

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**  
**FACOLTÀ DI FARMACIA**

**Dipartimento di scienze farmacologiche, biologiche e chimiche applicate**

**Ricerca e  
caratterizzazione di  
ligandi per efrine chinasi  
coinvolte nei processi  
tumoriali.**

---

**Dottorato di ricerca in  
“farmacologia e tossicologia sperimentali”**

**Dottorando: Dott. Carmine Giorgio**

**Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa Elisabetta Barocelli**

**Tutore: Dott. Massimiliano Tognolini**

**XXIII CICLO – TRIENNIO ACCADEMICO 2007-2010**

# INDICE

<b>SOMMARIO</b> .....	<b>4</b>
<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>5</b>
<b>STRUTTURA DEI RECETTORI E DEI LIGANDI EFRINICI</b> .....	<b>5</b>
<b>SIGNALLING MEDIATO DAL SISTEMA EFRINICO</b> .....	<b>7</b>
<b>ARRESTO DEL SIGNALLING NEL SISTEMA EFRINICO</b> .....	<b>10</b>
<b>RUOLI FISIOLÓGICI DEL SISTEMA EFRINICO</b> .....	<b>12</b>
SISTEMA NERVOSO .....	12
SISTEMA IMMUNITARIO .....	13
PIASTRINE .....	14
PANCREAS .....	14
TESSUTO OSSEO .....	15
CONTROLLO DELL'ARCHITETTURA TISSUTALE E DEL POSIZIONAMENTO CELLULARE NELL'ADULTO .....	16
ANGIOGENESI .....	18
<b>CANCRO E SISTEMA EFRINICO</b> .....	<b>19</b>
ESPRESSIONE NELLE CELLULE TUMORALI .....	19
ESPRESSIONE NEL MICROAMBIENTE CIRCONDANTE IL TUMORE .....	20
SOPPRESSIONE O PROMOZIONE DEL TUMORE? .....	20
<b>SISTEMA EFRINICO COME TARGET TERAPUTICO NEI     TUMORI</b> .....	<b>26</b>
STRATEGIE DI INIBIZIONE DEL SISTEMA EFRINICO .....	26
STRATEGIE DI ATTIVAZIONE DEL SISTEMA EFRINICO .....	27
TARGETING DEL SISTEMA EFRINICO PER LA CONSEGNA DI FARMACI, TOSSINE O AGENTI D'IMMAGINE .....	27
<b>SCOPO DELLA RICERCA</b> .....	<b>29</b>
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>30</b>
<b>RISULTATI</b> .....	<b>40</b>
<b>1 STANDARDIZZAZIONE DELLA METODICA DI SCREENING</b> .....	<b>40</b>
<b>2 FASE DI SCREENING</b> .....	<b>46</b>

<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>68</b>
<b>PROSPETTIVE FUTURE.....</b>	<b>70</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>71</b>

# SOMMARIO

I recettori tirosin chinasi Eph e i loro ligandi, le efrine, giocano un ruolo importante in un ampio numero di neoplasie umane. Al fine di identificare piccole molecole in grado di interferire con il legame Eph-ephrin abbiamo messo a punto un saggio di legame di tipo ELISA.

Il successivo studio di screening è stato condotto su una “in house library” e ha portato all’identificazione dell’acido litocolico (LCA) come ligando competitivo del sistema efrinico. Come i ligandi e i recettori efrinici, che in generale sono in grado di legarsi in maniera promiscua, anche LCA non ha mostrato selettività nell’inibizione di legame quando testato verso i diversi recettori e ligandi efrinici. Acidi biliari strutturalmente correlati ad LCA invece, sono risultati essere completamente inattivi sia in studi di binding che funzionali. Al contrario LCA ha dimostrato di inibire la fosforilazione di EphA2 dopo stimolazione con ephrinA1-Fc in studi funzionali condotti sulle linee cellulari PC3 e HT29. Alle dosi impiegate il composto è risultato essere non citotossico e inattivo nei confronti di altri recettori tirosin chinasi (EGFR, VEGFR, IGFR, IRK) sia quando testato come agonista che quando impiegato come antagonista. Inoltre LCA è risultato essere inattivo quando utilizzato come inibitore del dominio chinasi di EphA2 confermando quindi di interagire con l’interfaccia Eph-ephrin. Infine LCA è stato in grado di inibire la retrazione EphA2 dipendente e ephrinA1 indotta delle cellule PC3.

Il nostro lavoro di ricerca dunque dimostra che l’interfaccia Eph-ephrin può essere modulata da piccole molecole e offre un modello sperimentale che potrebbe essere utile per lo sviluppo di composti interagenti con il sistema efrinico.

Inoltre siccome i segnali mediati dal sistema efrinico sono una componente chiave nel rinnovamento cellulare intestinale organizzato, il nostro lavoro potrebbe fornire un interessante punto di partenza per ulteriori indagini circa il ruolo di questo acido biliare secondario nell’omeostasi intestinale.

# INTRODUZIONE

I recettori tirosin chinasi Eph (erythropoietin producing hepatocellular) e i loro ligandi efrinici costituiscono un'importante sistema di comunicazione cellulare che, per il ruolo svolto in processi quali, l'adesione, la migrazione e l'invasione cellulare, nonché nella proliferazione e sopravvivenza cellulare, è determinante nel corretto sviluppo embrionale e nel mantenimento dell'omeostasi di molti organi adulti (1). Per il tipo di processi regolati non deve stupire, che molti studi abbiano correlato l'alterazione dell'espressione e delle funzioni del sistema efrinico con lo sviluppo e la progressione del cancro, individuando quindi nel legame Eph-ephrin un potenziale bersaglio di intervento nell'evoluzione di nuove strategie antitumorali.

## STRUTTURA DEI RECETTORI E DEI LIGANDI EFRINICI

I recettori Eph costituiscono la più grande famiglia di recettori tirosin chinasi ad oggi conosciuta. Il primo membro di questa famiglia, EphA1, fu clonato nel 1987 in una linea cellulare di carcinoma epatocellulare produttore eritropoietina, durante uno studio volto ad identificare geni codificanti per recettori tirosin chinasi (RTK), omologhi all'oncogene virale v-fps (2). Da allora sono stati identificati nel regno animale 16 recettori Eph, 14 dei quali codificati anche nel genoma dei mammiferi (3). In base alla loro sequenza aminoacidica e all'affinità di legame per i diversi ligandi efrinici, questi recettori vengono distinti in 2 gruppi: gli EphA, che contano 10 membri (EphA1-A10) e gli EphB, a cui appartengono 6 membri (EphB1-B6). Come tutti gli RTK, anche i recettori Eph sono proteine integrali di membrana costituiti da una regione extracellulare in grado di riconoscere il ligando, una regione transmembrana ed una citosolica in grado di trasdurre il segnale. La regione extracellulare dei recettori Eph è caratterizzata da un dominio globulare ammino-terminale in grado di legare il ligando efrinico, seguito da un dominio ricco di cisteina e da 2 sequenze di fibronectina III. A livello intracellulare invece i recettori Eph presentano un dominio juxtamembrana contenente due residui di tirosina che subiscono autofosforilazione, il dominio tirosin chinasi ed una coda carbossiterminale, caratterizzata dai domini SAM (sterile  $\alpha$  motif) e PDZ (PSD-95 post synaptic density protein, Discs large, Zona occludens tight junction protein) (figura1A).

