenuto dalle sette linee cellulari di RMS. L'anticorpo 99D, che riconosce un epitopo codificato dall'esone 13⁵⁰, ha identificato una sola isoforma, BIN1-10, in C2C12 in proliferazione e non l'isoforma nucleocitoplasmatica BIN1-10-13, priva dell'esone 13 (figura 8).

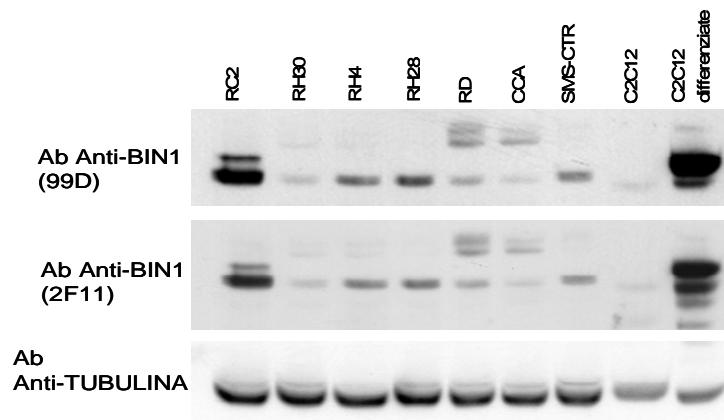


Figura 8. Western blotting analisi di BIN1 nel RMS. Tutte le linee cellulari qui analizzate sono state lisate in fase di crescita esponenziale e si sono caricati 50 μ g di lisato proteico in gel di poliacrilammide al 12%. Come controllo della quantità e qualità dei campioni caricati si è utilizzata la marcatura con l'anticorpo anti-TUBULINA, che funge da proteina di riferimento.

Una banda alla stessa altezza compare in tutte le sette linee cellulari di RMS ed è maggiormente espressa in RC2, RH4, RH28 e SMS-CTR e in C2C12 differenziate a 5 giorni. In questa linea cellulare differenziata l'anticorpo individua altre isoforme, non ben identificate in letteratura, ad eccezione di BIN1+10, alla cui altezza si riscontra una proteina anche in RC2. A peso molecolare maggiore si nota una coppia di bande, particolarmente evidenti, in RD e CCA, dovuta probabilmente allo *splicing* dell'esone 12A e a fosforilazione della medesima isoforma. L'utilizzo dell'anticorpo 2F11, che identifica un epitopo a cavallo tra l'esone 7 e l'esone 8 ed in grado di riconoscere tutte le isoforme, non mostra ulteriori isoforme nelle sette linee cellulari di RMS ad eccezione delle C2C12 in proliferazione e C2C12 differenziate in cui si identifica l'isoforma BIN1-10-13.

Considerando la quantità totale di proteina BIN1 espressa nelle linee cellulari di RMS rispetto alle C2C12, esse mostrano un'espressione intermedia tra le C2C12 in proliferazione e le C2C12 differenziate supportando l'ipotesi che BIN1 sia coinvolto nel differenziamento miogenico.

Per definire in modo più chiaro quali isoforme siano espresse nelle linee cellulari di RMS abbiamo effettuato una *western blot* analisi dei lisati proteici delle linee cellulari di RMS e, come controllo, la linea cellulare 293T trasfettata in modo transiente con le isoforme BIN1-10, BIN1-10-13, BIN1+10 e la linea cellulare di fibroblasti umani

WI38, che, come riportato in letteratura, esprime l'isoforma citosolica BIN1-12A ⁵⁹ (figura 9a-9b). Ad un'altezza di 50 KD le linee cellulari di RMS esprimono l'isoforma ubiquitaria BIN1-10. A 55 KD si evidenzia l'espressione della proteina BIN1+10 in RC2 e a 60 KD le WI38 esprimono BIN1+12A analogamente alle proteine di più alto peso molecolare in RH30, RD e CCA (figura 9 a-b).

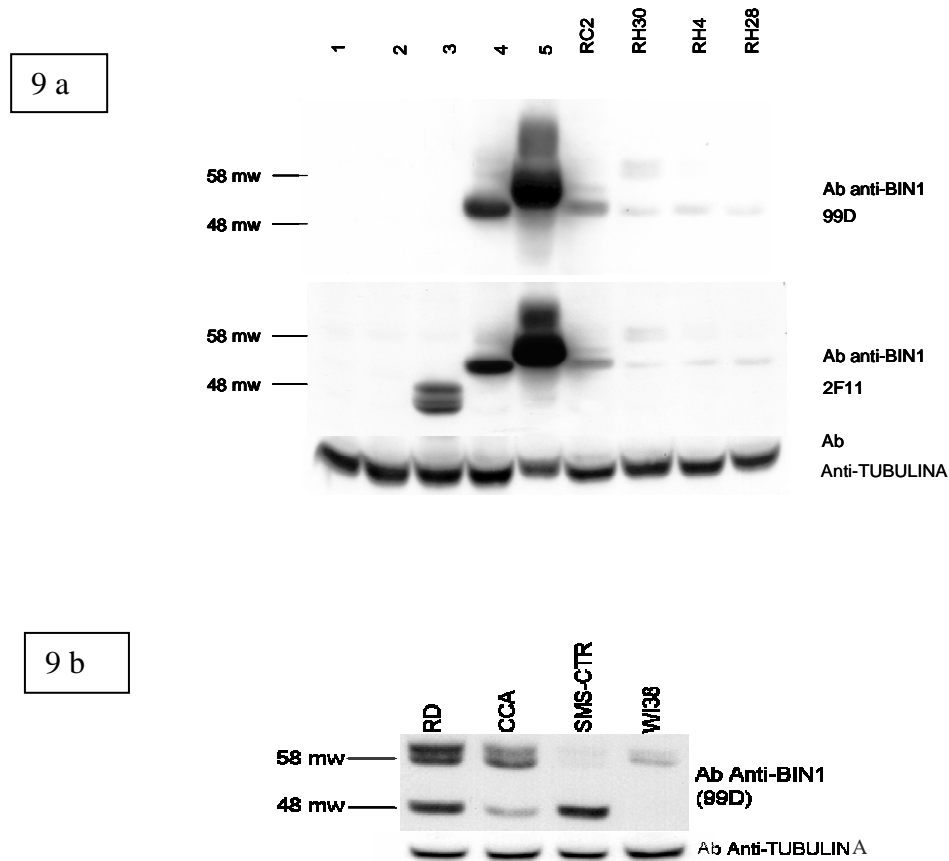


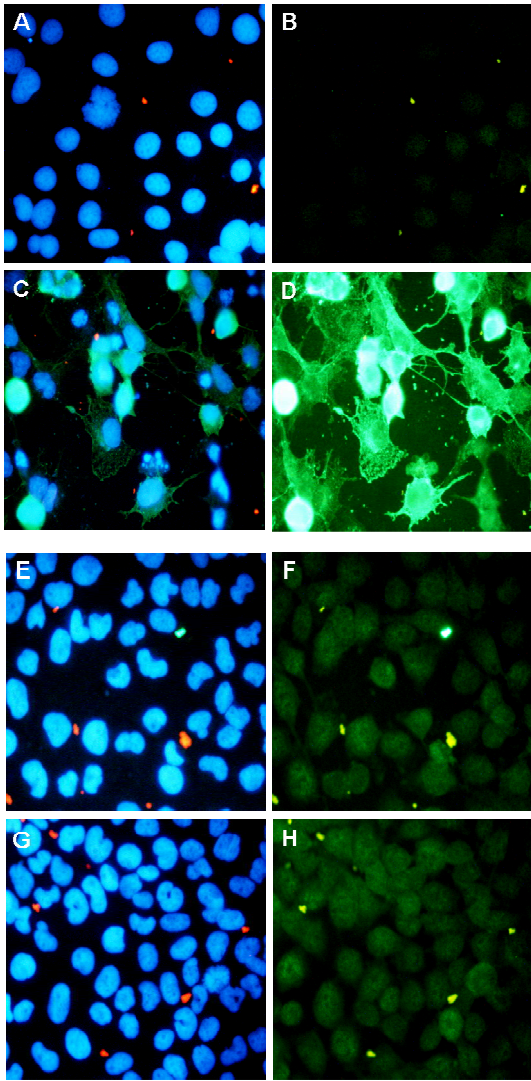
Figura 9. Identificazioni delle isoforme di BIN1. (a). Espressione di BIN1 in cellule trasdotte. I campioni numerati dall'1 al 5 corrispondono a 50 µg di lisato totale della linea cellulare 293T nelle seguenti diverse condizioni: 1=293T *wild type*; 2=293T trasfettate con il plasmide MSCV vuoto; 3=293T trasfettate con il plasmide MSCVBIN1-10-13; 4=293T trasfettate con il plasmide MSCVBIN1-10; 5=293T trasfettate con il plasmide PCDNABIN1+10. L'ibridazione con l'anticorpo anti-TUBULINA è stato utilizzato come controllo quantitativo dei lisati proteici caricati. (b). Espressione di BIN1+12A.

4.4 Localizzazione di BIN1 in cellule di RMS.

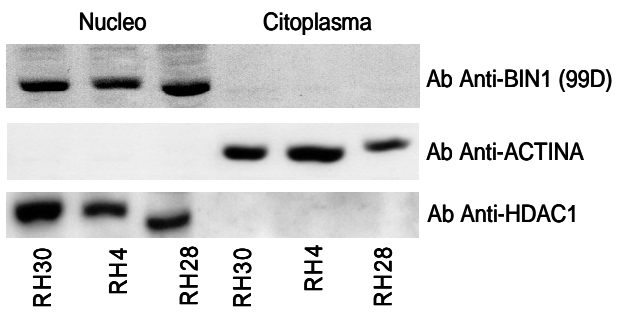
In letteratura sono riportati dati che attribuiscono diverse localizzazioni intracellulari alle isoforme di BIN1. Anche se i dati non sono del tutto concordanti, si ritiene che le isoforme ubiquitarie BIN-10 e BN1-10-13 si localizzano sia a livello nucleare che citoplasmatico; le isoforme caratterizzate dagli esoni 12 a livello citoplasmatico, mentre l'isoforma BIN1+10 è stata individuata a livello citoplasmatico, ma in esperimenti di trasfezione di linee cellulari con tale isoforma anche a livello nucleare.

La localizzazione cellulare di BIN1 in RH30 e RD è stata analizzata tramite immunofluorescenza, utilizzando come controllo negativo la linea cellulare COS7 e come controllo positivo cellule COS7 trasfettate in modo transiente con l'isoforma BIN1+10 (figura 10a). Come atteso, a seguito della trasfezione delle COS7 con BIN1+10, si rivela una intensa fluorescenza citoplasmatica ed anche nella regione nucleare (figura 10a-D), mentre le COS7 *wild type* presentano degli aloni di fluorescenza associabile al background (figura 10a-B). La lieve fluorescenza emessa dall'anticorpo anti-BIN1 (99D) in RH30 e RD (figura 10a-F/H), confrontata con l'epifluorescenza del DAPI nelle medesime cellule (figura 10a-E/G) evidenzia una localizzazione nucleare. Da questi dati non è chiaro se la localizzazione di BIN1 in queste cellule sia anche citoplasmatica e per definire ulteriormente la localizzazione della proteina, mediante metodiche di frazionamento cellulare, abbiamo purificato la frazione proteica citoplasmatica e nucleare solubile nelle stesse cellule processate per l'immunofluorescenza e in RH4, RH28, CCA, SMS-CTR (figura 10b). La *western blot* analisi utilizzando l'anticorpo anti-BIN1 (99D) ha dimostrato l'espressione della proteina BIN1-10 nella frazione nucleare sia delle linee cellulari di ARMS che di ERMS e in quest'ultime si evidenzia anche l'isoforma di BIN1 caratterizzata dall'esone 12A. La purezza delle frazioni nucleari e citoplasmatiche sono state confermate marcando le stesse membrane con gli anticorpi anti-Actina per la frazione citoplasmatica e anti-HDAC1 per la frazione nucleare.

10 a



10 b



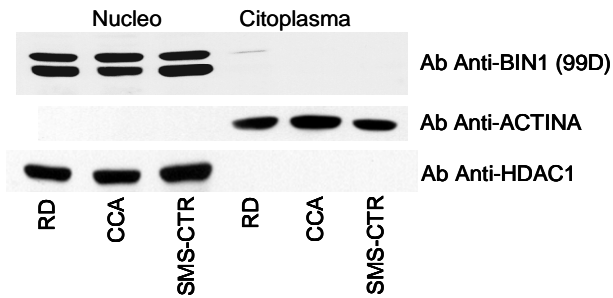


Figura 10. Localizzazione di BIN1 in RH30 e RD. (a) Tecnica di immunofluorescenza. Per valutare la distribuzione cellulare di BIN1, COS7 *wild type* e trasfettate con il plasmide PCDNA3 in grado di esprimere BIN1+10 (B-D), RH30 (F), RD (H) sono state processate mediante tecnica di immunofluorescenza come descritto nei “Materiali e metodi”. Dopo la permeabilizzazione le cellule sono state incubate a 37°C in presenza dell’anticorpo monoclonale anti-BIN1 (99D), rilevato successivamente con anticorpo secondario Alexa488. (b) La frazione proteica solubile citoplasmatica e nucleare è stata ottenuta come descritto in “Materiali e Metodi” da RH30, RH4, RH28, RD, CCA, SMS-CTR. 50 µg di lisati proteici sono stati caricati su gel di poliacrilamide, sottoposti in condizioni riducenti a elettroforesi, e trasferiti su membrana di nitrocellulosa e rilevati con anticorpi anti-BIN1 (99D), o anti-Actina e anti-HDAC1 per verificare la purezza delle frazioni stesse.

4.5 Espressione ectopica di BIN1-10 in linee cellulari di RMS

Utilizzando il vettore retrovirale MSCVBIN1-10, in grado di esprimere l’isoforma ubiquitaria BIN1-10 si sono sottoposte a infezioni le linee cellulari RH30 e RD. L’efficienza delle infezioni è stata valutata utilizzando un vettore retrovirale in grado di esprimere la proteina fluorescente GFP ed è stata stimata pari a circa 60% per entrambe le linee cellulari. L’espressione di BIN1 è stata valutata tramite *western blot* analisi sia a 72 che a 96 ore dall’infezione (figura 11). La sovraespressione di BIN1-10 è già rilevante a 72 ore ed aumenta alle 96 ore.

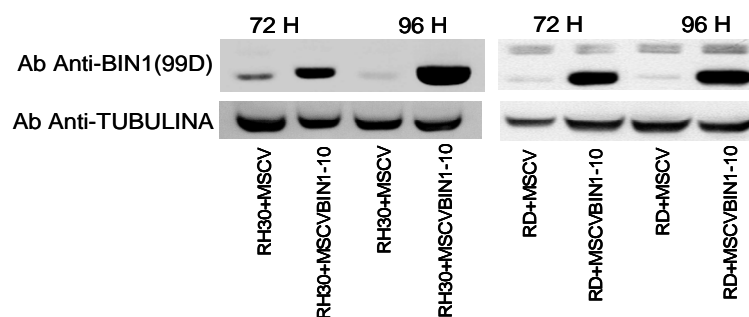


Figura 11. Espressione forzata di BIN1-10. 50 µg di lisato proteico totale è stato caricato per ogni campione dopo 72 e 96 ore dall'infezione con il vettore retrovirale MSCVBIN1-10 e sottoposto ad elettroforesi su gel di poliaccrilamide al 12%. Come controllo le membrane di nitrocellulosa sono state marcate anche con l'anticorpo anti-TUBULINA.

L'espressione proteica di BIN1 a 96 ore è stata valutata anche attraverso tecniche di immunofluorescenza (figura 12) utilizzando l'anticorpo anti-BIN1 (99D). Le cellule RD e RH30, infettate con l'isoforma BIN1-10 (B, D), mostrano un'intensa fluorescenza rispetto alle stesse cellule infettate con il vettore vuoto (A, C).

La proteina Bin1-10 si localizza sia a livello citoplasmatico che nucleare e ciò appare più chiaro confrontando la fluorescenza di BIN1-10 con l'epifluorescenza del DAPI nelle stesse cellule (D).

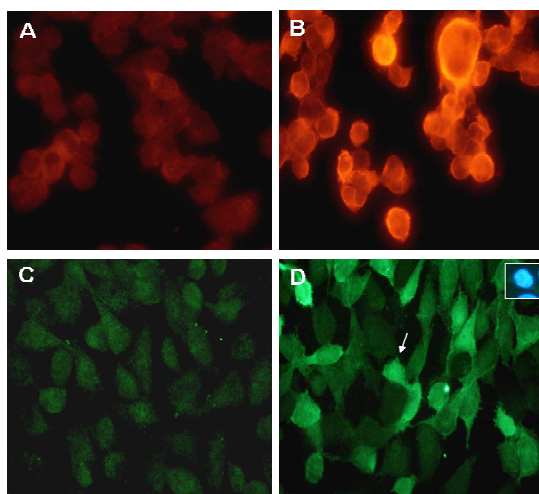


Figura 12. Sovraespressione di BIN1-10. Cellule RD (A, B) e RH30 (C, D) in crescita esponenziale sono state infettate con vettore retrovirale vuoto (A, C) o in grado di esprimere BIN1-10 (B, D), come descritto in Materiali e Metodi. Dopo 72 ore di infezione le cellule sono state seminate ad una concentrazione di $0,8 \times 10^6$ in apposite camerette e dopo 24 ore è stata valutata l'espressione di BIN1 con metodiche di immunofluorescenza, come da Materiali e Metodi. Nel riquadro D è riportata la fluorescenza dovuta alla marcatura con il DAPI del nucleo della cellula indicata con la freccia.