La peculiarità del sistema efrinico risiede nei ligandi dei recettori Eph. Le efrine infatti sono anch'esse proteine di membrana, che in base al modo in cui sono ancorate al plasmalemma vengono distinte in due gruppi: le efrine di tipo A (ephrinA1-A6) sono attaccate alla membrana cellulare mediante glicofosfatidilinositolfosfato (GPI linkage), mentre le efrine di tipo B (ephrinB1-B3) sono proteine integrali di membrana caratterizzate quindi da una regione extracellulare e da una coda citosolica (figura1B).

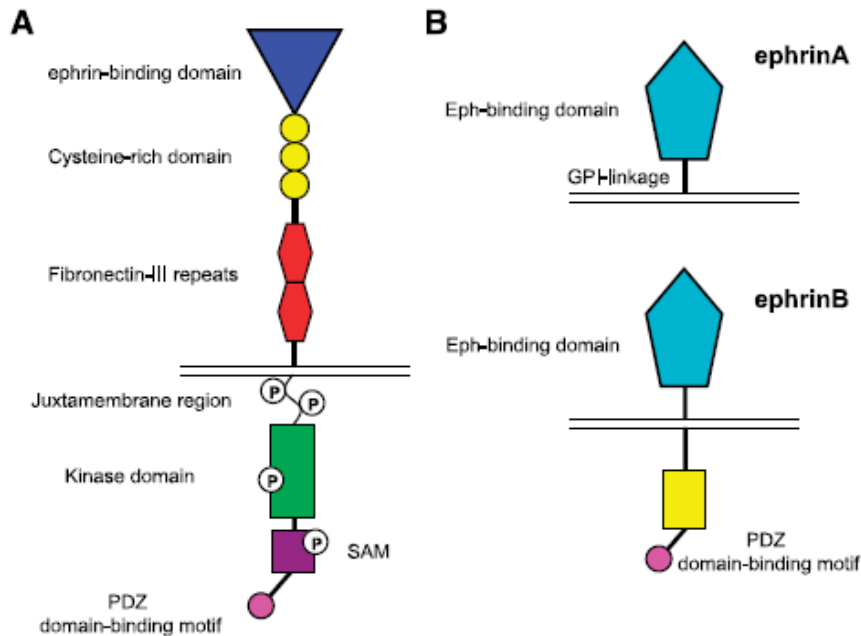


Figura 1: Struttura dei ligandi efrinici A e B e dei loro recettori (4).

Nel genoma umano sono codificati 9 recettori EphA (EphA1-A8 e EphA10), che legano in maniera promiscua 5 efrine di tipo A (ephrinA1-A5) e 5 recettori EphB (EphB1-EphB4 e EphB6), che si legano alle 3 efrine di tipo B finora identificate (5). Esistono tuttavia alcune eccezioni nell'interazione Eph-ephrin. Tra queste vi sono la capacità del recettore EphA4 di legarsi anche alle efrine di tipo B (6), l'interazione tra EphB2 ed ephrinA5 (7) e la preferenza di legame del recettore EphB4 alla sola ephrinB2.

Strutturalmente, l'iniziale riconoscimento delle efrine da parte dei recettori Eph è mediato da due tasche di legame che sono denominate rispettivamente sito di legame ad alta e bassa affinità (8). Più in particolare, una tasca recettoriale idrofobica presente nel sito di legame ad alta affinità, risulta essere determinante per l'interazione Eph-ephrin. Il ruolo fondamentale nell'interazione Eph-ephrin mediato dal sito di legame ad alta affinità è dimostrata dal fatto che peptidi che legano esclusivamente questa tasca di legame sono in grado di inibire completamente il legame Eph-ephrin (9, 10, 11).

Questa tasca riconosce e lega una regione altamente conservata delle efrine, denominata GH loop, che fa da ponte tra i filamenti  $\beta$  ( $\beta$  strand) G e H delle efrine (12). L'analisi dettagliata dei 15 residui aminoacidici costituenti il GH loop delle efrine di tipo A rispetto all'ephrine di tipo B ha spiegato perché i recettori EphA leghino preferenzialmente le efrine di tipo A, mentre i recettori EphB interagiscono preferibilmente con le efrine di tipo B (13, 14).

Nello specifico è stato osservato che in posizione 109 le efrine di tipo B hanno generalmente un residuo aminoacidico ingombrante e polare, come la glutammina o la leucina, in grado di formare un legame ad idrogeno con la treonina in posizione 38, altamente conservata nei recettori EphB. Al contrario, la posizione 109 delle efrine di tipo A è spesso occupata da una serina o da un'alanina, in grado di interagire con un residuo aminoacidico ingombrante, come la glutammina o la metionina, sito in posizione 38 nei

recettori EphA. Inoltre, la treonina in posizione 114, caratteristica delle efrine di tipo B, forma legami di Van der Waals con un residuo aminoacidico di valina sito in posizione 54 nei recettori EphB. Le efrine di tipo A invece in posizione 114 hanno un aminoacido più piccolo, mentre la posizione 54 dei recettori EphA è occupata da un aminoacido con una catena laterale idrofobica ingombrante, come l'isoleucina o la metionina.

Questi studi inoltre offrono informazioni utili a spiegare la capacità del recettore EphA4 di interagire sia con efrine di tipo A che con le efrine di tipo B. Infatti questo recettore è l'unico tra gli EphA ad avere una valina in posizione 54, esattamente come i recettori EphB.

Sempre con questi studi infine, potrebbe essere spiegata, almeno in parte, la specificità di legame del recettore EphB4 per ephrinB2 e non per gli altri ligandi efrinici di tipo B. Questo recettore infatti si differenzia da tutti gli altri recettori Eph per la presenza di un residuo aminoacidico di leucina in posizione 95, che in tutti gli altri casi è occupata da un'arginina (10).

## **SIGNALLING MEDIATO DAL SISTEMA EFRINICO**

Il fatto che le efrine siano proteine di membrana conferisce al sistema efrinico alcune peculiarità, uniche nel campo degli RTK.

In primo luogo il contatto cellula-cellula è necessario affinché l'interazione Eph-ephrin possa avvenire, anche se è stato osservato che efrine di tipo A rilasciate o tagliate dalla membrana cellulare mantengono la capacità di attivare i recettori Eph sia come monomeri che come oligomeri (15, 16, 17).

A tal riguardo basti ricordare come fu scoperta la prima efrina. Il gene codificante per ephrinA1 infatti, fu individuato nel 1990 come gene rapidamente inducibile nelle cellule HUVE (human umbilical vein endothelial) in risposta a fattori pro-infiammatori quali il TNF $\alpha$  (18). Tale gene codificava per una proteina, allora denominata B61, che veniva rilasciata nel medium cellulare (19) e in grado di attivare in questa forma solubile e monomericamente i recettori Eph (15).

Nel 2007 invece Alford e colleghi dimostrarono che la forma solubile di ephrinA5, così come ephrinA1, poteva subire oligomerizzazione per azione della transglutaminasi tissutale. La forma oligomera di queste efrine è in grado di attivare i recettori Eph e di promuovere l'invasione e la migrazione delle cellule HeLa (cellule tumorali della cervice uterina così chiamate in memoria di Henrietta Lacks, paziente da cui furono isolate la prima volta) (16).

Infine nel 2008 è stato riportato da Wykosky e colleghi, che cellule di glioblastoma (GBM) e di adenocarcinoma della mammella rilasciano, grazie all'azione di metalloproteinasi, ephrinA1 nell'ambiente extracellulare. Questa forma solubile e monomericamente di ephrinA1 mantiene una funzionalità biologica in quanto è in grado di legarsi ed attivare i recettori

Eph, causando la loro internalizzazione e down-regolazione, un marcato cambiamento nella morfologia cellulare e la soppressione della via Ras-MAPK (17).

Il segnale Eph-ephrin mediato invece dal contatto cellula-cellula è unico nel campo degli RTK. Infatti a seguito dell'interazione recettore-ligando sono 2 i segnali cellulari innescati: un segnale "in avanti" (*forward signal*) viene trasdotto nelle cellule che esprimono il recettore insieme ad un segnale "all'indietro" (*reverse signal*), che viene innescato nelle cellule esprimenti il ligando.

Per le efrine di tipo B il *reverse signal* è sostenuto dalla fosforilazione di residui tirosinici altamente conservati, siti nella coda citosolica di queste proteine. Tale fosforilazione è mediata da proteine chinasi citosoliche appartenenti alla famiglia delle chinasi Src. Tali fosforilazioni permettono successivamente l'associazione dei domini citosolici fosforilati con proteine citosoliche portanti domini SH2 (src homology 2). Altra associazione possibile è quella tra il dominio PDZ delle efrine di tipo B e proteine citosoliche contenenti domini PDZ (5, 20).

Più difficile invece pensare a come le efrine di tipo A, sprovviste di una coda citosolica, possano mediare *reverse signals*. In effetti ad oggi poco si sa al riguardo e l'ipotesi più accreditata sembra essere quella di un segnale innescato dai lipidi di membrana (*lipid raft*), su cui le efrine di tipo A sono ancorate. Nello specifico si pensa che a seguito del legame Eph-ephrin si inducano cambiamenti conformazionali nell'intorno molecolare delle efrine di tipo A che si traducono nella membrana plasmatica in un segnale che viene captato da altre proteine di membrana in grado così di trasdurre segnali all'interno delle cellule. Un esempio di questo tipo è stato riportato nei neuroni, dove le efrine di tipo A, una volta legatesi ai recettori Eph sono in grado di attivare le chinasi citosoliche FYN, appartenenti alla famiglia delle Src chinasi, attraverso il recettore di membrana per il fattore di crescita dei nervi p75 (21).

Per quanto riguarda il *forward signal* invece, quello trasdotto dai recettori Eph è del tutto simile a quello degli altri RTK. Infatti a seguito del legame Eph-ephrin si ha la dimerizzazione del recettore Eph, l'autofosforilazione in trans di specifici residui di tirosina nei domini citosolici del recettore dimerizzato e il reclutamento di proteine effettrici, dotate di domini SAM, PDZ o SH2, che trasducono a valle il segnale innescato dal ligando efrinico (figura 2). Le vie di trasduzione del segnale mediate dai recettori Eph sono numerose e dipendono dal recettore coinvolto e dal tipo di cellula in cui il recettore Eph è espresso. Tra le proteine coinvolte nella cascata del segnale mediata dall'attivazione dei recettori Eph sono state individuate: p120RasGAP (proteina attivante la famiglia delle GTPasi Ras) (23, 24), diverse proteine GEF (guanine-nucleotide Exchange factors), quali ad esempio Tiam1 (25), VAV1 e VAV2 (26, 27) ed ephexin (28, 29), FAK (focal adhesion kinase) (30, 31), proteine contenenti domini PDZ, come la proteina legante Ras AF-6 (32, 33) e infine proteine contenenti domini SH2/SH3 quali le proteine Nck (34), SLAP (35), la famiglia delle chinasi Src (36, 37) e la subunità p85 di PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) (38).

Oltre alla generazione di un segnale bidirezionale, studi recenti hanno mostrato come i componenti del sistema efrinico possano innescare segnali cellulari attraverso altre vie. In particolare è stato osservato che metalloproteasi e  $\gamma$ -secretasi, clivando in successione recettori Eph o efrine, formano frammenti peptidici, che una volta liberati nel citosol o nell'ambiente extracellulare sono in grado di generare segnali cellulari (figura 2) (39, 40, 41, 42).

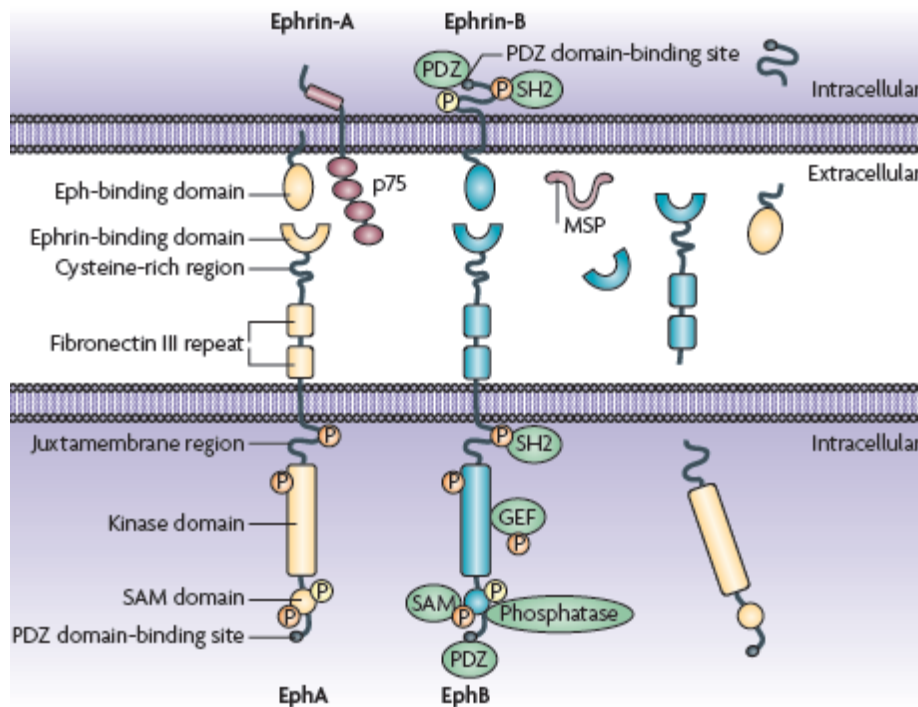


Figura 2: Struttura dei recettori e dei ligandi efrinici e siti di generazione del signalling cellulare (22).

Infine sia i recettori Eph che i ligandi efrinici possono mediare segnali cellulari indipendentemente dalla loro interazione attraverso l'interazione (cross-talks) con altri sistemi recettoriali (figura 3).