4.6 Analisi dei profili di espressione di RH30 infettate con il vettore retrovirale MSCVBIN-10

L'analisi dei profili di espressione genica è uno strumento utile per avere una visione generale dei possibili effetti che un singolo gene ha sul trascrittoma. Pertanto abbiamo analizzato l'effetto della sovraespressione dell'isoforma BIN1-10 con un approccio genomico, utilizzando la metodologia Affimetrix. Gli *arrays* scelti per le ibridazioni sono gli HG-U133 plus 2.0 che contengono 47.000 trascritti e varianti. La maggior parte delle sonde presenti sono selezionate da GenBank, dbEST e RefSeq e individuano geni già noti e circa 6.550 geni di più recente individuazione.

L'analisi dei profili di espressione genica sono stati effettuati utilizzando 6 campioni. 3 campioni di RNA sono stati ottenuti da RH30 sottoposte a 3 infezioni separate con il vettore retrovirale MSCVBIN-10 che esprime l'isoforma ubiquitaria BIN1-10 e, 3 RNA, utilizzati come controlli, da RH30 sottoposte ad infezione con il vettore retrovirale vuoto.

Abbiamo utilizzato la linea RH30 poiché esprime alti livelli proteici di NMYC. Alla luce dei dati riportati in letteratura, infatti, l'attività anti-oncogenica di BIN1 sembra dipendere dal legame con MYC⁷⁵ (figura 13). Tutte le 4 linee cellulari di ARMS, in particolar modo, le RC2 e RH30, esprimono livelli di NMYC più alti di quelle embrionali.

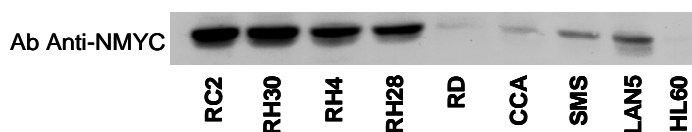


Figura 13. Espressione di NMYC. 50 μ g di lisato totale è stato caricato in gel di poliacrilamide al 12% e trasferito su membrana di nitrocellulosa. Si è utilizzato un anticorpo anti-NMYC per individuare la proteina.

Prima di effettuare le ibridazioni è stata confermata la sovraespressione del trascritto di *bin1* nelle 3 repliche di RH30 infettate con il vettore esprimente BIN1-10 rispetto al controllo tramite *real time* PCR (figura 14). Le cellule RH30, infettate con il vettore

MSCVBIN1-10, presentano livelli di *bin1* circa 11-12 volte maggiori rispetto alle RH30, utilizzate come controllo, e infettate con il vettore vuoto.

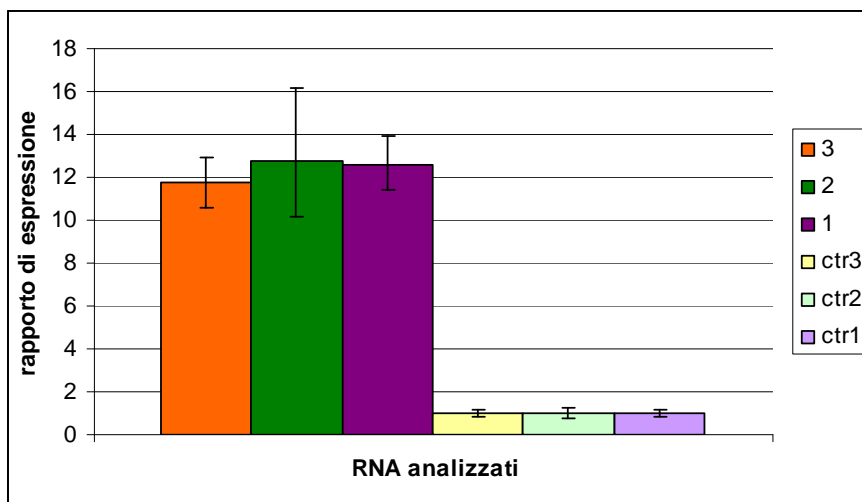


Figura 14. Espressione ectopica di *bin1* in RH30. I campioni 1, 2, 3 mostrano l'espressione del trascritto di *bin1* in RH30 a 96 di infezione con il vettore in grado di esprimere l'isoforma ubiquitaria *bin1-10*. I campioni ctr3, ctr2 e ctr1 rappresentano l'espressione di *bin1* in RH30 a 96 ore dall'infezione con il vettore vuoto.

Dopo normalizzazione dei dati grezzi abbiamo calcolato i rapporti di espressione per ogni coppia di infezioni (MSCVBIN1-10/MSCV vuoto) e, in seguito, utilizzando il *software* SAM, in modalità *One Class*, abbiamo identificato solo i geni differenzialmente espressi e omogenei nelle tre repliche biologiche in esame.

Dei 582 geni differenzialmente espressi, il 25%, pari a 147 sono risultati *up*-regolati e ben il restante 75%, pari a 435 geni, *down*-regolati (Appendice A).

Per riuscire a individuare i *pathways* e/o le categorie di geni coinvolti in particolari processi biologici legati all'azione di BIN1 abbiamo analizzato i geni differenzialmente espressi con il *software* DAVID, che si avvale di vari *database* (non solo quelli di *gene ontology*) per fornire raggruppamenti funzionali (*functional clusters*) di arricchimento. I *clusters* di arricchimento rappresentano categorie funzionali particolarmente rilevanti nel *set* di geni differenzialmente espressi rispetto al totale delle categorie del genoma umano e pertanto rappresentano i processi alterati nel modello sperimentale considerato. Ad ogni gruppo di categorie funzionali il programma associa un indice di significatività: più è alto lo *score* e più esso è significativo. Sebbene i *clusters* con indici maggiori

siano più significativi è più utile analizzare quelli con valori intermedi, perché rispetto ai primi, annoverano categorie formate da numeri di geni meno cospicui rendendo l'analisi più immediata.

Dai nostri dati risultano particolarmente arricchiti *clusters* che contengono le categorie “*signaling*” e “*intrinsic to membrane*” a dimostrare che le vie di segnale della cellule che sovraesprimono BIN1 sono alterate. Altre categorie particolarmente rappresentate sono “*ion transport*”, “*sodium transport*” e “*potassium ion transport*”, che presentano geni coinvolti nel trasporto di ioni. La regolazione di questi geni è particolarmente importante: infatti è noto come canali del potassio o scambiatori di sodio siano coinvolti non solo nel mantenimento del PH interno alla cellula, ma influenzino anche la sintesi e replicazione del DNA e la proliferazione e metastatizzazione di diversi tumori, quali carcinomi alla prostata, colon, polmone e mammella^{85, 86}. Ad esempio *trvp1* è stato individuato particolarmente espresso nel tumore alla prostata mentre risulta sottoespresso nel nostro modello tumorale⁸⁷.

Sebbene con *score* meno significativo si individua la categoria “*metabolism*”, che consta di circa 200 geni e annovera diverse proteine quali, ad esempio istoni, fosfatasi e chinasi.

Particolarmente importante potrebbero essere un *cluster* con uno *score* di 1,53, che comprende 3 categorie al cui interno si collocano geni coinvolti nell'infiammazione e immunità, quali *ccl2*, *tlr3* e *il-1 alpha* e, con uno *score* del 0,83, delle categorie coinvolte nel metabolismo degli aminoacidi nei quali spicca il gene *indo* la cui espressione è modulata da *bin1*⁸¹ (figura 15). In particolare il gene *indo* sembra essere responsabile della mancata reazione del sistema immunitario nei confronti delle cellule tumorali ed, infatti, è sovraespresso in diversi tumori in accordo con la sottoespressione di *bin1*.

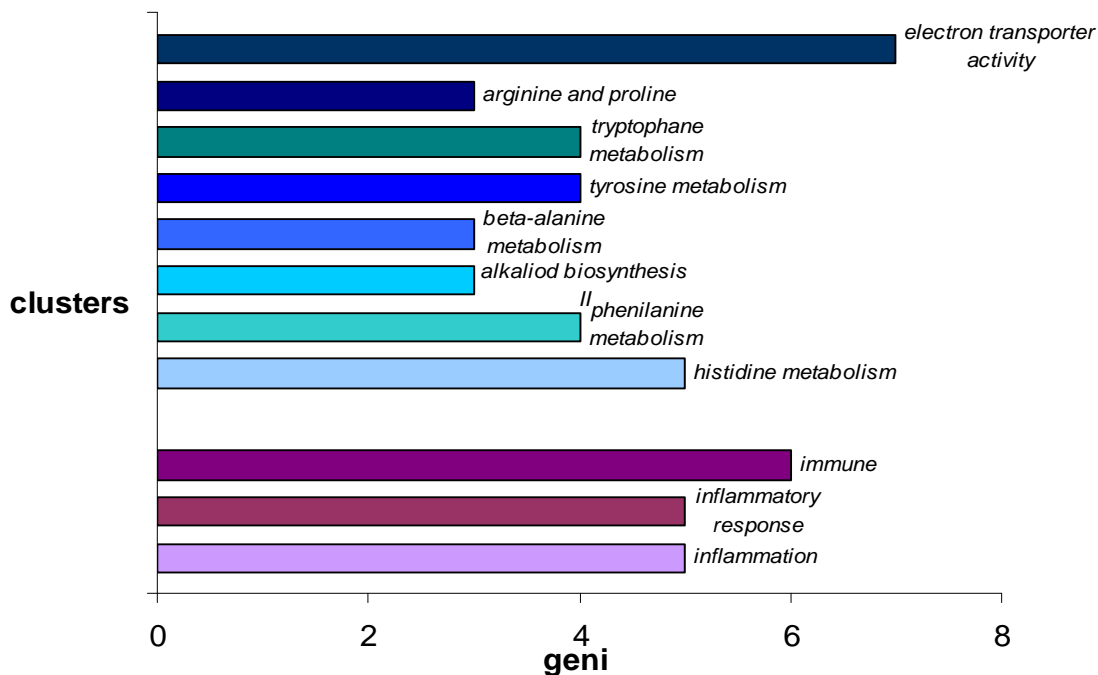


Figura 15. Clusters di geni differenzialmente espressi.

In accordo con la sottoespressione di fattori coinvolti nell'infiammazione, processo che può stimolare l'invasività tumorale, abbiamo individuato deregolazioni di altri due geni coinvolti in questo secondo processo: la sovraespressione di *spred1* e la sottoespressione di *mmp12*.

Sebbene non siano particolarmente significativi, riscontriamo deregolazioni di geni coinvolti nella classe "apoptosis" ed, in particolare, la sovraespressione di *bclaf1*, repressore trascrizionale, che interagisce con membri della famiglia BCL2 inducendo l'apoptosi e la sottoespressione di *traf5* che è un fattore importante nel mantenimento dell'attivazione di NFκB nel nucleo⁸⁸, che media la proliferazione cellulare.

In tabella 5 sono riassunti i dati dei geni la cui deregolazione sembra essere particolarmente importante per chiarire l'azione di *bin1*.

Tabella 5. Geni deregolati identificati mediante l'analisi dei profili di espressione genica

Geni deregolati	Espressione rispetto al controllo	Processo biologico di interesse
<i>ccl2</i>	Ridotta	Coinvolto in processi di infiammazione stimola l'invasività cellulare
<i>tlr3</i>	Ridotta	Promuove la proliferazione e chemioresistenza
<i>il-1 alpha</i>	Ridotta	Promuove l'angiogenesi e l'invasività
<i>mmp12</i>	Ridotta	Promuove il rimodellamento della matrice extracellulare e l'invasività
<i>traf5</i>	Ridotta	Promuove la proliferazione
<i>indo</i>	Ridotta	Promuove il mancato riconoscimento delle cellule tumorali da parte del sistema immunitario
<i>sped1</i>	Aumentata	Inibisce la proliferazione e il rimodellamento dell'actina
<i>bclaf1</i>	Aumentata	Reprime la trascrizione di fattori anti-apoptotici stimolando il processo di morte cellulare

Discussione

Il rhabdomyosarcoma (RMS) è un tumore caratterizzato da spiccata aggressività ed invasività e corrisponde al 4%-5% di tutti i casi di neoplasie maligne e al 23% dei casi di sarcoma in età pediatrica^{2, 89}. Le sedi di insorgenza sono le più varie anche se le più comuni localizzazioni sono a livello delle regioni del tronco e dell'apparato genitourinario. Il RMS è suddiviso in due principali sottotipi in accordo al diverso istotipo. Il 60% dei casi è classificato come RMS embrionale (ERMS), il 30% corrisponde a RMS alveolare (ARMS) e il restante 10% è rappresentato da sarcomi indifferenziati. La sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi è stimata complessivamente del 60-70% dei casi, ma è intorno al 30% se si considerano i casi di ARMS metastatico⁹⁰⁻⁹². Notevoli sforzi si stanno compiendo per identificare nuovi geni e/o proteine rilevanti sia per spiegare i meccanismi di carcinogenesi alla base dell'insorgenza di questo tumore, sia per individuare bersagli per nuove terapie e per una migliore stratificazione dei pazienti. Molti esperimenti in vitro, hanno dimostrato la relazione tra PAX3-FKHR e il processo di tumorigenesi negli ARMS ed, in particolare, è stato dimostrato che la *down*-regolazione della proteina chimerica riduce la motilità cellulare e il tasso di proliferazione ed induce il differenziamento in linee cellulari di ARMS⁹³⁻⁹⁵.

Linardic C. M. et al ha dimostrato come la proteina chimerica richieda, per promuovere la proliferazione tumorale, la mancanza di espressione della proteina p16^{INK4A}⁹⁶.

Importanti *targets* terapeutici sono le chinasi mTOR, MEK/ERK e il recettore chinasi MET, proteine che mediano diverse vie di segnale associate a processi di crescita e differenziazione tumorale e migrazione cellulare⁹⁷⁻¹⁰⁰.

Nell'intento di identificare comuni *pathways* regolatori che sono importanti per la patofisiologia del RMS Romualdi et al¹⁰¹ hanno condotto una meta-analisi su *datasets* derivanti da 4 studi di profili di espressione genica ottenuti con *microarray* e 2 analisi seriali dell'espressione genica (SAGE) riguardanti l'alterazione trascrizionale del RMS. Da tale analisi è stato indentificato un gruppo di geni differenzialmente espressi comune a tutti i lavori e fra essi abbiamo individuato il gene *bin1*, che, in un nostro precedente studio²⁹, era risultato differenzialmente espresso in biopsie di RMS rispetto al muscolo

scheletrico fetale. La sottoespressione di *bin1* nelle biopsie tumorali è un dato interessante in quanto è in accordo con altri lavori, che dimostrano come questo gene sia poco o per nulla espresso in altri tipi tumorali. Infatti il 50% dei tumori primari alla mammella e alla prostata e linee cellulari da essi derivanti o da melanoma presentano una bassa espressione di *bin1*¹⁰². La sua sottoespressione è stata rilevata anche in linee cellulari di neuroblastoma⁷⁷ e gli studi di Tajiri et al. sulla classificazione ed analisi della diagnosi biologica di 44 neuroblastomi hanno dimostrato come il livello di espressione di *bin1*, valutato tramite PCR quantitativa, sia correlato allo stadio di malattia e alla prognosi^{103, 104}. Inoltre la sottoespressione di *bin1* nel tumore risulta in accordo con la funzione di soppressore tumorale, che è stata assegnata ad alcune varianti di *splicing* di *bin1*.

Alla luce di questi risultati abbiamo analizzato il livello di espressione trascrizionale, tramite PCR quantitativa, in 8 biopsie di ARMS già considerate nello studio dei profili di espressione ed in linee cellulari di RMS, alveolari e embrionali. Abbiamo confermato in tutti i campioni la sottoespressione di *bin1* valutando l'amplificazione di una porzione comune ai vari trascritti che possono generarsi dallo *splicing* alternativo. Non si sono rilevate differenze significative di espressione tra la linea cellulare di ARMS RC2, e le altre linee sia alveolari che embrionali, sebbene le cellule RC2 presentino amplificazione genica di *nmyc* e l'azione anti-tumorale di *bin1* sembri dipendere anche dall'associazione fisica ai membri della famiglia *myc*⁷¹.

Per quanto riguarda il neuroblastoma, i dati di correlazione tra amplificazione di *nmyc* e riduzione dell'espressione di *bin1* sono discordanti, ma sono concordi nel dimostrare un'inibizione della crescita delle colonie secondaria all'espressione ectopica di *bin1* nella linea cellulare IMR5, caratterizzata da amplificazione di *nmyc* che invece non si verifica nelle SK-N-AS, caratterizzate da una sola copia di *nmyc*⁷⁷.