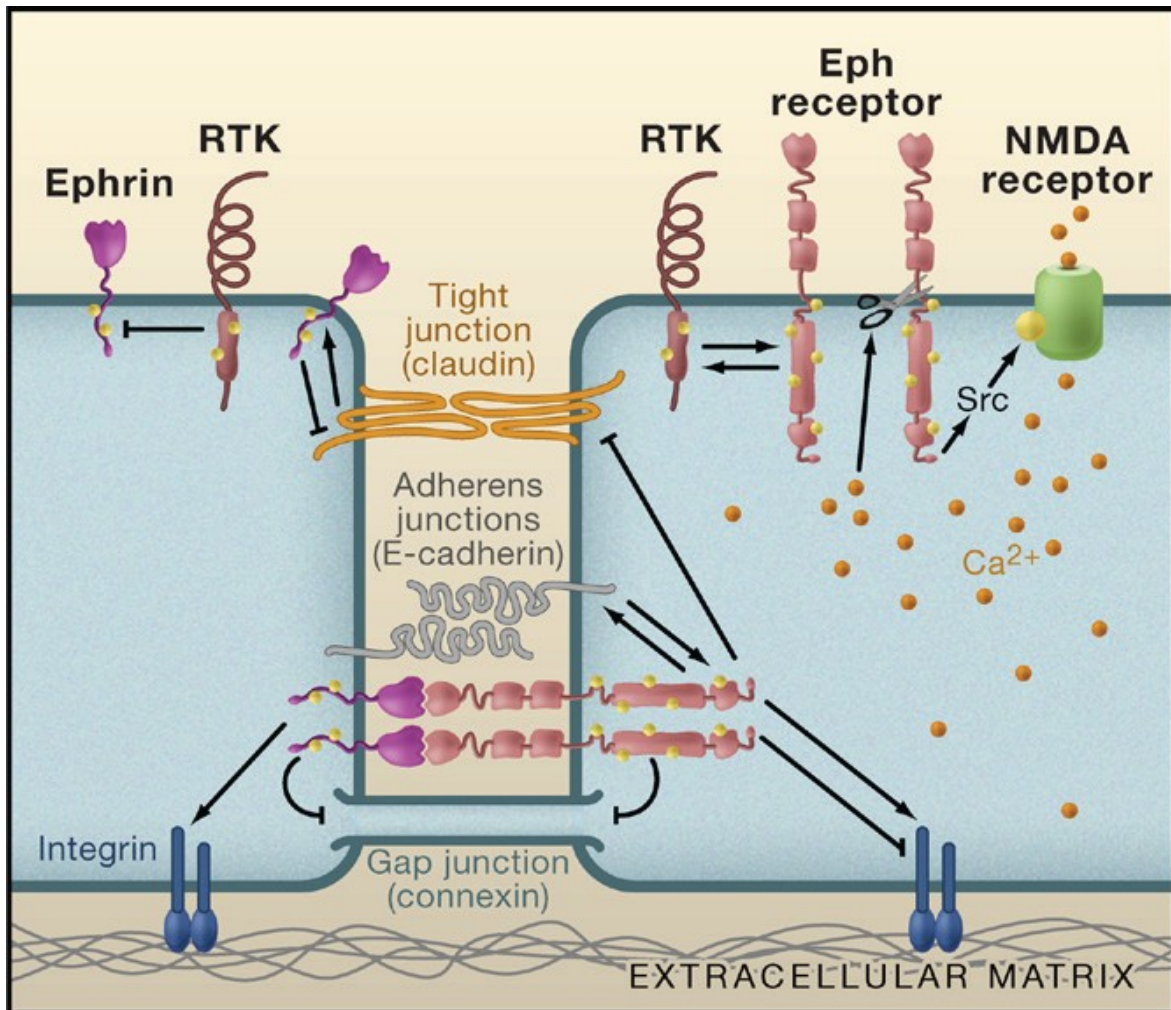


Figura 3: Cross-talk tra il sistema efrinico e altri sistemi recettoriali (1).

## ARRESTO DEL SIGNALLING NEL SISTEMA EFRINICO

Peculiari nel sistema efrinico risultano essere anche le modalità di arresto del signalling bidirezionale. In linea generale, l'interazione Eph-ephrin, conseguente ad un contatto cellulare, genera, tra le altre cose, un segnale di repulsione che spinge le cellule entrate in comunicazione ad allontanarsi le une dalle altre; così facendo si ha l'interruzione del signalling efrinico.

In altri casi invece l'interruzione del segnale bidirezionale è mediata dal taglio dei recettori Eph o dei ligandi efrinici per opera di metalloproteasi, appartenenti alla famiglia delle ADAM (A disintegrin and metalloproteinase), e di  $\gamma$ -secretasi (39, 40, 43, 44, 45, 46) (figura 4).

In particolare nello studio condotto da Hattori e colleghi (43), si è osservato come il legame tra ephrinA2 e i recettori Eph venga interrotto da una metalloproteasi, denominata

kuzbanian, che lega e taglia il ligando efrinico con il risultato di causare la rapida separazione delle cellule entrate in contatto (neuroni). Sempre nello stesso studio l'espressione nei neuroni di un mutante di ephrinA2, resistente al taglio proteasico, ritarda fortemente la separazione cellulare a dimostrazione del fatto che l'attività proteolitica di kuzbanian è determinante nell'interruzione dell'interazione Eph-ephrin. Infine si è anche osservato come la metalloproteasi tagli ephrinA2 stando in posizione *cis*, ossia sulla stessa membrana cellulare portante l'efrina.

A tal proposito invece, in uno studio condotto da Janes e colleghi è emerso come ephrinA2 venga tagliata in *trans*, essendo ADAM10 associata stabilmente al recettore EphA3 (44).

Infine un altro meccanismo utilizzato dalle cellule per interrompere il signalling bidirezionale efrinico è quello dell'endocitosi (figura 4). Durante questo processo, l'intero complesso Eph-ephrin, comprensivo dei domini citosolici dei recettori ed eventualmente dei ligandi, insieme con le membrane portanti le due proteine interagenti, è internalizzato o nella cellula portante il recettore o in quella portante il ligando (47, 48, 49, 50).

Le esatte basi meccanicistiche di questo inusuale processo, chiamato trans-endocitosi, rimangono tutt'ora da chiarire, mentre al contrario, è evidente che il risultato finale di questo meccanismo consiste nella repulsione e contrazione delle cellule in comunicazione.

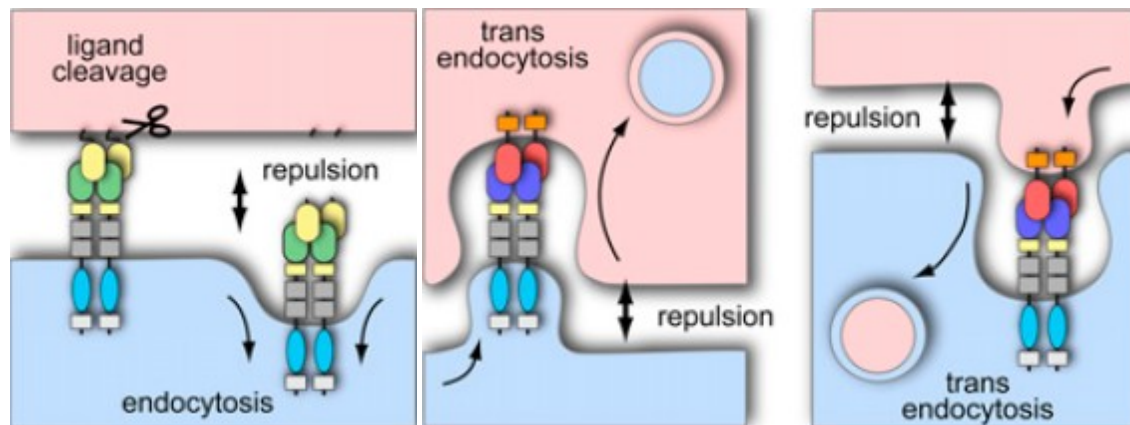


Figura 4: Arresto del signalling bidirezionale (51).