Non tutte le isoforme di *bin1* posseggono l'azione anti-tumorale. Questa funzione è stata associata alle due isoforme ubiquitarie BIN-10 e BIN-10-13 e all'isoforma BIN+10, che è altamente espressa nel muscolo, mentre è stato dimostrato che l'isoforma BIN1+12A, espressa nel tessuto tumorale e, mancante nel controllo sano, non è in grado di legare C-MYC, e non causa blocco della crescita dopo espressione ectopica nelle linee cellulari tumorali⁷⁰. Altre isoforme di BIN1 caratterizzate dagli esoni 12B-D sono invece presenti nel tessuto nervoso e sono coinvolte nei processi di endocitosi⁶⁸.

Sebbene nei campioni analizzati *bin1* sia sottoespresso rispetto il controllo sano, in RD, RH30 e RC2 abbiamo riscontrato un complesso *pattern* di espressione di trascritti che comprende isoforme derivanti dallo *splicing* alternativo degli esoni 10, 12A e 13. Wechsler-Reya et al. avevano precedentemente analizzato i trascritti di *bin1* nella linea cellulare RH30 e avevano identificato solo isoforme caratterizzate da mancanza dell'esone 10⁵¹. Probabilmente ciò può essere spiegato da una competizione tra le diverse isoforme durante il processo di amplificazione che avviene nel corso della PCR. Infatti per rilevare trascritti caratterizzati da questo esone in RH30 e RD abbiamo utilizzato un *primer* specifico in grado di legarsi alla sequenza di tale esone.

BIN1 è espresso ad alti livelli nel muscolo e diversi lavori riportano un ruolo importante nel differenziamento⁶⁰. Il livello di espressione trascrizionale di *bin1* in cellule C2C12 aumenta nel corso del differenziamento, mostrando anche un *pattern* di isoforme espresse diverso rispetto alle C2C12 in proliferazione e questo è in accordo con i livelli di espressione proteica. I nostri risultati evidenziano un'espressione proteica complessiva di BIN1 variabile nelle linee cellulari di RMS, particolarmente cospicua nelle RC2, e, in ogni caso, maggiore dell'espressione in C2C12 proliferanti, ma inferiore a quella delle C2C12 differenziate a 5 giorni. L'utilizzo degli anticorpi anti-BIN1, 2F11 e 99D, che riconoscono rispettivamente tutte le varianti di *splicing* e quelle caratterizzate dall'esone 13 non mostrano differenze nel numero di isoforme espresse indicando che, sebbene ci siano trascritti mancanti di quel particolare esone probabilmente non vengono tradotte o sono espresse a bassi livelli. Le varianti certamente espresse sono l'isoforma ubiquitaria BIN-10 e l'isoforma caratterizzata dall'esone 12A. La linea cellulare RC2 presenta anche l'espressione della proteina BIN+10, isoforma espressa prevalentemente nel muscolo, e la spiegazione può essere dovuta alle caratteristiche peculiari della linea cellulare. Infatti le RC2 sono caratterizzata da un differenziamento spontaneo tanto da dar luogo a strutture simili a miotubi multinucleati positive alla reazione con anticorpi anti-miosina^{105, 106}.

Tramite tecnica di immunofluorescenza e subfrazionamento cellulare abbiamo confermato la localizzazione delle isoforme identificate di BIN1 a livello nucleare. I dati riportati finora in letteratura si accordano con tale risultato per quanto riguarda l'isoforma BIN1-10, mentre le valutazioni della localizzazione delle isoforme contenente il dominio NTS indicano una collocazione citoplasmatica anche se mancano

dati precisi riguardo l'isoforma BIN1+12A^{71, 49}. Quindi abbiamo descritto per la prima volta la localizzazione nucleare dell'isoforma BIN1+12A ma rimane da chiarire se ciò si verifichi solo nel nostro modello tumorale.

L'identificazione di BIN1-10 a livello nucleare è un dato importante in quanto la funzione di soppressore tumorale è stata ipotizzata solo per le isoforme che si localizzano in tale regione.

Abbiamo quindi valutato variazioni del profilo di espressione genica in RH30 indotte dall'espressione ectopica dell'isoforma BIN-10 per identificare sia processi biologici legati all'espressione del trascritto, sia geni funzionali connessi con l'azione di BIN1.

Utilizzando la tecnologia Affymetrix e, nello specifico la piattaforma HG-U133 Plus 2.0, abbiamo individuato, un *set* di 581 geni differenzialmente espressi nei campioni che sovraesprimevano BIN1 rispetto ai controlli. Tra essi il 75% è costituito da geni sottoespressi; infatti *bin1* è considerato un modulatore negativo che quindi attraverso vie dirette o indirette potrebbe reprimere l'espressione di altri trascritti.

Il *software* DAVID ci ha permesso di individuare categorie particolarmente arricchite dei geni differenzialmente espressi. Seppur presenti le categorie “*apoptosis*” e “*cell growth*” non sono comparse con *score* di significatività elevati ad indicare che il processo di morte cellulare non sembra particolarmente pronunciato. Nelle categorie, sopra menzionate, abbiamo individuato la sottoespressione significativa di *traf5* e la sovraespressione significativa di *bclaf1*. I membri della famiglia TRAF sono proteine adattatrici che mediano la via di segnale di una gran quantità di recettori cellulari di membrana. Essi sono necessari per la regolazione di diversi processi fisiologici quali: apoptosi, osteoclastogenesi, infiammazione e induzione della sopravvivenza cellulare. In particolare è stato dimostrato che TRAF5 media l'attivazione di NFκB e JNK, che sono coinvolte in *pathways* anti-apoptotici^{107, 108}. In alcuni lavori è stata dimostrata l'interazione tra TRAF5 e NIK, chinasi in grado di attivare NFκB. Uno studio recente su linee cellulari di tumore al colon, ha dimostrato come l'utilizzo di composti, che bloccano la via di NFκB inibiscono la crescita cellulare del 30-50% e potenzino l'azione di inibitori della topoisomerasi I. L'inibizione della crescita tumorale è stata confermata anche *in vivo* in modelli di xenotrapianto¹⁰⁹.

BTF o BCLAF1 è un repressore trascrizionale di diversi membri della famiglia BCL2, che annovera diversi fattori anti-apoptotici. La sovraespressione di questa proteina

induce apoptosi e può essere indotta da vari composti antitumorali. In uno studio di analisi di espressione della linea cellulare K562, di leucemia mieloide cronica, a seguito di trattamento con imatinib e AMI si è osservata la sovraespressione di vari trascritti tra cui BTF¹¹⁰. BTF è, inoltre, in grado di mediare l'attivazione dell'apoptosi di TP53 in risposta a danno del DNA e quest'azione sembra dipendere dall'interazione con PKC delta, chinasi ubiquitaria¹¹¹. Possiamo ritenere che nel nostro modello sperimentale BIN1 possa agire come un co-induttore del processo di morte cellulare e che la sua sovraespressione favorisca il processo proapoptotico indotto da altri composti anti-tumorali.

Maggiore attenzione abbiamo rivolto al *cluster* che coinvolge il metabolismo degli aminoacidi ed in particolar modo, al metabolismo del triptofano. Infatti in questa categoria compare il gene *indo*, che è l'unico gene finora scoperto, la cui espressione viene modulata dal livello di BIN1⁸¹. La proteina INDO è un monomero che regola il catabolismo del triptofano, sopprimendo così l'attivazione delle cellule T. L'espressione elevata di INDO è correlata all'infiammazione, che spesso è associata allo sviluppo tumorale. Può essere espresso non solo dalle cellule tumorali stesse, ma anche dalle cellule che compongono lo stroma attorno al tumore e, grazie alla sua azione, si crea un ambiente immunosoppressivo che ne promuove la crescita^{112, 113}. INDO è regolato positivamente dall'interferone gamma e risulta sovraespresso in diversi tumori, come ad esempio il tumore colonrettale. In questo tipo di tumore l'infiltrazione linfocitaria risulta correlata strettamente alla prognosi dei pazienti¹¹⁴. Ciò sottolinea quindi che stimoli che interferiscono con la tolleranza immunitaria tumorale potrebbero essere importanti nell'eziopatogenesi del RMS e che la loro conoscenza potrebbe avere risultati dal punto di vista del trattamento o prevenzione tumorale¹¹⁵

Particolarmente importante riteniamo sia la categoria "*inflammation*" (immagine 15). Al suo interno abbiamo riscontrato la sottoespressione di fattori importanti per lo sviluppo tumorale, quali CCL2, TLR3 e IL-1 alpha.

CCL2 appartiene alla famiglia di chemochine, prodotte da cellule tumorali ed è coinvolto nella progressione del tumore. Nel tumore alla mammella la sua sottoespressione è associata ad una sopravvivenza libera da malattia più lunga e ad una diminuzione di TAM, ossia macrofagi tumore dipendenti. Nel carcinoma esofageo è stata dimostrata la correlazione positiva tra CCL2, TAM e invasività. I macrofagi

tumore associati promuovono lo sviluppo tumorale inducendo l'espressione di metalloproteinasi e VEGF, che aumentano la migrazione cellulare ¹¹⁶. L'importanza dei macrofagi tumore associati risiede inoltre nel fatto che essi producono fattori di crescita, che a loro volta stimolano la produzione di chemochine da parte delle cellule tumorali ^{116, 117}. Nel carcinoma mammario CCL2 agisce a valle di FXYD5, una glicoproteina che è upregolata e modula ATPasi Na^+/K^+ . Livelli più alti di FXYD5 sono clinicamente correlati a metastasi ed a prognosi peggiore in diversi tumori, quali: carcinoma al pancreas, colon, tiroide, lingua e gastrico. Nel carcinoma mammario è particolarmente espressa nei sottotipi negativi per i recettori degli estrogeni che risultano più aggressivi e con prognosi peggiore. L'azione di FXYD5 è mediata da NFκB e cellule di carcinoma mammario MDA-MD-231 trattate con inibitori di NFκB mostrano una riduzione nell'espressione trascrizionale di *ccl2* ¹¹⁸.

Anche la citochina IL-1 è correlata a processi infiammatori e angiogenici e di invasività ¹¹⁹, sebbene dati contrastanti siano stati pubblicati a riguardo. IL-1 alpha si localizza sia a livello di membrana plasmatica che nel citoplasma, sia, dopo secrezione, nel microambiente esterno alle cellule. Quando è legata alla membrana cellulare è prevalentemente coinvolta in processi di infiammazione, mentre nella forma che si localizza nel citosol regola processi di proliferazione. Alcuni studi riportano che IL-1 alpha, quando trasloca nel nucleo, agisce come stimolatore autocrino in diversi tipi tumorali, quali: carcinoma gastrico, linfoma della linea B e sarcoma di Kaposi. Inoltre Beasley et al, hanno dimostrato come questo fattore promuova anche la crescita di cellule della muscolatura liscia. Sebbene l'azione di IL-1 alpha sia minore rispetto a IL-1 beta, è inoltre responsabile *in vivo* dell'angiogenesi e invasività delle cellule di melanoma B16, che vengono promosse attraverso l'azione di altri geni quali metalloproteasi ¹²⁰.

Terzo gene particolarmente interessante è il recettore di membrana TLR3, la cui espressione nei tumori è correlata all'induzione della proliferazione e chemioresistenza promuovendo l'iperattivazione di NFκB attraverso la via di segnale che coinvolge TRAF e MYD88. L'azione di TLR3 sembra regolare i livelli di microRNA, una classe di piccoli RNA che regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale ed esserne, a sua volta modulata. Infatti TLR3 induce la sovraespressione di miR-155, che

è *upregolato* in diversi tipi tumorali, mentre miR-146 sembra essere un importante regolatore negativo della via di segnale dei fattori TLR ^{121, 122}.

La sottoespressione di questi geni, e quindi la possibile riduzione dell'invasività cellulare, è in accordo con la *downregolazione* di geni appartenenti alla categoria "*migration*", quali la metalloproteasi MMP12. L'espressione di questa proteina è stata studiata in feti umani dove si localizza a livello dei soli condrociti nella cartilagine delle vertebre. MMP12 non compare nel tessuto osseo adulto o negli osteosarcomi, ma viene espressa nei condrosarcomi. E' stato quindi ipotizzato che questa proteina abbia un ruolo importante nel rimodellamento dell'EMC e che sia indotta quando i condrociti vanno incontro a trasformazione maligna ¹²³

Tra i geni sovraespressi vogliamo sottolineare l'*upregolazione* del gene *spred1*, la cui funzione si accorda con il blocco o riduzione dell'invasività tumorale. SPRED1 presenta un dominio nella regione C-terminale ricco di cisteina e nella regione N-terminale un dominio EVH1, implicato nella motilità cellulare che dipende dall'actina. EVH1 è un modulo di interazione che si lega a motivi ricchi in prolina FPPPP ed è richiesto nell'assemblaggio dell'actina nei siti di rimodellamento del citoscheletro. Nell'epatocarcinoma (HCC) la sottoespressione di *spred1* è correlata ad aumentata incidenza di metastasi e l'espressione forzata in linee cellulari di HCC provoca un arresto della proliferazione in vitro e riduzione dell'espressione di MMP-2 e MMP-9. In particolare è stato dimostrato che MMP-2 presenta livelli maggiori in tumori primari di RMS rispetto al controllo sano ¹²⁴.

In cellule di osteosarcoma murino alti livelli di espressione di *spred1* riducono la proliferazione cellulare e la formazione di metastasi inibendo la via di segnale RAS-RAF-ERK ¹²⁵. Questi dati sono importanti soprattutto alla luce di un lavoro di DuHadaway et al che dimostra come l'espressione di BIN1 sia cruciale nell'induzione di apoptosi in cellule trasformate trattate con inibitori della farnesiltransferasi (FTI) che bloccano il processo necessario all'attivazione di RAS ⁷⁹.

In conclusione il nostro lavoro ha analizzato per la prima volta l'espressione, a livello trascrizionale e proteico, di BIN1 nel RMS e possibili geni a valle dell'azione di *bin1*. L'espressione ectopica di BIN1-10 influenza la regolazione di geni coinvolti in tre processi tra loro correlati: infiammazione, invasività e risposta immunitaria. In

particolare la sovraespressione di BIN1-10 sembra modulare negativamente l'infiammazione e l'invasività e positivamente la risposta immunitaria.

Tali dati rappresentano un'informazione che dovrà essere confermata ed implementata in modelli sperimentali di RMS dove si possa interferire con funzioni rilevanti per il controllo della proliferazione e crescita tumorale.

Appendice A. Geni differenzialmente espressi.

	EntrezGene	Description	Qvalue	Pvalue	1	2	3
57546_at	57546	pyruvate dehydrogenase phosphatase isoenzyme 2	4.609	0	0,202083333	0.37	0.43
29967_at	29967	low density lipoprotein-related protein 12	3.978	0	0,13125	0,134027778	0,117361111
160760_at	160760	PTC7 protein phosphatase homolog (S. cerevisiae)	3.396	0	0,103472222	0,130555556	0,124305556
134553_at	134553	chromosome 5 open reading frame 24	3.327	0	0,113194444	0,165972222	0,168055556
84074_at	84074	glutamine rich 2	-3.075	0	-0.126	-0.132	-0.123
375757_at	375757	chromosome 9 open reading frame 119	-3.021	0	-0.122	-0.126	-0.12
55186_at	55186	solute carrier family 25, member 36	3.013	0	0,101388889	0,103472222	0,134027778
5178_at	5178	paternally expressed 3	2.994	0	0.17	0.29	0,14375
9975_at	9975	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2	2.982	0	0,195833333	0,271527778	0,132638889
10927_at	10927	spindlin 1	2.969	0	0,188194444	0,336805556	0,176388889
90342_at	90342	fer-1-like 5 (C. elegans)	-2.96	0	-0.121	-0.13	-0.139
389856_at	389856	ubiquitin specific peptidase 27, X-linked	2.847	0	0,197916667	0,23125	0,109722222
9749_at	9749	phosphatase and actin regulator 2	2.825	0	0,086111111	0,080555556	0,093055556
79718_at	79718	transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1	2.807	0	0,095138889	0.15	0,081944444
6278_at	6278	S100 calcium binding protein A7	-2.754	0	-0.151	-0.196	-0.131
8029_at	8029	cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	-2.708	0	-0.13	-0.132	-0.11
26074_at	26074	chromosome 20 open reading frame 26	-2.677	0	-0.105	-0.11	-0.112