## **RUOLI FISIOLÓGICI DEL SISTEMA EFRINICO**

Come già accennato, il sistema efrinico gioca un ruolo fondamentale durante l'embriogenesi, nel corso della quale guida il corretto posizionamento e sviluppo di organi e tessuti, mentre studi recenti hanno rivelato che i componenti di questo sistema svolgono un ruolo determinante anche nel mantenimento dell'omeostasi di organi e tessuti adulti, nonché funzioni cellulari specifiche.

### **SISTEMA NERVOSO**

L'attività dei recettori Eph e dei ligandi efrinici nel sistema nervoso è stata profondamente indagata e ad oggi si sa che il segnale bidirezionale da essi generato è importante non solo nei contatti tra neuroni, ma anche nelle comunicazioni neuroni-cellule gliali (52).

I recettori Eph e le efrine hanno un ruolo fondamentale nel sistema nervoso in via di sviluppo, dove determinano la corretta formazione delle connessioni neuronali guidando gli assoni nella giusta direzione e posizionamento. Il percorso delle proiezioni di molti assoni è guidato dai recettori Eph e dalle efrine, distribuiti nel microambiente a formare gradienti di concentrazione o barriere di fermo. Un esempio che sottolinea il ruolo importante del sistema efrinico nella formazione del sistema nervoso è dato dai topi knockout per il recettore Eph4, che presentano circuiti motori corticali e spinali altamente compromessi (1).

Per quanto riguarda il sistema efrinico B studi *in vitro* e *in vivo* condotti sui neuroni della corteccia e dell'ippocampo ne hanno evidenziato l'importanza nella formazione delle sinapsi eccitatorie. In particolare è stato dimostrato come il recettore EphB2, anche quando espresso su cellule non neuronali, è in grado di promuovere la formazione delle strutture pre-sinaptiche negli assoni di neuroni esprimenti efrine di tipo B. La capacità di promuovere la specializzazione pre-sinaptica da parte di EphB2 non è stata registrata nei neuroni ippocampali suggerendo quindi una certa variabilità nei meccanismi che regolano la formazione delle sinapsi nelle diverse aree del cervello (53).

Efrine di tipo B sono state trovate anche a livello post-sinaptico e a tal riguardo è stata dimostrata la capacità di ephrinB3, espressa su cellule non neuronali, di promuovere la formazione di strutture pre-sinaptiche in neuroni posti in co-cultura, presumibilmente attraverso l'attivazione dei recettori EphB espressi dagli assoni neuronali (54).

I recettori Eph e le efrine rimangono espresse nel cervello adulto e in particolare in quelle aree dove i circuiti neuronali continuano a essere rimodellati in risposta ai cambiamenti e agli stimoli ambientali (52). Nello specifico, studi condotti su topi mutanti hanno rivelato che il sistema efrinico regola la plasticità delle connessioni neuronali in aree come l'ippocampo, dove i cambiamenti nella dimensione e nel numero delle sinapsi sono alla base dei processi di memorizzazione e apprendimento. Inoltre, sempre nel topo, infusioni ippocampali di recettori Eph o efrine, dimerizzati attraverso l'utilizzo della frazione

costante delle immunoglobuline IgG (Eph-Fc e ephrins-Fc), hanno mostrato di alterare i processi di apprendimento e memorizzazione dei roditori (52, 55).

Sebbene la localizzazione sinaptica dei recettori Eph e delle efrine non sia stata ancora pienamente caratterizzata, le indagini nel campo condotte finora lasciano pensare che l'espressione dei recettori e dei ligandi efrinici si differenzi da regione a regione del cervello e persino tra le sinapsi di uno stesso neurone (52, 55). Per esempio le efrine di tipo B sono state trovate espresse a livello pre-sinaptico nell'area CA3 dell'ippocampo di topo e a livello post-sinaptico nell'area CA1. Sempre nell'area CA1 i recettori EphB sono espressi solo a livello post-sinaptico, mentre il recettore EphA4 è espresso sia a livello pre- che post-sinaptico (56).

Il sistema efrinico infine, sembra svolgere un ruolo importante nei processi biologici che si innescano a seguito di lesioni a carico del sistema nervoso; a riprova di questo fatto numerosi recettori Eph ed efrine risultano essere overespressi nei siti delle lesioni (57). I recettori e i ligandi efrinici attraverso il segnale bidirezionale da essi generato potrebbero sia promuovere il ripristino di appropriate connessioni sinaptiche che impedire la ricrescita assonica (58). Nello specifico, in uno studio condotto nei topi è stato osservato come il recettore EphB3, overespresso nei macrofagi reclutati a seguito di lesioni generate a carico del nervo ottico, sia in grado di promuovere la crescita degli assoni danneggiati esprimenti ephrinB3 (59).

Altri studi invece stanno facendo emergere il recettore EphA4 come fattore inibente la ricrescita neuronale (57, 60). A seguito di lesioni al midollo spinale il recettore EphA4 risulta essere overespresso sia negli assoni corticospinali che negli astrociti circondanti la zona della lesione. Ora, esperimenti condotti su topi knockout per EphA4 e la somministrazione di peptidi antagonisti del recettore EphA4 in ratti che subiscono lesioni del midollo spinale suggeriscono che il *forward signal* mediato da questo recettore induca la retrazione assonale e impedisca il processo rigenerativo. L'effetto sarebbe mediato dall'interazione di questo recettore con ephrinB2 ed ephrinB3 rispettivamente espressi negli astrociti e nella mielina. L'interazione tra ephrinB2 ed EphA4 potrebbe avere anche un ruolo nella formazione delle cicatrici gliali, che costituiscono vere e proprie barriere fisiche che impediscono la rigenerazione assonica.

## **SISTEMA IMMUNITARIO**

Molti recettori Eph ed efrine sono espressi negli organi linfoidei e nei linfociti suggerendone quindi proprietà immunoregolatorie. Nello specifico, il sistema efrinico sembrerebbe svolgere un ruolo importante nello sviluppo dei timociti in cellule T mature e nella differenziazione delle cellule T attivate (61).

Infatti topi knockout per il recettore EphA4 presentano un difettoso sviluppo nella maturazione dei timociti e un ridotto numero di linfociti T periferici (62), mentre l'aggiunta di EphB2-Fc o ephrinB1-Fc a culture cellulari ottenute da timo fetale murino mostrano un ridotto numero di timociti, associato ad un aumento dell'apoptosi (55).

Ad ogni modo tra tutti i componenti del sistema efrinico il recettore EphB6 è al momento quello maggiormente studiato in questo campo (61). Saggi *in vitro* condotti su cellule T EphB6 negative, isolate dalla milza di topi knockout per questo recettore, presentano una risposta TCR (t cell receptor) mediata compromessa, una ridotta capacità proliferativa e una minore produzione di linfocine. *In vivo* invece, i topi knockout per questo recettore mostrano risposte immunitarie compromesse nonostante il numero delle cellule T non sia diverso da quello dei topi wild type (64). Queste evidenze sperimentali lasciano intuire che il recettore EphB6 funga da corecettore del TCR e in vero è già stata dimostrata la necessaria costimolazione attraverso ephrinB1 ed ephrinB2 per una piena risposta T (65, 66).

## PIASTRINE

Il signalling mediato dal sistema efrinico gioca un ruolo importante nella crescita e nella stabilità dei trombi (67). La formazione del trombo coinvolge l'attivazione e l'aggregazione piastrinica e la successiva formazione del coagulo di fibrina. EphA4, EphB1 e ephrinB1 sono espresse sulla superficie delle piastrine circolanti e il processo di aggregazione piastrinica porta i 2 recettori Eph ad interagire con ephrinB1. I segnali mediati dal sistema efrinico in questo contesto promuovono la retrazione del coagulo aumentando così la stabilità del trombo e riducendo i rischi di una prematura dissoluzione.

## PANCREAS

La comunicazione tra le cellule  $\beta$  del pancreas è indispensabile per inibire la secrezione di insulina durante i periodi di digiuno così come aumentarne il rilascio dopo l'assunzione di cibo. EphA5 ed ephrinA5 sono coespressi nelle cellule  $\beta$  e recenti studi condotti su cellule in cultura e *in vivo* su modelli murini dimostrano l'importanza del signalling efrinico nel controllo dell'omeostasi del glucosio (68).

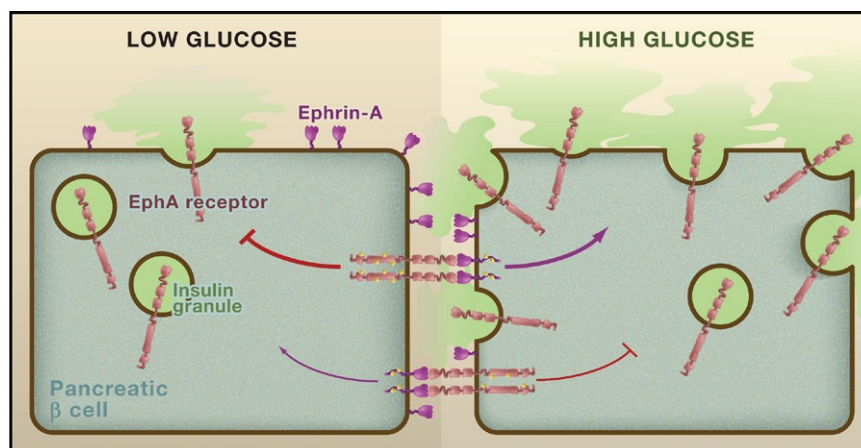


Figura 5: Eph-ephrin signalling nel rilascio del glucosio (1).

Nello specifico è stato osservato che quando i livelli di glucosio nel sangue sono bassi, il *forward signal* mediato da EphA5 predomina sul *reverse signal* mediato da ephrinA5 con il risultato di una riduzione del rilascio di insulina dai granuli secretori. Al contrario invece, livelli ematici elevati di glucosio causano la defosforilazione del recettore EphA5,

che guida una riduzione del *forward signal* senza che il *reverse signal* sia al contempo diminuito. Il risultato quindi è un predominio del *reverse signal* che risulta in un aumento del rilascio di insulina (figura 5). Interessante notare come ephrinA5 risulti essere espresso solo a livello delle membrane plasmatiche, mentre EphA5 è presente anche sulle membrane dei granuli secretori. Questo suggerisce che i livelli di EphA5 sulla membrana plasmatica e quindi i complessi EphA5-ephrinA5 aumentino a seguito del rilascio di insulina garantendo quindi un circuito a feedback che regola i livelli di *forward* e *reverse signal* in funzione dei livelli ematici di glucosio.

## TESSUTO OSSEO

Un ridotto signalling efrinico di tipo B durante lo sviluppo embrionale può provocare malformazioni scheletriche come osservato in topolini mutanti per i recettori EphB2/EphB3 o per ephrinB1 o in individui portanti mutazioni del gene codificante per ephrinB1 (5, 69).

Oltre a questo ruolo durante lo sviluppo embrionale, il signalling bidirezionale EphB-ephrinB ha una valenza di rilievo nel regolare l'omeostasi del tessuto osseo nell'adulto (70). Nello specifico citochine prodotte dagli osteoblasti (cellule specializzate nella produzione di matrice ossea) stimolano le cellule osteoprogenitrici a differenziarsi in osteoclasti (cellule specializzate nell'assorbimento della matrice ossea). Questa differenziazione è promossa dall'attivazione di 2 fattori di trascrizione: c-fos e NFATc1. Tra i geni sotto il controllo di questi 2 fattori di trascrizione vi è anche il gene che codifica per ephrinB2. EphrinB2 una volta espresso sulla membrana degli osteoclasti lega i recettori EphB siti sugli osteoblasti e il signalling bidirezionale generato da un lato arresta la differenziazione degli osteoclasti, mentre dall'altro il *forward signal* mediato dai recettori EphB4 siti sugli osteoblasti stimola la loro differenziazione e l'attività di produzione di nuova matrice ossea.

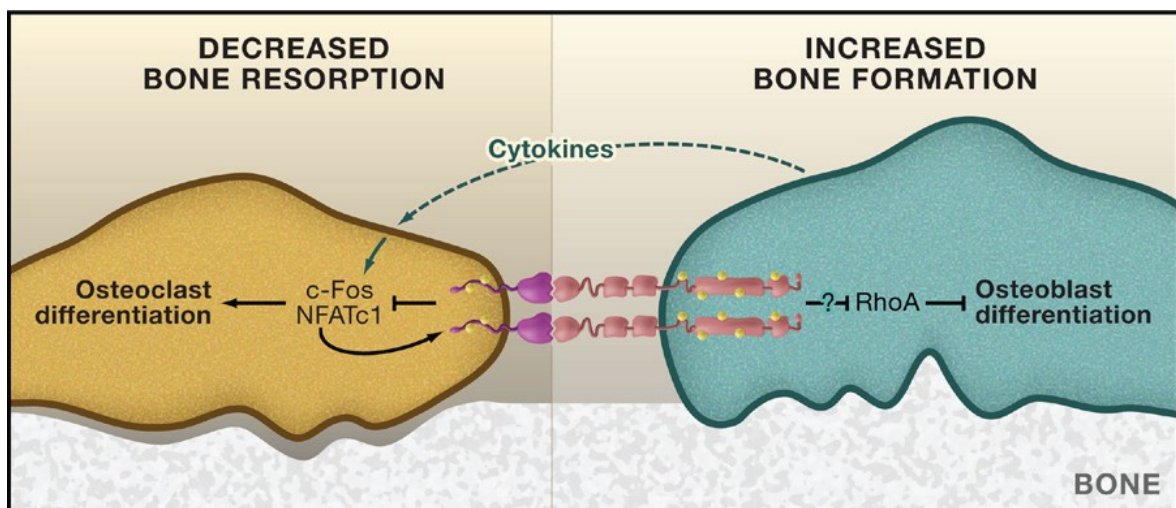


Figura 6: Ruolo nel signalling bidirezionale di tipo B nell'omeostasi del tessuto osseo (1).

Quindi le comunicazioni cellulari contatto dipendente tra osteoclasti e osteoblasti mediate dal signalling bidirezionale del sistema efrinico B limita la differenziazione osteoclastica a favore di quella osteoblastica, promuovendo dunque la formazione di nuova matrice ossea.

## CONTROLLO DELL'ARCHITETTURA TISSUTALE E DEL POSIZIONAMENTO CELLULARE NELL'ADULTO

L'epitelio intestinale rappresenta forse l'esempio meglio conosciuto di architettura tissutale governata dal signalling bidirezionale efrinico.

L'intestino è caratterizzato da un epitelio mono-stratificato, ripiegato a formare milioni di invaginazioni chiamate cripte, che è soggetto ad un rinnovamento cellulare continuo, la cui omeostasi è mantenuta da un corretto bilanciamento tra i processi di proliferazione, differenziazione ed apoptosi. Alla base di ciascuna cripta risiede un piccolo numero di cellule staminali che danno luogo a 3 linee cellulari (le cellule mucosecerneti, le cellule di assorbimento e le cellule enteroendocrine), che si differenziano migrando verso il lume intestinale; un quarto tipo cellulare, le cellule di Paneth (PC), riescono a sfuggire a questo flusso migratorio, rimanendo confinate alla base delle cripte come cellule mature (figura 7).