129025_at	129025	suppressor of hairy wing homolog 1 (Drosophila)	-2.665	0	-0.12	-0.107	-0.112
645226_at	645226	similar to melanoma antigen family C. 3 isoform 2	-2.66	0	-0.135	-0.154	-0.114
6347_at	6347	chemokine (C-C motif) ligand 2	-2.582	0	-0.106	-0.139	-0.13
10125_at	10125	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)	-2.563	0	-0.151	-0.112	-0.124
92196_at	92196	death associated protein-like 1	-2.559	0	-0.103	-0.122	-0.116
8360_at	8360	histone cluster 1. H4d	-2.53	0.001	-0.181	-0.148	-0.113
162963_at	162963	zinc finger protein 610	-2.48	0.001	-0.126	-0.226	-0.288
375189_at	375189	profilin family. member 4	-2.479	0.001	-0.113	-0.205	-0.169
55105_at	55105	G patch domain containing 2	-2.468	0.001	-0.133	-0.111	-0.105
4621_at	4621	myosin. heavy chain 3. skeletal muscle. embryonic	-2.439	0.001	-0.128	-0.164	-0.109
144608_at	144608	chromosome 12 open reading frame 60	-2.394	0.001	-0.172	-0.109	-0.131
79991_at	79991	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 1	-2.38	0.001	-0.095	-0.093	-0.094
124773_at	124773	chromosome 17 open reading frame 64	-2.374	0.001	-0.135	-0.271	-0.384
5558_at	5558	primase. DNA. polypeptide 2 (58kDa)	2.347	0.001	0,132638889	0,157638889	0,073611111
283104_at	283104	hypothetical protein LOC283104	-2.287	0.001	-0.116	-0.136	-0.095
388799_at	388799	chromosome 20 open reading frame 107	-2.279	0.001	-0.122	-0.12	-0.091
163081_at	163081	zinc finger protein 567	2.267	0.001	0,072222222	0,197916667	0,175
286495_at	286495	similar to Tetratricopeptide repeat protein 3 (TPR repeat protein 3) (TPR repeat protein D)	2.252	0.001	0.11	0,075694444	0,113888889

90523_at	90523	chromosome 6 open reading frame 142	-2.248	0.001	-0.121	-0.12	-0.09
80143_at	80143	suppressor of IKK epsilon	2.242	0.001	0,09375	0,111805556	0,203472222
1739_at	1739	discs. large homolog 1 (Drosophila)	2.238	0.001	0.37	0,203472222	0,077777778
203102_at	203102	ADAM metallopeptidase domain 32	-2.234	0.001	-0.088	-0.099	-0.094
26784_at	26784	small nucleolar RNA. H/ACA box 64	2.233	0.001	0.24	0,132638889	0,070138889
55281_at	55281	transmembrane protein 140	-2.214	0.001	-0.093	-0.175	-0.149
64853_at	64853	chromosome 1 open reading frame 80	2.192	0.001	0,096527778	0,071527778	0.098
8835_at	8835	suppressor of cytokine signaling 2	2.184	0.001	0.086	0.086	0.089
728450_at	728450	hypothetical protein LOC728450	-2.182	0.001	-0.087	-0.122	-0.13
51352_at	51352	Wilms tumor upstream neighbor 1	-2.181	0.001	-0.129	-0.1	-0.094
154881_at	154881	potassium channel tetramerisation domain containing 7	2.175	0.001	0,075	0,070138889	0.086
338645_at	338645	leucine zipper protein 2	2.174	0.001	0,078472222	0,081944444	0.086
2329_at	2329	flavin containing monooxygenase 4	-2.164	0.001	-0.091	-0.124	-0.154
153241_at	153241	coiled-coil domain containing 100	2.161	0.001	0,225	0,225	0.096
55840_at	55840	ELL associated factor 2	-2.161	0.001	-0.135	-0.125	-0.087
153769_at	153769	SH3 domain containing ring finger 2	-2.159	0.001	-0.118	-0.085	-0.115
7739_at	7739	zinc finger protein 185 (LIM domain)	-2.15	0.001	-0.122	-0.105	-0.087
1993_at	1993	ELAV (embryonic lethal. abnormal vision. Drosophila)-like 2 (Hu antigen B)	2.138	0.002	0,179861111	0,175	0.091
84140_at	84140	hypothetical protein FLJ13305	2.137	0.002	0.094	0,081944444	0,110416667
55279_at	55279	zinc finger protein 654	2.131	0.002	0,127083333	0,143055556	0.089
7587_at	7587	zinc finger protein 37A	2.13	0.002	0.084	0,072916667	0,073611111

286436_at	286436	H2B histone family, member M	-2.129	0.002	-0.132	-0.115	-0.086
84914_at	84914	zinc finger protein 587	2.108	0.002	0.091	0.087	0.083
58155_at	58155	polypyrimidine tract binding protein 2	2.106	0.002	0,147916667	0,150694444	0.086
3676_at	3676	integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	2.095	0.002	0.099	0,072222222	0.082
1629_at	1629	dihydroipoamide branched chain transacylase E2	2.094	0.002	0,132638889	0,136111111	0.085
5965_at	5965	RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like)	2.085	0.002	0,078472222	0.084	0.13
5781_at	5781	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 (Noonan syndrome 1)	2.078	0.002	0.21	0,176388889	0.088
11311_at	11311	vacuolar protein sorting 45 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-2.076	0.002	-0.104	-0.11	-0.081
89894_at	89894	transmembrane protein 116	-2.074	0.002	-0.13	-0.124	-0.082
1025_at	1025	cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)	2.067	0.002	0,108333333	0.19	0.086
4919_at	4919	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	-2.061	0.002	-0.093	-0.089	-0.122
57786_at	57786	RB-associated KRAB zinc finger	2.061	0.002	0,301388889	0,374305556	0.095
4154_at	4154	muscleblind-like (<i>Drosophila</i>)	2.06	0.002	0.12	0.095	0.087
7357_at	7357	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	2.052	0.002	0,092361111	0.09	0.097
165545_at	165545	DEAQ box polypeptide 1 (RNA-dependent ATPase)	-2.039	0.002	-0.087	-0.121	-0.094
3623_at	3623	inhibin, alpha	-2.034	0.002	-0.08	-0.145	-0.156
7633_at	7633	zinc finger protein 79	-2.033	0.002	-0.107	-0.085	-0.137

55041_at	55041	pleckstrin homology domain containing. family B (evectins) member 2	2.028	0.002	0,115972222	0,172222222	0.093
338657_at	338657	coiled-coil domain containing 84	-2.027	0.002	-0.123	-0.125	-0.079
905_at	905	cyclin T2	2.022	0.002	0,079861111	0.082	0,097916667
6103_at	6103	retinitis pigmentosa GTPase regulator	-2	0.002	-0.081	-0.101	-0.12
51362_at	51362	cell division cycle 40 homolog (S. cerevisiae)	1.997	0.002	0,102083333	0.079	0,11875
7746_at	7746	zinc finger protein 193	-1.992	0.002	-0.086	-0.09	-0.077
64102_at	64102	tenomodulin	-1.989	0.003	-0.118	-0.138	-0.079
260434_at	260434	PYD (pyrin domain) containing 1	-1.973	0.003	-0.08	-0.158	-0.202
9422_at	9422	zinc finger protein 264	1.967	0.003	0.01	0,088194444	0,156944444
79912_at	79912	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain 1	-1.958	0.003	-0.093	-0.124	-0.083
341_at	341	apolipoprotein C-I	-1.957	0.003	-0.082	-0.076	-0.087
161742_at	161742	\sprouty-related. EVH1 domain containing 1\	1.953	0.003	0,077083333	0.076	0,086111111
57551_at	57551	TAO kinase 1	1.948	0.003	0,093055556	0,175	0,072222222
8972_at	8972	maltase-glucoamylase (alpha-glucosidase)	-1.942	0.003	-0.092	-0.125	-0.083
8202_at	8202	nuclear receptor coactivator 3	0,106944444	0.003	0.088	0.17	0,077083333
84924_at	84924	zinc finger protein 566	1.939	0.003	0,128472222	0,245138889	0,075
124044_at	124044	spermatogenesis associated 2-like	-1.936	0.003	-0.111	-0.075	-0.103
84164_at	84164	activating signal cointegrator 1 complex subunit 2	-1.935	0.003	-0.076	-0.09	-0.101
90378_at	90378	sterile alpha motif domain containing 1	1.927	0.003	0,095138889	0.084	0.096
5563_at	5563	protein kinase. AMP-activated. alpha 2 catalytic subunit	-1.923	0.003	-0.202	-0.086	-0.131
253943_at	253943	\YTH domain family. member 3\	1.919	0.003	0,070138889	0.074	0,074305556

91749_at	91749	KIAA1919	-1.915	0.003	-0.18	-0.155	-0.073
90835_at	90835	hypothetical protein LOC90835	-1.914	0.003	-0.075	-0.086	-0.095
7019_at	7019	transcription factor A, mitochondrial	1.911	0.003	0.074	0.099	0.092
55876_at	55876	gasdermin-like	-1.905	0.003	-0.149	-0.103	-0.082
26230_at	26230	T-cell lymphoma invasion and metastasis 2	-1.903	0.003	-0.11	-0.102	-0.073
91801_at	91801	alkB, alkylation repair homolog 8 (E. coli)	1.902	0.003	0.069	0,140972222	0,146527778
8823_at	8823	fibroblast growth factor 16	-1.899	0.003	-0.104	-0.155	-0.083
342897_at	342897	similar to F-box only protein 2	-1.894	0.003	-0.111	-0.084	-0.08
78991_at	78991	prenylcysteine oxidase 1 like	-1.892	0.003	-0.089	-0.074	-0.083
57690_at	57690	trinucleotide repeat containing 6C	1.892	0.003	0.25	0,216666667	0.07
9719_at	9719	ADAMTS-like 2	-1.886	0.004	-0.082	-0.101	-0.078
1418_at	1418	crystallin, gamma A	-1.868	0.004	-0.073	-0.078	-0.085
5616_at	5616	protein kinase, Y-linked	-1.867	0.004	-0.087	-0.133	-0.085
5662_at	5662	pleckstrin and Sec7 domain containing	-1.865	0.004	-0.094	-0.072	-0.09
387923_at	387923	chromosome 13 open reading frame 21	-1.861	0.004	-0.068	-0.162	-0.175
7442_at	7442	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1	-1.86	0.004	-0.271	-0.089	-0.154
94104_at	94104	chromosome 21 open reading frame 66	1.856	0.004	0,130555556	0,125694444	0.066
8417_at	8417	syntaxin 7	1.854	0.004	0,096527778	0.07	0.17
93129_at	93129	ORAI calcium release-activated calcium modulator 3	-1.852	0.004	-0.107	-0.071	-0.095
5644_at	5644	protease, serine, 1 (trypsin 1)	-1.851	0.004	-0.071	-0.122	-0.104
257019_at	257019	FERM domain containing 3	1.847	0.004	0,090972222	0.07	0,108333333
8218_at	8218	\clathrin, heavy chain-like 1\	-1.845	0.004	-0.091	-0.07	-0.09

84676_at	84676	tripartite motif-containing 63	-1.843	0.004	-0.101	-0.111	-0.07
54544_at	54544	cysteine-rich C-terminal 1	-1.839	0.004	-0.079	-0.101	-0.152
9522_at	9522	secretory carrier membrane protein 1	1.838	0.004	0,148611111	0,279861111	0.093
1360_at	1360	carboxypeptidase B1 (tissue)	-1.838	0.004	-0.071	-0.103	-0.092
342918_at	342918	hypothetical LOC342918	-1.837	0.004	-0.191	-0.083	-0.116
51449_at	51449	prenylcysteine oxidase 1	1.836	0.004	0,114583333	0,168055556	0.074
8514_at	8514	potassium voltage-gated channel. shaker-related subfamily. beta member 2	-1.831	0.004	-0.073	-0.174	-0.127
257629_at	257629	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 4B	-1.83	0.004	-0.067	-0.138	-0.131
9736_at	9736	ubiquitin specific peptidase 34	1.829	0.004	0.43	0,249305556	0.055
201266_at	201266	solute carrier family 39 (metal ion transporter). member 11	-1.825	0.004	-0.089	-0.076	-0.122
133308_at	133308	Na ⁺ /H ⁺ exchanger domain containing 2	1.821	0.004	0,091666667	0.069	0,077083333
3017_at	3017	histone cluster 1. H2bd	-1.821	0.004	-0.084	-0.083	-0.129
56917_at	56917	Meis homeobox 3	-1.82	0.004	-0.106	-0.162	-0.078
8647_at	8647	ATP-binding cassette. sub-family B (MDR/TAP). member 11	-1.817	0.004	-0.075	-0.084	-0.11
114769_at	114769	caspase-1 dominant-negative inhibitor pseudo-ICE	-1.816	0.004	-0.182	-0.151	-0.066
339345_at	339345	nanos homolog 2 (Drosophila)	-1.809	0.005	-0.068	-0.132	-0.111
55777_at	55777	methyl-CpG binding domain protein 5	-1.809	0.005	-0.146	-0.159	-0.065
5934_at	5934	retinoblastoma-like 2 (p130)	1.801	0.005	0.086	0.092	0.069
7444_at	7444	vaccinia related kinase 2	-1.797	0.005	-0.136	-0.129	-0.065
9818_at	9818	nucleoporin like 1	1.797	0.005	0.066	0,186805556	0,280555556

2766_at	2766	guanosine monophosphate reductase	-1.795	0.005	-0.123	-0.087	-0.076
51320_at	51320	mex-3 homolog C (C. elegans)	1.793	0.005	0,079861111	0.092	0.07
486_at	486	FXFD domain containing ion transport regulator 2	-1.79	0.005	-0.109	-0.093	-0.069
79968_at	79968	WD repeat domain 76	1.786	0.005	0.085	0.069	0.078
922_at	922	CD5 molecule-like	-1.779	0.005	-0.088	-0.121	-0.073
7112_at	7112	thymopoietin	1.779	0.005	0,271527778	0.43	0.043
646548_at	646548	similar to a disintegrin and metalloprotease domain 4	-1.778	0.005	-0.137	-0.122	-0.065
9774_at	9774	BCL2-associated transcription factor 1	1.776	0.005	0,077083333	0.083	0.073
314_at	314	amine oxidase, copper containing 2 (retina-specific)	-1.774	0.005	-0.177	-0.094	-0.088
765_at	765	carbonic anhydrase VI	-1.771	0.005	-0.186	-0.062	-0.244
200159_at	200159	chromosome 1 open reading frame 100	-1.769	0.005	-0.17	-0.157	-0.061
23137_at	23137	structural maintenance of chromosomes 5	1.766	0.005	0.073	0,174305556	0,106944444
347853_at	347853	T-box 10	-1.765	0.005	-0.073	-0.074	-0.095
337876_at	337876	chondroitin synthase-2	-1.765	0.005	-0.119	-0.176	-0.071
51617_at	51617	HMP19 protein	-1.763	0.005	-0.231	-0.145	-0.072
149041_at	149041	ring finger and CCCH-type zinc finger domains 1	1.762	0.005	0,15	0.097	0.099
64240_at	64240	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5 (sterolin 1)	-1.762	0.005	-0.129	-0.127	-0.063
23098_at	23098	sterile alpha and TIR motif containing 1	-1.76	0.005	-0.07	-0.087	-0.074
25850_at	25850	zinc finger protein 345	1.757	0.005	0.065	0.098	0,074305556
29974_at	29974	apobec-1 complementation factor	-1.755	0.005	-0.072	-0.089	-0.125
727818_at	727818	similar to PRP38 pre-mRNA processing factor 38 (yeast) domain containing B	-1.753	0.005	-0.083	-0.076	-0.124

6920_at	6920	transcription elongation factor A (SII). 3	-1.751	0.005	-0.089	-0.074	-0.13
10098_at	10098	tetraspanin 5	1.749	0.005	0.079	0,113888889	0.096
2551_at	2551	\GA binding protein transcription factor. alpha subunit 60kDa\	1.747	0.005	0,098611111	0.083	0,190972222
23409_at	23409	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 4 (S. cerevisiae)	-1.746	0.006	-0.131	-0.127	-0.062
5922_at	5922	RAS p21 protein activator 2	1.744	0.006	0,176388889	0,171527778	0.051
10257_at	10257	\ATP-binding cassette. sub-family C (CFTR/MRP). member 4\	1.742	0.006	0,09375	0.083	0.079
10882_at	10882	complement component 1. q subcomponent-like 1	-1.741	0.006	-0.064	-0.105	-0.109
3442_at	3442	\interferon. alpha 5\	1.741	0.006	0,081944444	0.07	0.088
729799_at	729799	similar to SEC14-like protein 1	-1.74	0.006	-0.119	-0.251	-0.09
155400_at	155400	NOL1/NOP2/Sun domain family. member 5B	-1.74	0.006	-0.067	-0.069	-0.068
29766_at	29766	tropomodulin 3 (ubiquitous)	0,092361111	0.006	0,093055556	0,070833333	0.066
11080_at	11080	\DnaJ (Hsp40) homolog. subfamily B. member 4\	1.728	0.006	0,089583333	0,077777778	0,234722222
4302_at	4302	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog. Drosophila); translocated to. 6	-1.724	0.006	-0.066	-0.104	-0.086
23196_at	23196	family with sequence similarity 120A	1.724	0.006	0.077	0.066	0.083
27257_at	27257	LSM1 homolog. U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	-1.722	0.006	-0.064	-0.089	-0.095
1489_at	1489	cardiotrophin 1	-1.721	0.006	-0.087	-0.145	-0.077
644035_at	644035	hypothetical LOC644035	1.721	0.006	0,146527778	0,136111111	0.053

367_at	367	androgen receptor (dihydrotestosterone receptor; testicular feminization; spinal and bulbar muscular atrophy; Kennedy disease)	1.719	0.006	0.08	0,080555556	0.073
388327_at	388327	hCG1985469	1.717	0.006	0.079	0.066	0.074
55704_at	55704	coiled-coil domain containing 88A	1.717	0.006	0,077777778	0.064	0.098
89782_at	89782	leishmanolysin-like (metallopeptidase M8 family)	1.717	0.006	0.094	0,077777778	0.065
29028_at	29028	VATPase family. AAA domain containing 2\	1.714	0.006	0.085	0.072	0,0875
1366_at	1366	claudin 7	-1.713	0.006	-0.094	-0.07	-0.073
27236_at	27236	ADP-ribosylation factor interacting protein 1 (arfaptin 1)	1.707	0.006	0.079	0.067	0.071
284697_at	284697	BTB (POZ) domain containing 8	1.706	0.006	0,102083333	0.069	0.01
9855_at	9855	FERM. RhoGEF and pleckstrin domain protein 2	-1.703	0.006	-0.074	-0.092	-0.068
22836_at	22836	Rho-related BTB domain containing 3	1.702	0.006	0,082638889	0,100694444	0.061
2045_at	2045	EPH receptor A7	1.701	0.006	0,249305556	0,211111111	0.039
55785_at	55785	\FYVE. RhoGEF and PH domain containing 6\	1.07	0.006	0.099	0.079	0.067
55322_at	55322	chromosome 5 open reading frame 22	1.699	0.006	0,283333333	0.34	0.035
285989_at	285989	zinc finger protein 789	-1.699	0.006	-0.143	-0.137	-0.058
26207_at	26207	phosphatidylinositol transfer protein. cytoplasmic 1	-1.698	0.007	-0.13	-0.127	-0.059
4636_at	4636	myosin. light chain 5. regulatory	-1.698	0.007	-0.121	-0.101	-0.063
57468_at	57468	solute carrier family 12. (potassium-chloride transporter) member 5	-1.694	0.007	-0.071	-0.116	-0.08
80162_at	80162	\ATH1. acid trehalase-like 1 (yeast)\	-1.692	0.007	-0.087	-0.073	-0.067

27161_at	27161	leukaryotic translation initiation factor 2C. 2\	1.692	0.007	0,096527778	0.084	0.075
126123_at	126123	chromosome 19 open reading frame 41	-1.69	0.007	-0.116	-0.069	-0.083
6856_at	6856	synaptophysin-like 1	0,089583333	0.007	0,073611111	0.065	0,103472222
5196_at	5196	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)	0,089583333	0.007	0.062	0,109722222	0,081944444
619343_at	619343	chromosome 8 open reading frame 68	-1.688	0.007	-0.135	-0.169	-0.058
81623_at	81623	defensin. beta 126	1.685	0.007	0.066	0.077	0.07
4142_at	4142	MAS1 oncogene	-1.684	0.007	-0.058	-0.136	-0.169
203069_at	203069	R3H domain and coiled-coil containing 1	-1.677	0.007	-0.079	-0.075	-0.064
10550_at	10550	ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5	1.676	0.007	0.077	0.073	0.064
10773_at	10773	zinc finger and BTB domain containing 6	1.674	0.007	0,140972222	0,19375	0.05
654340_at	654340	RNA-binding region (RNP1. RRM) containing 3\	1.671	0.007	0.13	0,088888889	0.057
401093_at	401093	hCG1806964	-1.67	0.007	-0.08	-0.064	-0.092
151230_at	151230	kelch-like 23 (Drosophila)	0,088194444	0.007	0,072222222	0.06	0.12
126789_at	126789	pseudouridylate synthase-like 1	-1.666	0.007	-0.081	-0.07	-0.123
92106_at	92106	oxidoreductase NAD-binding domain containing 1	-1.665	0.007	-0.079	-0.063	-0.08
2769_at	2769	guanine nucleotide binding protein (G protein). alpha 15 (Gq class)	-1.663	0.007	-0.121	-0.07	-0.08
6554_at	6554	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family). member 1	-1.661	0.007	-0.056	-0.13	-0.142
6619_at	6619	small nuclear RNA activating complex. polypeptide 3. 50kDa	0,0875	0.007	0,120833333	0,141666667	0.05

84248_at	84248	forty-two-three domain containing 1	1.659	0.007	0,075	0.069	0.076
219938_at	219938	spermatogenesis associated 19	-1.657	0.007	-0.065	-0.095	-0.137
8496_at	8496	\PTPRF interacting protein. binding protein 1 (liprin beta 1)\	1.656	0.007	0.093	0.097	0,163888889
128308_at	128308	mitochondrial ribosomal protein L55	-1.656	0.008	-0.082	-0.065	-0.07
55330_at	55330	cappuccino homolog (mouse)	1.655	0.008	0.079	0.062	0.077
442233_at	442233	similar to SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin e1	-1.654	0.008	-0.11	-0.111	-0.058
220134_at	220134	chromosome 18 open reading frame 24	1.652	0.008	0,091666667	0.055	0,090972222
7441_at	7441	pre-B lymphocyte gene 1	-1.652	0.008	-0.118	-0.088	-0.064
8763_at	8763	\CD164 molecule. sialomucin\	1.651	0.008	0,08125	0.074	0.073
221035_at	221035	receptor accessory protein 3	1.651	0.008	0,133333333	0,241666667	0.062
9626_at	9626	guanylate cyclase activator 1C	-1.649	0.008	-0.127	-0.083	-0.069
81542_at	81542	thioredoxin domain containing 1	1.646	0.008	0.088	0.071	0.066
284217_at	284217	laminin. alpha 1	-1.642	0.008	-0.162	-0.138	-0.053
138199_at	138199	chromosome 9 open reading frame 41	1.642	0.008	0,374305556	0.51	0.001
8838_at	8838	WNT1 inducible signaling pathway protein 3	-1.641	0.008	-0.062	-0.124	-0.092
83889_at	83889	WD repeat domain 87	-1.641	0.008	-0.078	-0.081	-0.154
83548_at	83548	component of oligomeric golgi complex 3	1.639	0.008	0.063	0.081	0.073
3652_at	3652	intracisternal A particle-promoted polypeptide	1.639	0.008	0,075	0.057	0,088888889
378826_at	378826	chromosome 21 open reading frame 114	1.635	0.008	0.09	0.01	0.06

6419_at	6419	SET domain and mariner transposase fusion gene	-1.632	0.008	-0.104	-0.152	-0.062
151648_at	151648	shugoshin-like 1 (S. pombe)	-1.63	0.008	-0.125	-0.117	-0.055
7188_at	7188	TNF receptor-associated factor 5	-1.629	0.008	-0.11	-0.101	-0.058
154872_at	154872	hypothetical LOC154872	-1.627	0.008	-0.093	-0.177	-0.074
143379_at	143379	chromosome 10 open reading frame 82	-1.627	0.008	-0.06	-0.102	-0.142
51495_at	51495	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1	1.627	0.008	0,081944444	0.11	0.056
255631_at	255631	collagen. type XXIV. alpha 1	-1.626	0.008	-0.062	-0.088	-0.119
51093_at	51093	chromosome 1 open reading frame 66	-1.626	0.008	-0.057	-0.111	-0.105
374393_at	374393	family with sequence similarity 111. member B	1.623	0.008	0.072	0,232638889	0,110416667
340481_at	340481	\zinc finger. DHHC-type containing 21\	1.623	0.008	0,0875	0,0875	0.054
373_at	373	tripartite motif-containing 23	1.623	0.008	0,169444444	0,170833333	0.037
1259_at	1259	cyclic nucleotide gated channel alpha 1	-1.622	0.008	-0.072	-0.161	-0.088
151987_at	151987	protein phosphatase 4. regulatory subunit 2	1.621	0.008	0,203472222	0,2625	0.029
9652_at	9652	KIAA0372	1.621	0.008	0.065	0.067	0.079
728124_at	728124	hypothetical protein LOC728124	-1.62	0.008	-0.094	-0.058	-0.103
645974_at	645974	\similar to poly(A) binding protein. cytoplasmic 1\	0,084722222	0.009	0,075	0.065	0.077
130367_at	130367	sphingosine-1-phosphate phosphotase 2	-1.619	0.009	-0.165	-0.111	-0.06
1758_at	1758	dentin matrix acidic phosphoprotein	-1.616	0.009	-0.119	-0.101	-0.057
4664_at	4664	NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)	1.614	0.009	0,092361111	0.065	0.088
339524_at	339524	hypothetical protein LOC339524	-1.614	0.009	-0.083	-0.103	-0.239

10865_at	10865	AT rich interactive domain 5A (MRF1-like)	-1.614	0.009	-0.084	-0.072	-0.062
4921_at	4921	discoidin domain receptor family. member 2	1.614	0.009	0.078	0.062	0.07
222962_at	222962	solute carrier family 29 (nucleoside transporters). member 4	-1.612	0.009	-0.092	-0.073	-0.063
1798_at	1798	dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine) N-acetylglucosaminophosphotransferase 1 (GlcNAc-1-P transferase)	-1.611	0.009	-0.068	-0.074	-0.062
126731_at	126731	chromosome 1 open reading frame 96	1.609	0.009	0,107638889	0,117361111	0.048
10172_at	10172	zinc finger protein 256	-1.609	0.009	-0.196	-0.113	-0.064
1421_at	1421	crystallin. gamma D	-1.608	0.009	-0.063	-0.094	-0.074
257397_at	257397	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 3	1.607	0.009	0,182638889	0,113888889	0.053
140832_at	140832	WAP four-disulfide core domain 10A	-1.607	0.009	-0.118	-0.116	-0.054
166968_at	166968	mesoderm induction early response 1. family member 3	1.607	0.009	0.089	0.071	0,115277778
283571_at	283571	prospero homeobox 2	-1.605	0.009	-0.103	-0.058	-0.141
4130_at	4130	microtubule-associated protein 1A	-1.603	0.009	-0.085	-0.062	-0.12
9526_at	9526	mannose-P-dolichol utilization defect 1	1.603	0.009	0,170833333	0,1125	0.051
6363_at	6363	chemokine (C-C motif) ligand 19	-1.6	0.009	-0.114	-0.054	-0.129
10302_at	10302	small nuclear RNA activating complex. polypeptide 5. 19kDa	-1.6	0.009	-0.071	-0.08	-0.144
79703_at	79703	chromosome 11 open reading frame 80	-1.599	0.009	-0.106	-0.086	-0.059

1646_at	1646	aldo-keto reductase family 1. member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase. type III)	-1.597	0.009	-0.057	-0.111	-0.092
133015_at	133015	chromosome 4 open reading frame 28	1.597	0.009	0,100694444	0.059	0,179166667
91687_at	91687	centromere protein L	1.595	0.009	0,134027778	0.078	0.09
81537_at	81537	sphingosine-1-phosphate phosphatase 1	1.593	0.009	0,072916667	0.11	0,234722222
441938_at	441938	similar to Signal-regulatory protein gamma precursor (Signal-regulatory protein beta-2) (SIRP-beta-2) (SIRP-b2) (CD172g antigen)	-1.593	0.009	-0.07	-0.146	-0.082
55320_at	55320	chromosome 14 open reading frame 106	1.589	0.009	0.075	0.075	0,1
83636_at	83636	chromosome 19 open reading frame 12	1.585	0.009	0.073	0.061	0.067
143903_at	143903	layilin	-1.583	0.01	-0.085	-0.059	-0.108
1660_at	1660	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	1.581	0.01	0.31	0,189583333	0.025
116842_at	116842	liver expressed antimicrobial peptide 2	-1.577	0.01	-0.064	-0.062	-0.061
3851_at	3851	keratin 4	-1.577	0.01	-0.077	-0.129	-0.068
675_at	675	breast cancer 2. early onset	1.575	0.01	0,163888889	0,070833333	0.078
151835_at	151835	copine family member IX	-1.575	0.01	-0.081	-0.059	-0.103
54899_at	54899	PX domain containing serine/threonine kinase	1.574	0.01	0,088194444	0.085	0.061
10715_at	10715	LAG1 homolog. ceramide synthase 1	-1.572	0.01	-0.124	-0.106	-0.053
116447_at	116447	topoisomerase (DNA) I. mitochondrial	-1.571	0.01	-0.075	-0.067	-0.06
55843_at	55843	Rho GTPase activating protein 15	-1.57	0.01	-0.068	-0.152	-0.084
222171_at	222171	proline rich 15	-1.565	0.01	-0.054	-0.107	-0.101
10658_at	10658	CUG triplet repeat. RNA binding protein 1	1.565	0.01	0,155555556	0.02	0.036
4613_at	4613	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene. neuroblastoma derived (avian)	1.563	0.01	0,09375	0.077	0.068

5321_at	5321	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	1.563	0.01	0.09	0,077083333	0.056
151174_at	151174	hypothetical protein LOC151174	-1.563	0.01	-0.08	-0.078	-0.057
79078_at	79078	chromosome 1 open reading frame 50	-1.561	0.01	-0.084	-0.058	-0.075
201134_at	201134	coiled-coil domain containing 46	-1.559	0.01	-0.07	-0.068	-0.059
5366_at	5366	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	1.559	0.01	0.085	0.087	0,15625
10717_at	10717	\adaptor-related protein complex 4, beta 1 subunit\	-1.559	0.01	-0.089	-0.065	-0.064
55122_at	55122	chromosome 6 open reading frame 166	1.558	0.01	0,205555556	0,163888889	0.028
84689_at	84689	MS4A13 protein	-1.557	0.01	-0.059	-0.086	-0.122
3880_at	3880	keratin 19	-1.556	0.01	-0.135	-0.068	-0.077
11342_at	11342	ring finger protein 13	1.556	0.01	0,115277778	0,133333333	0.041
80094_at	80094	hypothetical protein FLJ14107	-1.556	0.01	-0.138	-0.12	-0.049
6123_at	6123	ribosomal protein L3-like	-1.554	0.011	-0.093	-0.149	-0.06
10633_at	10633	RAS-like, family 10, member A	-1.554	0.011	-0.072	-0.058	-0.07
283450_at	283450	chromosome 12 open reading frame 51	-1.552	0.011	-0.085	-0.063	-0.142
114770_at	114770	peptidoglycan recognition protein 2	-1.551	0.011	-0.07	-0.085	-0.06
79640_at	79640	hypothetical FLJ23584	-1.551	0.011	-0.049	-0.123	-0.153
128853_at	128853	dual specificity phosphatase 15	-1.55	0.011	-0.056	-0.101	-0.084
127933_at	127933	U2AF homology motif (UHM) kinase 1	1.55	0.011	0.089	0.087	0,165972222
677766_at	677766	small Cajal body-specific RNA 2	-1.55	0.011	-0.063	-0.109	-0.073
5005_at	5005	orosomucoid 2	-1.548	0.011	-0.114	-0.104	-0.052
873_at	873	carbonyl reductase 1	-1.547	0.011	-0.05	-0.116	-0.12
4121_at	4121	mannosidase, alpha, class 1A, member 1	1.547	0.011	0,286805556	0,301388889	-0.004

1179_at	1179	chloride channel. calcium activated. family member 1	-1.546	0.011	-0.061	-0.112	-0.077
84060_at	84060	hypothetical protein DKFZp564O0523	1.546	0.011	0,077777778	0.061	0,144444444
8754_at	8754	ADAM metallopeptidase domain 9 (meltrin gamma)	1.545	0.011	0.064	0,071527778	0,139583333
3572_at	3572	interleukin 6 signal transducer (gp130. oncostatin M receptor)	1.544	0.011	0,171527778	0.22	0.03
5929_at	5929	retinoblastoma binding protein 5	1.544	0.011	0.086	0.066	0,1125
157983_at	157983	chromosome 9 open reading frame 66	1.541	0.011	0.08	0,073611111	0.058
54361_at	54361	wingless-type MMTV integration site family. member 4	-1.539	0.011	-0.072	-0.063	-0.109
8361_at	8361	histone cluster 1. H4f	1.538	0.011	0.072	0.068	0,0875
253128_at	253128	chromosome 12 open reading frame 33	-1.536	0.011	-0.094	-0.055	-0.133
3231_at	3231	homeobox D1	-1.536	0.011	-0.06	-0.138	-0.085
51301_at	51301	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 4. core 2 (beta-1.6-N-acetylglucosaminyltransferase)	-1.534	0.011	-0.061	-0.128	-0.081
4321_at	4321	matrix metallopeptidase 12 (macrophage elastase)	-1.533	0.011	-0.108	-0.236	-0.068
8125_at	8125	\acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family. member A\	1.533	0.011	0,086111111	0.11	0.049
55786_at	55786	zinc finger protein 415	-1.532	0.011	-0.15	-0.112	-0.05
285672_at	285672	P18SRP protein	-1.531	0.011	-0.092	-0.115	-0.054
11183_at	11183	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	1.529	0.011	0,074305556	0.061	0,14375
5229_at	5229	protein geranylgeranyltransferase type I. beta subunit	1.528	0.011	0.073	0.063	0,080555556
57157_at	57157	putative homeodomain transcription factor 2	1.527	0.011	0.083	0.054	0.09
57419_at	57419	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger). member 3	-1.526	0.011	-0.087	-0.054	-0.092
5629_at	5629	prospero homeobox 1	1.524	0.012	0.068	0,197916667	0,085416667
4144_at	4144	methionine adenosyltransferase II. alpha	1.523	0.012	0,165972222	0,121527778	0.036
23251_at	23251	KIAA1024 protein	-1.522	0.012	-0.089	-0.053	-0.089