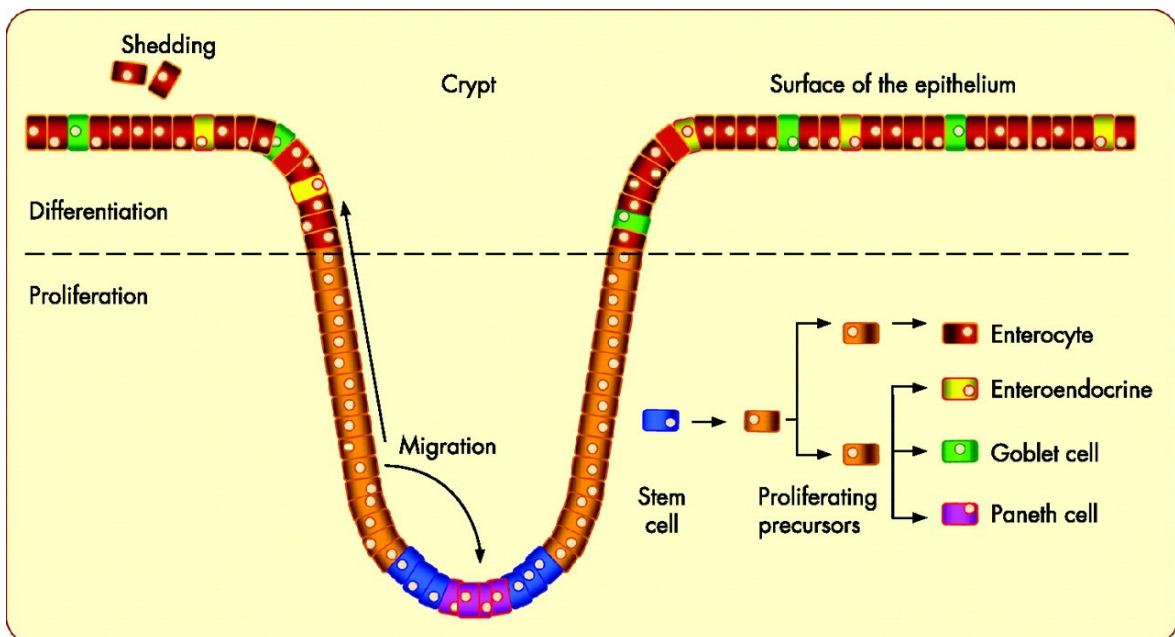


Figura 7: Organizzazione cellulare dell'epitelio intestinale (71).

La principale forza trainante il rinnovamento cellulare organizzato intestinale è rappresentata dal signalling WNT (wingless int), che tra le altre cose regola l'espressione dei geni codificanti per i recettori EphB2 ed EphB3. Il recettore EphB2 è presente ad alti livelli nelle cellule staminali intestinali e la sua espressione decresce gradualmente a mano a mano che le cellule si differenziano e migrano verso il lume. Il recettore EphB3 invece si trova espresso solo nelle cellule staminali. Al contrario l'espressione di ephrinB1 ed ephrinB2 è negativamente controllata dal signalling WNT e risultano espresse solamente nelle cellule intestinali differenziate (72) (figura 8).

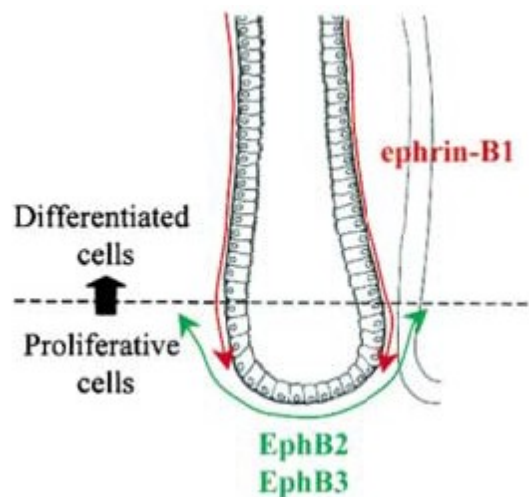


Figura 8: Espressione dei recettori e dei ligandi efrinici nell'epitelio intestinale (72).

Nell'intestino di topi knockout per il recettore EphB3, la localizzazione delle PC non rimane confinata alla base delle cripte, ma tali cellule si trovano disperse in tutto l'epitelio (72).

Questo fenotipo è osservato anche in topi knockout per ephrinB1 (73), mentre nei topi knockout sia per EphB2, che per EphB3 il confine tra il compartimento cellulare proliferativo e quello differenziato è perso e le cellule della cripta si mischiano invece di migrare verso il lume in maniera unidirezionale (72).

Queste osservazioni sperimentali dimostrano che il signalling bidirezionale di tipo B è determinante nel fissare i compartimenti cellulari di proliferazione e differenziazione intestinali e nel determinare la migrazione ordinata delle cellule in via di differenziazione lungo l'asse delle cripte.

Infine anche il sistema efrinico A potrebbe avere un ruolo nel rinnovamento cellulare organizzato dell'intestino in quanto è già stato rilevato un diverso profilo di espressione degli mRNA di molti recettori EphA ed efrine lungo l'asse delle cripte (74).

Un altro esempio in cui il signalling bidirezionale sembra giocare un ruolo importante è nell'epitelio ghiandolare della mammella. Qui infatti i livelli di espressione di EphA2, EphB4 ed ephrinB2 sono sotto il controllo degli estrogeni (75). In particolare per quanto riguarda EphB4 si è osservato che i suoi livelli di espressione variano a seconda dello step della ghiandola mammaria in via di sviluppo causando una ritardata proliferazione e

un'incompleta ramificazione dell'albero duttale durante la pubertà e la gravidanza come pure una ritardata apoptosi cellulare al tempo dell'involutione ghiandolare post allattamento (76).

## ANGIOGENESI

Il signalling bidirezionale efrinico ha un ruolo fondamentale durante lo sviluppo embrionale del sistema vascolare. In particolare il recettore EphB4 e l'ephrinB2 mostrano un modello di espressione complementare che determina i confini tra i vasi venosi (caratterizzati da elevati livelli di EphB4) e quelli arteriosi (caratterizzati da elevati livelli di ephrinB2). Inoltre la generazione di specifici modelli murini knockout per EphB4 o ephrinB2 ha mostrato che entrambi sono essenziali per la morfogenesi dei vasi sanguigni (77). Infine è stato osservato che ephrinB2 è necessaria per il reclutamento delle cellule murali (periciti e cellule muscolari lisce) nella parete dei vasi sanguigni, evento chiave per il corretto funzionamento del sistema vascolare (78).

Poco invece si sa sul ruolo svolto dal sistema efrinico nell'angiogenesi fisiologica nell'adulto. Nello specifico è stato visto che nel sistema vascolare della retina murina, usato come modello postnatale dell'angiogenesi, l'overespressione del recettore EphB4 promuove la formazione di vasi sanguigni più grandi, caratterizzati da ridotta permeabilità e da ramificazioni disorganizzate (79). Inoltre è stato osservato che ephrinB2 permane nelle arterie dell'adulto e nel sottostante manicotto muscolare (80, 81), ma il suo ruolo fisiologico non è ancora stato chiarito.