23087_at	23087	tripartite motif-containing 35	-1.521	0.012	-0.06	-0.107	-0.073
135_at	135	adenosine A2a receptor	-1.52	0.012	-0.133	-0.092	-0.055
570_at	570	bile acid Coenzyme A: amino acid N-acyltransferase (glycine N-choloyltransferase)	-1.518	0.012	-0.077	-0.066	-0.058
7755_at	7755	zinc finger protein 205	-1.516	0.012	-0.087	-0.053	-0.096
6334_at	6334	sodium channel. voltage gated. type VIII. alpha subunit	-1.516	0.012	-0.055	-0.131	-0.09
4157_at	4157	melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor)	-1.514	0.012	-0.059	-0.12	-0.078
1470_at	1470	cystatin SA	-1.51	0.012	-0.079	-0.07	-0.056
6649_at	6649	superoxide dismutase 3. extracellular	-1.509	0.012	-0.057	-0.073	-0.092
128346_at	128346	chromosome 1 open reading frame 162	-1.503	0.012	-0.078	-0.079	-0.054
221395_at	221395	G protein-coupled receptor 116	-1.502	0.012	-0.067	-0.113	-0.065
51112_at	51112	tetratricopeptide repeat domain 15	-1.502	0.012	-0.082	-0.062	-0.061
7016_at	7016	testis-specific kinase 1	-1.501	0.012	-0.059	-0.071	-0.102
51121_at	51121	ribosomal protein L26-like 1	-1.501	0.012	-0.06	-0.103	-0.069
79230_at	79230	zinc finger protein 557	-1.499	0.013	-0.052	-0.135	-0.094
54033_at	54033	RNA binding motif protein 11	-1.497	0.013	-0.078	-0.152	-0.065
2741_at	2741	glycine receptor. alpha 1 (startle disease/hyperekplexia)	-1.496	0.013	-0.046	-0.144	-0.113
3747_at	3747	\potassium voltage-gated channel. Shaw-related subfamily. member 2\	-1.496	0.013	-0.085	-0.078	-0.223
1740_at	1740	discs. large homolog 2. chapsyn-110 (Drosophila)	-1.486	0.013	-0.066	-0.062	-0.057
10397_at	10397	N-myc downstream regulated gene 1	-1.486	0.013	-0.084	-0.066	-0.058
339456_at	339456	transmembrane protein 52	-1.485	0.013	-0.058	-0.22	-0.108
84978_at	84978	FERM domain containing 5	-1.483	0.013	-0.061	-0.077	-0.059
51642_at	51642	mitochondrial ribosomal protein L48	-1.483	0.013	-0.075	-0.089	-0.054
6036_at	6036	ribonuclease. RNase A family. 2 (liver. eosinophil-derived neurotoxin)	-1.481	0.013	-0.106	-0.112	-0.047

51816_at	51816	cat eye syndrome chromosome region. candidate 1	-1.481	0.013	-0.042	-0.158	-0.124
25960_at	25960	G protein-coupled receptor 124	-1.48	0.013	-0.101	-0.095	-0.049
8736_at	8736	myomesin 1. 185kDa	-1.478	0.013	-0.068	-0.056	-0.064
121053_at	121053	chromosome 12 open reading frame 45	-1.477	0.014	-0.075	-0.055	-0.101
54514_at	54514	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4	-1.475	0.014	-0.074	-0.058	-0.113
11118_at	11118	butyrophilin. subfamily 3. member A2	-1.471	0.014	-0.137	-0.094	-0.05
120379_at	120379	PIH1 domain containing 2	-1.47	0.014	-0.078	-0.114	-0.055
84734_at	84734	chromosome 1 open reading frame 90	-1.465	0.014	-0.092	-0.077	-0.052
91156_at	91156	eEF1A2 binding protein	-1.461	0.014	-0.064	-0.09	-0.058
11148_at	11148	HERV-H LTR-associating 2	-1.46	0.014	-0.089	-0.05	-0.121
53940_at	53940	ferritin. heavy polypeptide-like 17	-1.458	0.014	-0.076	-0.052	-0.078
80131_at	80131	leucine rich repeat containing 8 family. member E	-1.456	0.014	-0.051	-0.08	-0.085
2346_at	2346	folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1	-1.456	0.014	-0.056	-0.114	-0.074
113146_at	113146	AHNAK nucleoprotein 2	-1.456	0.014	-0.085	-0.051	-0.077
6277_at	6277	S100 calcium binding protein A6	-1.455	0.014	-0.05	-0.09	-0.082
91978_at	91978	chromosome 19 open reading frame 20	-1.454	0.014	-0.116	-0.13	-0.042
2968_at	2968	general transcription factor IIH. polypeptide 4. 52kDa	-1.454	0.014	-0.073	-0.117	-0.057
283694_at	283694	olfactory receptor. family 4. subfamily N. member 4	-1.453	0.014	-0.048	-0.115	-0.091
3552_at	3552	interleukin 1. alpha	-1.453	0.014	-0.072	-0.053	-0.09
64750_at	64750	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	-1.45	0.015	-0.15	-0.103	-0.046
440200_at	440200	hypothetical LOC440200	-1.446	0.015	-0.049	-0.083	-0.093
91653_at	91653	Boc homolog (mouse)	-1.445	0.015	-0.069	-0.066	-0.054
6820_at	6820	sulfotransferase family. cytosolic. 2B. member 1	-1.445	0.015	-0.057	-0.089	-0.177
53919_at	53919	solute carrier organic anion transporter family. member 1C1	-1.443	0.015	-0.048	-0.088	-0.089
26539_at	26539	olfactory receptor. family 10. subfamily H. member 1	-1.442	0.015	-0.051	-0.075	-0.089
64518_at	64518	tektin 3	-1.441	0.015	-0.055	-0.071	-0.107
5121_at	5121	Purkinje cell protein 4	-1.44	0.015	-0.089	-0.09	-0.048

6326_at	6326	sodium channel. voltage-gated. type II. alpha subunit	-1.438	0.015	-0.058	-0.055	-0.059
162417_at	162417	N-acetylglutamate synthase	-1.436	0.015	-0.08	-0.052	-0.121
7549_at	7549	zinc finger protein 2	-1.432	0.015	-0.049	-0.087	-0.082
218_at	218	aldehyde dehydrogenase 3 family. memberA1	-1.431	0.015	-0.046	-0.105	-0.092
5394_at	5394	exosome component 10	-1.431	0.015	-0.079	-0.059	-0.157
6352_at	6352	chemokine (C-C motif) ligand 5	-1.43	0.015	-0.07	-0.052	-0.074
7571_at	7571	zinc finger protein 23 (KOX 16)	-1.429	0.015	-0.265	-0.231	-0.011
647288_at	647288	\similar to CTAGE family. member 5\	-1.428	0.016	-0.05	-0.081	-0.109
63976_at	63976	PR domain containing 16	-1.428	0.016	-0.071	-0.114	-0.056
143188_at	143188	hypothetical protein LOC143188	-1.428	0.016	-0.084	-0.049	-0.112
26103_at	26103	leucine-rich repeat. immunoglobulin-like and transmembrane domains 1	-1.428	0.016	-0.149	-0.06	-0.075
930_at	930	CD19 molecule	-1.428	0.016	-0.027	-0.178	-0.174
3034_at	3034	histidine ammonia-lyase	-1.428	0.016	-0.044	-0.1	-0.105
83473_at	83473	katanin p60 subunit A-like 2	-1.427	0.016	-0.06	-0.072	-0.055
727722_at	727722	NA	-1.425	0.016	-0.052	-0.068	-0.081
643517_at	643517	hypothetical LOC643517	-1.425	0.016	-0.115	-0.082	-0.05
10255_at	10255	HLA complex group 9	-1.425	0.016	-0.066	-0.067	-0.053
716_at	716	complement component 1. s subcomponent	-1.424	0.016	-0.085	-0.048	-0.089
91442_at	91442	chromosome 19 open reading frame 40	-1.423	0.016	-0.072	-0.057	-0.058
57514_at	57514	Cdc42 GTPase-activating protein	-1.422	0.016	-0.082	-0.052	-0.135
375704_at	375704	chromosome 9 open reading frame 165	-1.42	0.016	-0.059	-0.079	-0.164
10437_at	10437	interferon. gamma-inducible protein 30	-1.418	0.016	-0.056	-0.057	-0.067
9603_at	9603	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3	-1.416	0.016	-0.082	-0.179	-0.059
7087_at	7087	intercellular adhesion molecule 5. telencephalin	-1.411	0.017	-0.069	-0.063	-0.147
7639_at	7639	zinc finger protein 85	-1.411	0.017	-0.047	-0.089	-0.084

84654_at	84654	spermatogenic leucine zipper 1	-1.41	0.017	-0.125	-0.058	-0.068
400643_at	400643	hypothetical gene supported by AK095347	-1.409	0.017	-0.048	-0.082	-0.084
3954_at	3954	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1	-1.406	0.017	-0.078	-0.059	-0.055
1804_at	1804	dipeptidyl-peptidase 6	-1.403	0.017	-0.063	-0.052	-0.073
114907_at	114907	F-box protein 32	-1.402	0.017	-0.057	-0.084	-0.182
2588_at	2588	galactosamine (N-acetyl)-6-sulfate sulfatase (Morquio syndrome, mucopolysaccharidosis type IVA)	-1.402	0.017	-0.073	-0.082	-0.049
7098_at	7098	toll-like receptor 3	-1.4	0.017	-0.049	-0.092	-0.073
6712_at	6712	spectrin, beta, non-erythrocytic 2	-1.399	0.017	-0.059	-0.056	-0.083
404550_at	404550	chromosome 16 open reading frame 74	-1.395	0.017	-0.101	-0.069	-0.052
128821_at	128821	cystatin 9-like (mouse)	-1.393	0.018	-0.068	-0.264	-0.089
55867_at	55867	\solute carrier family 22 (organic anion/cation transporter), member 11\	-1.392	0.018	-0.092	-0.043	-0.122
6195_at	6195	\ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1\	-1.392	0.018	-0.079	-0.048	-0.074
64221_at	64221	roundabout, axon guidance receptor, homolog 3 (Drosophila)	-1.389	0.018	-0.174	-0.087	-0.052
8290_at	8290	\histone cluster 3, H3\	-1.389	0.018	-0.035	-0.148	-0.121
7169_at	7169	tropomyosin 2 (beta)	-1.387	0.018	-0.085	-0.054	-0.061
724087_at	724087	chromosome X open reading frame 31	-1.386	0.018	-0.055	-0.073	-0.142
1731_at	1731	septin 1	-1.385	0.018	-0.112	-0.079	-0.047
6571_at	6571	\solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2\	-1.385	0.018	-0.043	-0.095	-0.146
3625_at	3625	\inhibin, beta B\	-1.385	0.018	-0.089	-0.056	-0.209
152002_at	152002	chromosome 3 open reading frame 21	-1.384	0.018	-0.08	-0.068	-0.05
389124_at	389124	similar to IQ motif containing F1	-1.383	0.018	-0.053	-0.084	-0.177
729034_at	729034	similar to aminopeptidase puromycin sensitive	-1.381	0.018	-0.031	-0.131	-0.187
9215_at	9215	like-glycosyltransferase	-1.38	0.018	-0.07	-0.049	-0.079

8798_at	8798	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 4	-1.379	0.018	-0.068	-0.072	-0.049
5049_at	5049	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, beta subunit 30kDa	-1.378	0.018	-0.068	-0.154	-0.061
126295_at	126295	zinc finger protein 57	-1.378	0.018	-0.092	-0.047	-0.075
84280_at	84280	BTB (POZ) domain containing 10	-1.373	0.019	-0.086	-0.045	-0.127
84059_at	84059	G protein-coupled receptor 98	-1.372	0.019	-0.057	-0.169	-0.076
1742_at	1742	discs, large homolog 4 (Drosophila)	-1.372	0.019	-0.153	-0.071	-0.058
388567_at	388567	zinc finger protein 749	-1.37	0.019	-0.054	-0.136	-0.072
165721_at	165721	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 8	-1.367	0.019	-0.067	-0.054	-0.119
1012_at	1012	cadherin 13, H-cadherin (heart)	-1.366	0.019	-0.137	-0.131	-0.031
9547_at	9547	chemokine (C-X-C motif) ligand 14	-1.365	0.019	-0.054	-0.07	-0.129
4160_at	4160	melanocortin 4 receptor	-1.364	0.019	-0.051	-0.222	-0.095
8639_at	8639	\amine oxidase, copper containing 3 (vascular adhesion protein 1)	-1.363	0.019	-0.079	-0.064	-0.05
6314_at	6314	ataxin 7	-1.362	0.019	-0.046	-0.081	-0.126
85302_at	85302	Fas (TNFRSF6) binding factor 1	-1.361	0.019	-0.057	-0.085	-0.056
162998_at	162998	olfactory receptor, family 7, subfamily D, member 2	-1.36	0.02	-0.07	-0.09	-0.048
10073_at	10073	snurportin 1	-1.36	0.02	-0.066	-0.072	-0.049
10605_at	10605	poly(A) binding protein interacting protein 1	-1.36	0.02	-0.072	-0.049	-0.112
6331_at	6331	sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit	-1.356	0.02	-0.089	-0.125	-0.042
11262_at	11262	SP140 nuclear body protein	-1.356	0.02	-0.088	-0.172	-0.047
140680_at	140680	chromosome 20 open reading frame 96	-1.355	0.02	-0.112	-0.048	-0.072
51265_at	51265	cyclin-dependent kinase-like 3	-1.355	0.02	-0.06	-0.063	-0.138
643449_at	643449	hypothetical LOC643449	-1.352	0.02	-0.073	-0.046	-0.076
26580_at	26580	Bernardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 (seipin)	-1.352	0.02	-0.082	-0.065	-0.049
84174_at	84174	Src-like-adaptor 2	-1.352	0.02	-0.091	-0.044	-0.168
6910_at	6910	T-box 5	-1.351	0.02	-0.05	-0.061	-0.062

6489_at	6489	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminidase alpha-2.8-sialyltransferase 1	-1.349	0.02	-0.071	-0.17	-0.059
57661_at	57661	CTD-binding SR-like protein rA9	-1.347	0.02	-0.058	-0.055	-0.052
64132_at	64132	xylosyltransferase II	-1.347	0.02	-0.158	-0.157	-0.023
79783_at	79783	chromosome 7 open reading frame 10	-1.346	0.02	-0.05	-0.139	-0.075
7125_at	7125	troponin C type 2 (fast)	-1.345	0.021	-0.049	-0.071	-0.063
285668_at	285668	hypothetical protein FLJ37543	-1.342	0.021	-0.051	-0.057	-0.061
145376_at	145376	chromosome 14 open reading frame 50	-1.341	0.021	-0.028	-0.127	-0.193
7350_at	7350	uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)	-1.341	0.021	-0.047	-0.089	-0.185
4879_at	4879	natriuretic peptide precursor B	-1.341	0.021	-0.081	-0.149	-0.046
79370_at	79370	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator)	-1.34	0.021	-0.048	-0.076	-0.14
342898_at	342898	syncollin	-1.338	0.021	-0.025	-0.15	-0.146
28474_at	28474	immunoglobulin heavy variable 1-2	-1.338	0.021	-0.081	-0.057	-0.216
643072_at	643072	hypothetical LOC643072	-1.337	0.021	-0.08	-0.045	-0.073
121256_at	121256	transmembrane protein 132D	-1.336	0.021	-0.06	-0.1	-0.053
55800_at	55800	sodium channel, voltage-gated, type III, beta	-1.335	0.021	-0.05	-0.087	-0.062
28512_at	28512	NFKB inhibitor interacting Ras-like 1	-1.335	0.021	-0.08	-0.06	-0.051
54834_at	54834	ganglioside induced differentiation associated protein 2	-1.335	0.021	-0.087	-0.041	-0.115
84923_at	84923	family with sequence similarity 104, member A	-1.334	0.021	-0.053	-0.072	-0.055
51297_at	51297	palate, lung and nasal epithelium carcinoma associated	-1.334	0.021	-0.063	-0.049	-0.082
9600_at	9600	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 1	-1.332	0.021	-0.08	-0.045	-0.136
93109_at	93109	transmembrane protein 44	-1.332	0.021	-0.081	-0.076	-0.044
5671_at	5671	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 3	-1.332	0.021	-0.054	-0.081	-0.055
28646_at	28646	T cell receptor alpha variable 36/delta variable 7	-1.331	0.021	-0.201	-0.009	-0.197
28232_at	28232	solute carrier organic anion transporter family, member 3A1	-1.33	0.022	-0.139	-0.119	-0.03

7692_at	7692	zinc finger protein 133	-1.329	0.022	-0.131	-0.131	-0.029
253980_at	253980	potassium channel tetramerisation domain containing 13	-1.329	0.022	-0.087	-0.091	-0.041
9783_at	9783	regulating synaptic membrane exocytosis 3	-1.328	0.022	-0.058	-0.057	-0.05
56134_at	56134	\protocadherin alpha subfamily C. 2\	-1.326	0.022	-0.045	-0.076	-0.125
145581_at	145581	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 5	-1.325	0.022	-0.198	-0.186	-0.011
84948_at	84948	tigger transposable element derived 5	-1.324	0.022	-0.048	-0.103	-0.066
53828_at	53828	FXYD domain containing ion transport regulator 4	-1.324	0.022	-0.058	-0.247	-0.084
134359_at	134359	chromosome 5 open reading frame 37	-1.322	0.022	-0.039	-0.094	-0.168
57333_at	57333	reticulocalbin 3. EF-hand calcium binding domain	-1.321	0.022	-0.047	-0.083	-0.064
127829_at	127829	ADP-ribosylation factor-like 8A	-1.321	0.022	-0.07	-0.051	-0.056
84628_at	84628	netrin G2	-1.321	0.022	-0.05	-0.115	-0.066
51634_at	51634	RNA binding motif protein. X-linked 2	-1.319	0.022	-0.06	-0.108	-0.054
1369_at	1369	\carboxypeptidase N. polypeptide 1\	-1.319	0.022	-0.079	-0.058	-0.231
400926_at	400926	FLJ90680 protein	-1.317	0.022	-0.034	-0.102	-0.149
22990_at	22990	pecanex homolog (Drosophila)	-1.316	0.022	-0.088	-0.039	-0.11
124936_at	124936	cytochrome b5 domain containing 2	-1.313	0.023	-0.047	-0.082	-0.179
2199_at	2199	fibulin 2	-1.313	0.023	-0.048	-0.062	-0.086
4852_at	4852	neuropeptide Y	-1.312	0.023	-0.141	-0.027	-0.125
55850_at	55850	unconventional SNARE in the ER 1 homolog (S. cerevisiae)	-1.31	0.023	-0.075	-0.062	-0.047
642636_at	642636	similar to Double-strand-break repair protein rad21 homolog (Pokeweed agglutinin-binding protein 29) (PW29) (SCC1 homolog)	-1.31	0.023	-0.087	-0.041	-0.083
27175_at	27175	\tubulin. gamma 2\	-1.308	0.023	-0.049	-0.056	-0.065
79443_at	79443	FYVE and coiled-coil domain containing 1	-1.306	0.023	-0.063	-0.137	-0.054
165057_at	165057	hypothetical protein FLJ39061	-1.305	0.023	-0.128	-0.024	-0.172
200931_at	200931	organic solute transporter alpha	-1.303	0.023	-0.044	-0.091	-0.069

390502_at	390502	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin). member 2	-1.301	0.023	-0.06	-0.08	-0.265
113802_at	113802	chromosome 1 open reading frame 59	-1.299	0.023	-0.076	-0.113	-0.042
131076_at	131076	coiled-coil domain containing 58	-1.299	0.024	-0.081	-0.221	-0.052
27185_at	27185	disrupted in schizophrenia 1	-1.298	0.024	-0.06	-0.061	-0.047
55201_at	55201	microtubule-associated protein 1S	-1.297	0.024	-0.09	-0.057	-0.051
10911_at	10911	urotensin 2	-1.296	0.024	-0.068	-0.123	-0.048
474354_at	474354	leucine rich repeat containing 18	-1.294	0.024	-0.031	-0.108	-0.117
55908_at	55908	hepatocellular carcinoma-associated gene TD26	-1.289	0.024	-0.042	-0.113	-0.075
93099_at	93099	dermokine	-1.289	0.024	-0.082	-0.043	-0.171
387978_at	387978	chromosome 14 open reading frame 23	-1.288	0.024	-0.069	-0.047	-0.132
246213_at	246213	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter). member 8	-1.288	0.024	-0.05	-0.144	-0.067
10417_at	10417	spondin 2, extracellular matrix protein	-1.288	0.024	-0.037	-0.085	-0.127
51802_at	51802	amiloride-sensitive cation channel 5, intestinal	-1.287	0.024	-0.064	-0.149	-0.053
84889_at	84889	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system). member 3	-1.286	0.024	-0.094	-0.055	-0.053
4825_at	4825	NK6 homeobox 1	-1.286	0.024	-0.079	-0.04	-0.086
643549_at	643549	hypothetical protein LOC643549	-1.285	0.025	-0.031	-0.115	-0.104
474_at	474	atonal homolog 1 (Drosophila)	-1.284	0.025	-0.033	-0.102	-0.195
2691_at	2691	growth hormone releasing hormone	-1.282	0.025	-0.036	-0.101	-0.09
90768_at	90768	hypothetical protein LOC90768	-1.282	0.025	-0.039	-0.079	-0.119
729084_at	729084	hypothetical protein LOC729084	-1.28	0.025	-0.024	-0.118	-0.16
84464_at	84464	BTB (POZ) domain containing 12	-1.28	0.025	-0.079	-0.04	-0.08

80127_at	80127	chromosome 14 open reading frame 45	-1.28	0.025	-0.061	-0.093	-0.047
54923_at	54923	Lck interacting transmembrane adaptor 1	-1.28	0.025	-0.085	-0.048	-0.059
200958_at	200958	mucin 20. cell surface associated	-1.28	0.025	-0.072	-0.042	-0.075
7766_at	7766	zinc finger protein 223	-1.279	0.025	-0.089	-0.095	-0.036
55268_at	55268	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 2	-1.278	0.025	-0.051	-0.057	-0.103
56992_at	56992	kinesin family member 15	-1.278	0.025	-0.072	-0.059	-0.046
84225_at	84225	\zinc finger. MYND-type containing 15\	-1.276	0.025	-0.032	-0.095	-0.139
3090_at	3090	hypermethylated in cancer 1	-1.276	0.025	-0.177	-0.072	-0.05
5145_at	5145	\phosphodiesterase 6A. cGMP-specific. rod. alpha\	-1.275	0.025	-0.031	-0.101	-0.182
9056_at	9056	\solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter. y+ system). member 7\	-1.273	0.026	-0.049	-0.051	-0.06
27030_at	27030	mutL homolog 3 (E. coli)	-1.27	0.026	-0.049	-0.093	-0.057
10946_at	10946	splicing factor 3a. subunit 3. 60kDa	-1.269	0.026	-0.049	-0.065	-0.053
399694_at	399694	SHC (Src homology 2 domain containing) family. member 4	-1.268	0.026	-0.09	-0.07	-0.041
6442_at	6442	sarcoglycan. alpha (50kDa dystrophin-associated glycoprotein)	-1.268	0.026	-0.054	-0.105	-0.054
913_at	913	CD1e molecule	-1.266	0.026	-0.048	-0.053	-0.061
319085_at	319085	chromosome 14 open reading frame 85	-1.265	0.026	-0.045	-0.09	-0.061
3592_at	3592	interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1. cytotoxic lymphocyte maturation factor 1. p35)	-1.265	0.026	-0.135	-0.022	-0.131
139105_at	139105	chromosome X open reading frame 20	-1.264	0.026	-0.038	-0.17	-0.085
5858_at	5858	pregnancy-zone protein	-1.263	0.026	-0.04	-0.085	-0.189
79929_at	79929	MAP6 domain containing 1	-1.262	0.026	-0.042	-0.072	-0.071
147808_at	147808	zinc finger protein 784	-1.261	0.026	-0.044	-0.061	-0.081
93323_at	93323	sarcoma antigen NY-SAR-48	-1.26	0.027	-0.069	-0.109	-0.042
11213_at	11213	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	-1.259	0.027	-0.043	-0.085	-0.065

79931_at	79931	TNFAIP3 interacting protein 3	-1.258	0.027	-0.108	-0.116	-0.028
222389_at	222389	chromosome 10 open reading frame 30	-1.257	0.027	-0.029	-0.253	-0.111
2900_at	2900	\glutamate receptor. ionotropic. kainate 4\	-1.256	0.027	-0.08	-0.04	-0.16
127002_at	127002	ataxin 7-like 2	-1.255	0.027	-0.048	-0.053	-0.069
84694_at	84694	connexin 62	-1.254	0.027	-0.071	-0.041	-0.118
283129_at	283129	hypothetical protein LOC283129	-1.251	0.027	-0.088	-0.037	-0.191
84968_at	84968	paraneoplastic antigen like 6A	-1.251	0.027	-0.032	-0.142	-0.091
54660_at	54660	protocadherin beta 18 pseudogene	-1.251	0.027	-0.083	-0.041	-0.206
85569_at	85569	galanin-like peptide	-1.25	0.027	-0.028	-0.102	-0.122
2019_at	2019	engrailed homeobox 1	-1.249	0.027	-0.062	-0.131	-0.048
7582_at	7582	zinc finger protein 33B	-1.249	0.027	-0.046	-0.054	-0.063
116028_at	116028	chromosome 16 open reading frame 75	-1.248	0.027	-0.07	-0.055	-0.046
54554_at	54554	WD repeat domain 5B	-1.248	0.028	-0.032	-0.095	-0.102
677779_at	677779	chromosome 3 open reading frame 66	-1.247	0.028	-0.076	-0.162	-0.041
2634_at	2634	\guanylate binding protein 2. interferon-inducible\	-1.247	0.028	-0.083	-0.044	-0.06
53831_at	53831	G protein-coupled receptor 84	-1.247	0.028	-0.064	-0.042	-0.082
140688_at	140688	chromosome 20 open reading frame 112	-1.246	0.028	-0.079	-0.05	-0.254
8794_at	8794	tumor necrosis factor receptor superfamily. member 10c. decoy without an intracellular domain	-1.246	0.028	-0.042	-0.066	-0.069
220064_at	220064	oral cancer overexpressed 1	-1.243	0.028	-0.048	-0.056	-0.095
645090_at	645090	chromosome X open reading frame 30	-1.242	0.028	-0.033	-0.086	-0.135
50832_at	50832	taste receptor. type 2. member 4	-1.242	0.028	-0.041	-0.128	-0.071
163183_at	163183	chromosome 19 open reading frame 46	-1.241	0.028	-0.116	-0.023	-0.131
2134_at	2134	exostoses (multiple)-like 1	-1.241	0.028	-0.046	-0.053	-0.066
149620_at	149620	similar to CHIA protein	-1.241	0.028	-0.122	-0.026	-0.109
167410_at	167410	Lix1 homolog (mouse)	-1.241	0.028	-0.043	-0.066	-0.12

649446_at	649446	hypothetical protein LOC649446	-1.24	0.028	-0.089	-0.05	-0.053
253970_at	253970	hypothetical protein LOC253970	-1.239	0.028	-0.085	-0.033	-0.132
8048_at	8048	cysteine and glycine-rich protein 3 (cardiac LIM protein)	-1.237	0.029	-0.117	-0.156	-0.02
27199_at	27199	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) receptor 1	-1.236	0.029	-0.042	-0.086	-0.063
374907_at	374907	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1.3-N-acetylglucosaminyltransferase 8	-1.236	0.029	-0.104	-0.177	-0.025
10058_at	10058	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6	-1.235	0.029	-0.132	-0.089	-0.031
51702_at	51702	peptidyl arginine deiminase, type III	-1.233	0.029	-0.094	-0.107	-0.03
79169_at	79169	chromosome 1 open reading frame 35	-1.232	0.029	-0.048	-0.079	-0.052
2176_at	2176	Fanconi anemia, complementation group C	-1.231	0.029	-0.06	-0.047	-0.05
2877_at	2877	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	-1.231	0.029	-0.036	-0.087	-0.208
3620_at	3620	indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase	-1.231	0.029	-0.049	-0.052	-0.087
55437_at	55437	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 2	-1.231	0.029	-0.04	-0.067	-0.092

Bibliografia

1. Pizzo P., Poplack D. Frequency and environmental epidemiology of childhood cancer. *Principles and practice of pediatric oncology*. 1989;3-18.
2. Paolucci G., Vecchi V. Sarcomi dei tessuti molli. *Oncologia pediatrica*. 2003;317-335.
3. McDowell H.P. Update on childhood rhabdomyosarcoma. *Archives of disease in childhood*. 2003;88:354-357.
4. Mazzoleni S., Bisogno G., Garaventa A., et al. Outcome and prognostic factors after recurrence in children and adolescents with nonmetastatic rhabdomyosarcoma. *Cancer*. 2005;104:183-190.
5. Weber CO. Anatomische Untersuchung einer hypertrophischen Zunge nebst Bemerkungen über die Neubildung quergestreifter Muskelfasern. *Virchows Arch* 1854;7:115-125.
6. Tsokos M. The diagnosis and classification of childhood rhabdomyosarcoma. *Seminars in diagnostic pathology*. 1994;11:26-38.
7. Massi D., Beltramini G., Capanna R., Franchi A. Histopathological reclassification of extremity pleomorphic soft tissue sarcoma has clinical relevance. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2004;30:1131-1136.
8. Tiffin N., Williams R.D., Shipley J., Pritchard-Jones K. PAX7 expression in embryonal rhabdomyosarcoma suggests an origin in muscle satellite cells. *British journal of cancer*. 2003;89:327-332.
9. Ninfo V., Cavazzana A.O. Part 4. Tumors of muscle tissue and tumor like lesion of soft tissue. 1991:91-123.
10. Merlino G., Helman L.J. Rhabdomyosarcoma-working out the pathways. *Oncogene*. 1999;18:5340-5348.
11. Tallini G., Parham D.M., Dias P., Cordon-Cardo C., Houghton P.J., Rosai J. Myogenic regulatory protein expression in adult soft tissue sarcomas. *American journal of pathology*. 1994;144:693-701.

12. Dias P., Chen B., Dilday B., et al. Strong immunostaining for myogenin in rhabdomyosarcoma is significantly associated with tumors of the alveolar subclass. *American journal of pathology*. 2000;156:399-406.
13. Wang W., Slevin M., Kumar S., Kumar P. The cooperative transforming effects of PAX3-FKHR and IGF-II on mouse myoblasts. *International journal of oncology*. 2005;27:1087-1096.
14. Anderson J., Gordon A., Pritchard-Jones K., Shipley J. Gene, chromosomes, and rhabdomyosarcoma. *Gene, chromosomes and cancer*. 1999;26:275-285.
15. Du S., Lawrence E.J., Strzelecki D., et al. Co-expression of alternatively spliced forms of PAX3, PAX7, PAX3-FKHR and PAX7-FKHR with distinct DNA binding and transactivation properties in rhabdomyosarcoma. *International journal of cancer*. 2005;115:85-92.
16. Hollway G., Currie P. Vertebrate myotome development. *Birth defects research*. 2005;75:172-179.
17. Cossu G., Kelly R., Di Donna S., Vivarelli E., Buckingham M. Myoblast differentiation during mammalian somitogenesis is dependent upon a community effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92:2254-2258.
18. Buckingham M. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Current opinion in genetics & development*. 2006;16:525-532.
19. Sabourin L.A., Rudnicki M.A. Developmental biology: frontiers for clinical genetics. *Clinical genetics*. 2000;57:16-25.
20. Berkes C.A., Tapscott S J. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*. 2005;16:585-595.
21. Bailey P., Holowacz T., Lassar A.B. The origin of skeletal muscle stem cells in the embryo and the adult. *Current opinion in cell biology*. 2001;13:679-689.
22. Lang D., Powell S.K., Plummer R.S., Young K.P., Ruggeri B.A. PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochemical pharmacology*. 2007;73:1-14.
23. Bois P.R.J., Grosveld G.C. FKHR (FOXO1a) is required for myotube fusion of primary mouse myoblast. *The EMBO journal*. 2003;22:1147-1157.

24. Epstein J.A., Shapiro D.N., Cheng J., Lam P.Y.P., Maas R.L. PAX3 modelates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93:4213-4218.
25. Parker M.H., Seale P., Rudnicki M.A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nature reviews genetics*. 2003;4:497-507.
26. Anderson J. E. The satellite cells as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. *The journal of experimental biology*. 2006;209:2276-2292.
27. Seale P., Sabourin L.A., Girgis-Gabardo A., Mansouri A., Gruss P., Rudnicki M.A. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. 2000;102:777-786.
28. Dhawan J., Rando T.A. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends in cell biology*. 2005;15:666-673.
29. De Pittà C., Tombolan L., Albiero G., et al. Gene expression profiling identifies potential relevant genes in alveolar rhabdomyosarcoma pathogenesis and discriminates PAX3-FKHR positive and negative tumors. *International journal of cancer*. 2006;1:2772-2781.
30. Ebauer M., Wachtel M., Niggli F.K., Schäfer B.W. Comparative expression profiling identifies an in vivo target gene signature with TFAP2B as a mediator of the survival function of PAX3/FKHR. *Oncogene*. 2007 *Oncogenimics*:1-15.
31. Wachtel M., Dettling M., Koscielniak E., et al. Gene expression signatures identify rhabdomyosarcoma subtypes and detect a novel t(2;2)(q35;p23) translocation fusing PAX3 to NCOA1. *Cancer research*. 2004;64:5539-5545.
32. Graf Finckenstein F., Shahbazian V., Davicioni E., Ren Y.X., Anderson M.J. PAX-FKHR function as pangenes by simultaneously inducing and inhibiting myogenesis. *Oncogene*. 2007:1-11.
33. Ragazzini P., Gamberi G., Pazzaglia L., et al. Amplification of CDK4, MDM2, SAS and GLI genes in leiomyosarcoma, alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Histology and histopathology*. 2004;19:401-411.

34. Casola S., Pedone P.V., Cavazzana A.O., et al. Expression and parental imprinting of the H19 gene in human rhabdomyosarcoma. *Oncogene*. 1997;14:1503-1510.
35. Williamson D., Lu Y.J., Gordon T., et al. Relationship between MYCN copy number and expression in rhabdomyosarcomas and correlation with adverse prognosis in the alveolar subtype. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23:880-888.
36. Toffolatti L., Frascella E., Ninfo V., et al. MYCN expression in human rhabdomyosarcoma cell lines and tumour samples. *The Journal of pathology*. 2002;196:450-458.
37. Malkin D., Friend S.H., Li F.P., Strong L.C. Germ-line mutations of the p53 tumor-suppressor gene in children and young adults with second malignant neoplasms. *The New England journal of medicine*;. 1997;326:1350-1352.
38. Wexler L.H., Helman L.J. Pediatric softy tissue sarcomas. *CA: a cancer journal for clinicians*. 1994;44:211-247.
39. Chen Y., Takita J., Mizuguchi M., et al. Mutation and expression analyses of the MET and CDKN2A genes in rhabdomyosarcoma with emphasis on MET overexpression. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46:348-358.
40. Taulli R., Scuoppo C., Bersani F., et al. Validation of met as a therapeutic target in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer research*. 2006;66:4742-4749.
41. Scherf U., Ross D.T., Waltham M., et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nature genetics*. 2000;24:236-244.
42. Spellman P.T., Sherlock G., Zhang M.Q., et al. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Molecular biology of the cell*. 1998;9:65-73.
43. Wooster R. Cancer classification with DNA microarrays is less more? *Trends in genetics : TIG*. 2000;16:327-329.
44. De Pittà C., Tombolan L., Campo Dell'Orto M., et al. A leukemia-enriched cDNA microarray platform identifies new transcripts with relevance to the biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2005;90:890-898.

45. Armstrong S.A., Staunton J.E., Silverman L.B., et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nature genetics*. 2002;30:41-47.
46. Schaaf GJ, Ruijter JM, van Ruissen F, et al. Full transcriptome analysis of rhabdomyosarcoma, normal, and fetal skeletal muscle: statistical comparison of multiple SAGE libraries. *Faseb J*. 2005;19:404-406.
47. Sakamuro D., Elliott K.J., Wechsler-Reya R., Prendergast G.C. BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumor suppressor. *Nature genetics*. 1996;14:69-77.
48. Negorev D., Riethman H., Wechsler-Reya R., Sakamuro D., Prendergast G.C., Simon D. The Bin1 gene localizes to human chromosome 2q14 by PCR analysis of somatic cell hybrids and fluorescence in situ hybridization. *Genomics*. 1996;33:329-331.
49. Butler M.H., David C., Ochoa G.C., et al. Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *The Journal of cell biology*. 1997;137:1355-1367.
50. Wechsler-Reya R., Elliott K., Herlyn M., Prendergast G.C. The putative tumor suppressor BIN1 is a short-lived nuclear phosphoprotein, the localization of which is altered in malignant cells. *Cancer research*. 1997;57:3258-3263.
51. Wechsler-Reya R., Sakamuro D., Zhang J., DuHadaway J., Prendergast G.C. Structural analysis of the human BIN1 gene. Evidence for tissue-specific transcriptional regulation and alternate RNA splicing. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272:31453-31458.
52. Kuznetsova E.B., Kekeeva T.V., Larin S.S., et al. Methylation of the BIN1 gene promoter CpG island associated with breast and prostate cancer. *Journal of carcinogenesis*. 2007;6:1-6.
53. Mao N.C., Steingrimsson E., DuHadaway J., et al. The murine Bin1 gene functions early in myogenesis and defines a new region of synteny between mouse chromosome 18 and human chromosome 2. *Genomics*. 1999;56:51-58.
54. Habermann B. The BAR-domain family of proteins: a case of bending and binding? *EMBO reports*. 2004;5:250-255.

55. Peter B.J., Kent H.M., Mills I.G., et al. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*. 2004;303:495-459.
56. Ramjaun A.R., Philie J., de Heuvel E., McPherson P.S. The N terminus of amphiphysin II mediates dimerization and plasma membrane targeting. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274:19785-19791.
57. Lee E., Marcucci M., Daniell L., et al. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science*. 2002;297:1193-1196.
58. Kojima C., Hashimoto A., Yabuta I., et al. Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *EMBO journal*. 2004;23:4413-4422.
59. DuHadaway J.B., Lynch F.J., Brisbay S., et al. Immunohistochemical analysis of Bin1/Amphiphysin II in human tissues: diverse sites of nuclear expression and losses in prostate cancer. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;88:635-642.
60. Wechsler-Reya R.J., Elliott K.J., Prendergast G.C. A role for the putative tumor suppressor Bin1 in muscle cell differentiation. *Molecular and cellular biology*. 1998;18:566-575.
61. Razzaq A., Robinson IM., McMahon H.T., et al. Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes & development*. 2001;15:2967-2979.
62. Muller A.J., Baker J.F., DuHadaway J.B., et al. Targeted disruption of the murine Bin1/Amphiphysin II gene does not disable endocytosis but results in embryonic cardiomyopathy with aberrant myofibril formation. *Molecular and cellular biology*. 2003;23:4295-4306.
63. Nicot A.S., Toussaint A., Tosch V., et al. Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nature genetics*. 2007;39:1134-1139.
64. Pineda-Lucena A., Ho C.S., Mao D.Y., et al. A structure-based model of the c-Myc/Bin1 protein interaction shows alternative splicing of Bin1 and c-Myc phosphorylation are key binding determinants. *Journal of molecular biology*. 2005;351:182-194.
65. Ramjaun A.R., Micheva K.D., Bouchelet I., McPherson P.S. Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. *Journal of cellular biochemistry*. 1997;272:16700-16706.

66. Ramjaun A.R., McPherson P.S. Multiple amphiphysin II splice variants display differential clathrin binding: identification of two distinct clathrin-binding sites. *Journal of neurochemistry*. 1998;70:2369-2376.
67. Leprince C., Le Scolan E., Meunier B., et al. Sorting nexin 4 and amphiphysin 2, a new partnership between endocytosis and intracellular trafficking. *Journal of cell science*. 2003;116:1937-1948.
68. Wigge P., Köhler K., Vallis Y., et al. Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Molecular biology of the cell*. 1997;8:2003-2015.
69. Ghaneie A., Zemba-Palko V., Itoh H., et al. Bin1 attenuation in breast cancer is correlated to nodal metastasis and reduced survival. *Cancer biology & therapy*. 2007;6:192-194.
70. Ge K., DuHadaway J., Du W., Herlyn M., Rodeck U., Prendergast G.C. Mechanism for elimination of a tumor suppressor: aberrant splicing of a brain-specific exon causes loss of function of Bin1 in melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96:9689-9694.
71. Elliott K., Sakamuro D., Basu A., et al. Bin1 functionally interacts with Myc and inhibits cell proliferation via multiple mechanisms. *Oncogene*. 1999;18:3564-3573.
72. Ge K., Duhadaway J., Sakamuro D., Wechsler-Reya R., Reynolds C., Prendergast G.C. Losses of the tumor suppressor BIN1 in breast carcinoma are frequent and reflect deficits in programmed cell death capacity. *International journal of cancer*. 2000;85:376-383.
73. Ge K., Minhas F., Duhadaway J., et al. Loss of heterozygosity and tumor suppressor activity of Bin1 in prostate carcinoma. *International journal of cancer*. 2000;86:155-161.
74. Elliott K., Ge K., Du W., Prendergast G.C. The c-Myc-interacting adaptor protein Bin1 activates a caspase-independent cell death program. *oncogene*. 2000;19:4669-4684.
75. Hogarty M.D., Liu X., Thompson P.M., et al. BIN1 inhibits colony formation and induces apoptosis in neuroblastoma cell lines with MYCN amplification. *Medical and pediatric oncology*. 2000;35:559-562.
76. Gurusurthy S., Vasudevan K.M., Rangnekar V.M. Regulation of apoptosis in prostate cancer. *Cancer metastasis reviews*. 2001;20:225-243.

77. Tajiri T., Liu X., Thompson P.M., et al. Expression of a MYCN-interacting isoform of the tumor suppressor BIN1 is reduced in neuroblastomas with unfavorable biological features. *Clinical cancer research*. 2003;9:3345-3355.
78. DuHadaway J.B., Sakamuro D., Ewert D.L., Prendergast G.C. Bin1 mediates apoptosis by c-Myc in transformed primary cells. *Cancer research*. 2001;61:3151-3156.
79. DuHadaway J.B., Du W., Donover S., et al. Transformation-selective apoptotic program triggered by farnesyltransferase inhibitors requires Bin1. *Oncogene*. 2003;22:3578-3588.
80. Muller A.J., DuHadaway J.B., Donover P.S., Sutanto-Ward E., Prendergast G.C. Targeted deletion of the suppressor gene bin1/amphiphysin2 accentuates the neoplastic character of transformed mouse fibroblasts. *Cancer biology & therapy*. 2004;3:1236-1242.
81. Muller A.J., DuHadaway J.B., Donover P.S., Sutanto-Ward E., Prendergast G.C. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nature medicine*. 2005;11:312-319.
82. Routhier E.L., Donover P.S., Prendergast G.C. hob1+, the fission yeast homolog of Bin1, is dispensable for endocytosis or actin organization, but required for the response to starvation or genotoxic stress. *Oncogene*. 2003;22:637-648.
83. Ramalingam A., Prendergast G.C. Bin1 homolog hob1 supports a Rad6-Set1 pathway of transcriptional repression in fission yeast. *Cell Cycle*. 2007;6:1655-1662.
84. Ramalingam A., Farmer G.E., Stamato T.D., Prendergast G.C. Bin1 interacts with and restrains the DNA end-binding protein complex Ku. *Cell Cycle*. 2007;6:1914-1918.
85. Spitzner M, Ousingawat J, Scheidt K, Kunzelmann K, Schreiber R. Voltage-gated K⁺ channels support proliferation of colonic carcinoma cells. *Faseb J*. 2007;21:35-44.
86. Malo ME, Fliegel L. Physiological role and regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006;84:1081-1095.
87. Hartel M, di Mola FF, Selvaggi F, et al. Vanilloids in pancreatic cancer: potential for chemotherapy and pain management. *Gut*. 2006;55:519-528.

88. Hauer J, Puschner S, Ramakrishnan P, et al. TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:2874-2879.
89. Meyer W.H., Spunt S.L. Soft tissue sarcomas of childhood. *Cancer treatment reviews*. 2004;30:269-280.
90. Spunt S.L., Smith L.M., Ruymann F.B., et al. Cyclophosphamide dose intensification during induction therapy for intermediate-risk pediatric rhabdomyosarcoma is feasible but does not improve outcome: a report from the soft tissue sarcoma committee of the children's oncology group. *Clinical cancer research*. 2004;10:6072-6079.
91. Crist W.M., Anderson J.R., Meza J.L., et al. Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. *Journal of clinical oncology*. 2001;19:3091-3102.
92. Sorensen P.H., Lynch J.C., Qualman S.J., et al. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. *Journal of clinical oncology*. 2002;20:2672-2679.
93. Epstein JA, Lam P, Jepeal L, Maas RL, Shapiro DN. Pax3 inhibits myogenic differentiation of cultured myoblast cells. *J Biol Chem*. 1995;270:11719-11722.
94. Scheidler S, Fredericks WJ, Rauscher FJ, 3rd, Barr FG, Vogt PK. The hybrid PAX3-FKHR fusion protein of alveolar rhabdomyosarcoma transforms fibroblasts in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:9805-9809.
95. Kikuchi K, Tsuchiya K, Otabe O, et al. Effects of PAX3-FKHR on malignant phenotypes in alveolar rhabdomyosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;365:568-574.
96. Linardic CM, Naini S, Herndon JE, 2nd, Kesserwan C, Qualman SJ, Counter CM. The PAX3-FKHR fusion gene of rhabdomyosarcoma cooperates with loss of p16INK4A to promote bypass of cellular senescence. *Cancer Res*. 2007;67:6691-6699.
97. Chen Y, Takita J, Mizuguchi M, et al. Mutation and expression analyses of the MET and CDKN2A genes in rhabdomyosarcoma with emphasis on MET overexpression. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46:348-358.

98. Marampon F, Ciccarelli C, Zani BM. Down-regulation of c-Myc following MEK/ERK inhibition halts the expression of malignant phenotype in rhabdomyosarcoma and in non muscle-derived human tumors. *Mol Cancer*. 2006;5:31.
99. Frost P, Shi Y, Hoang B, Lichtenstein A. AKT activity regulates the ability of mTOR inhibitors to prevent angiogenesis and VEGF expression in multiple myeloma cells. *Oncogene*. 2007;26:2255-2262.
100. Petricoin EF, 3rd, Espina V, Araujo RP, et al. Phosphoprotein pathway mapping: Akt/mammalian target of rapamycin activation is negatively associated with childhood rhabdomyosarcoma survival. *Cancer Res*. 2007;67:3431-3440.
101. Romualdi C, De Pitta C, Tombolan L, et al. Defining the gene expression signature of rhabdomyosarcoma by meta-analysis. *BMC Genomics*. 2006;7:287.
102. Sakamuro D, Prendergast GC. New Myc-interacting proteins: a second Myc network emerges. *Oncogene*. 1999;18:2942-2954.
103. Tajiri T, Higashi M, Souzaki R, Tatsuta K, Kinoshita Y, Taguchi T. Classification of neuroblastomas based on an analysis of the expression of genes related to prognosis. *J Pediatr Surg*. 2007;42:2046-2049.
104. Tajiri T, Tanaka S, Higashi M, et al. Biological diagnosis for neuroblastoma using the combination of highly sensitive analysis of prognostic factors. *J Pediatr Surg*. 2006;41:560-566.
105. Nanni P, Schiaffino S, De Giovanni C, et al. RMZ: a new cell line from a human alveolar rhabdomyosarcoma. In vitro expression of embryonic myosin. *Br J Cancer*. 1986;54:1009-1014.
106. Lollini PL, De Giovanni C, Del Re B, et al. Myogenic differentiation of human rhabdomyosarcoma cells induced in vitro by antineoplastic drugs. *Cancer Res*. 1989;49:3631-3636.
107. Lee NK, Lee SY. Modulation of life and death by the tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *J Biochem Mol Biol*. 2002;35:61-66.
108. Bradley JR, Pober JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene*. 2001;20:6482-6491.
109. Lagadec P, Griessinger E, Nawrot MP, et al. Pharmacological targeting of NF-kappaB potentiates the effect of the topoisomerase inhibitor CPT-11 on colon cancer cells. *Br J Cancer*. 2008.

110. Bianchini M, Martinelli G, Renzulli M, Gonzalez Cid M, Larripa I. cDNA microarray study to identify expression changes relevant for apoptosis in K562 cells co-treated with amifostine and imatinib. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007;59:349-360.
111. Liu H, Lu ZG, Miki Y, Yoshida K. Protein kinase C delta induces transcription of the TP53 tumor suppressor gene by controlling death-promoting factor Btf in the apoptotic response to DNA damage. *Mol Cell Biol.* 2007;27:8480-8491.
112. Murray MF. The human indoleamine 2,3-dioxygenase gene and related human genes. *Curr Drug Metab.* 2007;8:197-200.
113. Munn DH. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:220-225.
114. Mazzolini G, Murillo O, Atorrasagasti C, et al. Immunotherapy and immunoescape in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2007;13:5822-5831.
115. Banerjee T, Duhadaway JB, Gaspari P, et al. A key in vivo antitumor mechanism of action of natural product-based brassinins is inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Oncogene.* 2007.
116. Koizumi K, Hojo S, Akashi T, Yasumoto K, Saiki I. Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. *Cancer Sci.* 2007;98:1652-1658.
117. Ben-Baruch A. The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25:357-371.
118. Nam JS, Kang MJ, Suchar AM, et al. Chemokine (C-C motif) ligand 2 mediates the prometastatic effect of dysadherin in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66:7176-7184.
119. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:2645-2650.
120. Apte RN, Dotan S, Elkabets M, et al. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25:387-408.
121. Chen R, Alvero AB, Silasi DA, Steffensen KD, Mor G. Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene.* 2008;27:225-233.

122. Fukata M, Abreu MT. Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies. *Oncogene*. 2008;27:234-243.
123. Kerkela E, Bohling T, Herva R, Uria JA, Saarialho-Kere U. Human macrophage metalloelastase (MMP-12) expression is induced in chondrocytes during fetal development and malignant transformation. *Bone*. 2001;29:487-493.
124. De Bortoli M, Castellino RC, Skapura DG, et al. Patched haploinsufficient mouse rhabdomyosarcoma overexpress secreted phosphoprotein 1 and matrix metalloproteinases. *Eur J Cancer*. 2007;43:1308-1317.
125. Miyoshi K, Wakioka T, Nishinakamura H, et al. The Sprouty-related protein, Spred, inhibits cell motility, metastasis, and Rho-mediated actin reorganization. *Oncogene*. 2004;23:5567-5576.