I recettori Eph e le efrine sono anche espressi nel sistema vascolare tumorale, dove promuovono l'angiogenesi (82, 83, 84).

Il principale ruolo nell'angiogenesi tumorale ad oggi è stato attribuito al *forward signal* mediato da EphA2 e al *reverse signal* mediato da ephrinB2, basandosi su una serie di evidenze sperimentali ottenute in modelli murini sia *in vitro*, che *in vivo*. Interessante sottolineare che il recettore EphA2 non è espresso né nel sistema vascolare embrionale né nei vasi sanguigni adulti quiescenti. L'interazione con ephrinA1, espressa sia sulle cellule endoteliali tumorali che su quelle stromali è responsabile dell'attivazione del recettore EphA2 endoteliale, il cui *forward signal* media la forma e la migrazione delle cellule endoteliali durante l'angiogenesi patologica. EphA2 inoltre appare essere indispensabile per le azioni mediate da VEGF (vascular endothelial growth factor), tra le quali la migrazione delle cellule endoteliali e il loro assemblaggio in strutture capillari (85).

Anche ephrinB2 è stata trovata espressa nel sistema vascolare di molti tumori come pure il recettore EphB4. L'interazione EphB4-ephrinB2 è stata correlata ad un aumento della crescita tumorale dovuta ad una qualche azione sull'angiogenesi, ancora da dimostrare. In vero comunque l'attivazione di EphB4 da parte di ephrinB2 sulle cellule progenitrici delle cellule endoteliali circolanti incrementa l'accumulo di queste a livello dei siti di neo vascolarizzazione (86).

## **CANCRO E SISTEMA EFRINICO**

Molti recettori Eph e/o efrine sono espressi sia nelle cellule tumorali, che nel microambiente che circonda la massa tumorale. Le evidenze sperimentali finora raccolte circa il ruolo del sistema efrinico nei tumori presentano una variabilità tale da portare ad attribuire a ciascun membro di questo sistema, a seconda della neoplasia studiata e dello stadio della neoplasia stessa, proprietà promuoventi o sopprimenti i tumori.

### **ESPRESSIONE NELLE CELLULE TUMORALI**

Molti studi hanno correlato i livelli di espressione dei recettori Eph e dei ligandi efrinici con lo stadio tumorale, il potere metastatizzante e le aspettative di sopravvivenza.

EphA2, ad esempio, risulta essere up-regolato in molte neoplasie e la sua espressione è stata correlata ad un maggior grado di malignità e ad una prognosi infausta in diversi studi (4, 87, 88, 89).

Anche il recettore EphB4 è ampiamente espresso nelle cellule tumorali e anche in questo caso è stata trovata una correlazione diretta tra la progressione della malattia e i suoi livelli di espressione (84, 90, 91).

Altri lavori, al contrario, hanno evidenziato un decremento dei livelli di espressione di recettori e ligandi efrinici sia in linee cellulari tumorali che in campioni prelevati da pazienti affetti da neoplasia. A tal proposito EphA1 è stato trovato down-regolato negli stadi avanzati del cancro della pelle e nel tumore al colon (92, 93), mentre i livelli di espressione di ephrinA5 risultano essere ridotti nel glioblastoma (94).

Anche per il sistema efrinico B si possono trovare esempi di down-regolazione come ad esempio negli stadi avanzati del cancro al colon (95, 96, 97, 98).

Invece, in uno studio condotto sul cancro al polmone non a piccole cellule è emerso che il recettore EphB6 ha un'espressione più bassa quando il cancro è metastatico, rispetto a quando il tumore non è metastatico (99).

Questi esempi evidenziano come il profilo di espressione di ciascun componente del sistema efrinico possa variare da tumore a tumore e nello stesso tumore a seconda del suo stadio. Per tentare di conciliare questa variabilità emersa nelle indagini fin'ora effettuate, alcuni gruppi di ricerca, basandosi su studi condotti nel cancro al colon, ipotizzano un'iniziale up-regulation dei recettori Eph, che può successivamente essere seguita da un silenziamento epigenetico, mediante l'ipermetilazione del promotore genico, che si traduce in una ridotta espressione negli stadi avanzati della neoplasia (93, 95, 96, 97). Questa teoria, essendo al momento limitata ad una casistica particolare (il cancro al colon) e non avendo ancora trovato riscontro in altri tipi di neoplasie non può essere presa come assunto generale.

Interessante infine, il modello di espressione inverso di EphA2 e dei suoi ligandi efrinici di tipo A, riscontrato in 28 linee cellulari di cancro alla mammella (100). In questo studio si

mostra che il recettore EphA2 è un target trascrizionale diretto del pathway Ras-raf-MAPK, attivato dai fattori di crescita, mentre l'espressione di ephrinA1 viene inibita dalla stessa via.

Un analogo modello di espressione si è riscontrato anche per diversi recettori EphB, quando comparati con le efrine di tipo B sia in linee cellulari di cancro alla mammella (95) che nei primi stadi del cancro al colon (101).

## **ESPRESSIONE NEL MICROAMBIENTE CIRCONDANTE IL TUMORE**

Come già detto le interazioni EphA2-ephrinA1 e EphB4-ephrinB2 giocano un ruolo molto importante nell'angiogenesi tumorale e non è un caso che diversi recettori Eph e ligandi efrinici siano up-regolati nelle cellule vascolari da fattori derivati dai tumori e dall'ipossia. Per esempio il TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), il VEGFA (vascular endothelial growth factor A) e HIF2 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$ ) sono in grado di up-regolare ephrinA1 in culture cellulari endoteliali (102, 103, 104), mentre l'espressione di ephrinB2 risulta essere stimolata da VEGF.

Al contrario invece, poco si sa riguardo le comunicazioni, mediate dal sistema efrinico, che intercorrono tra il tumore e altri tipi cellulari infiltranti la massa tumorale, quali ad esempio i fibroblasti attivati o le cellule del sistema immunitario. Nonostante questo, appare chiaro che le comunicazioni mediate dal sistema efrinico tra questi due compartimenti cellulari abbia un ruolo centrale nell'omeostasi tumorale e si spera che studi futuri possano chiarire le modalità e i meccanismi di questa comunicazione.

## **SOPPRESSIONE O PROMOZIONE DEL TUMORE?**

Come già accennato il segnale bidirezionale attivato dal sistema efrinico può avere sia proprietà inibenti che promuoventi la crescita tumorale. Ad oggi si è portati a pensare che ciascun membro di questo sistema possa agire sia come oncogene che come oncosoppressore a seconda del contesto cellulare in cui si trova espresso.

In molte linee cellulari tumorali, i recettori Eph sembrano essere altamente espressi, ma scarsamente attivati dalle efrine (1, 84, 91, 101, 105, 106). Questo è stato il primo indizio a suggerire che il *forward signal* mediato dai recettori Eph dopo stimolazione con il ligando efrinico, potesse giocare un ruolo antitumorale.

Questa ipotesi ha trovato successivamente conferma in molti studi in cui si è osservato che l'attivazione dei recettori Eph attraverso l'utilizzo di ephrins-fc (proteine ricombinanti delle efrine, dimerizzate attraverso l'ausilio della frazione costante degli anticorpi) può inibire la proliferazione, la sopravvivenza, le capacità migratorie e di invasione di molte linee cellulari poste in cultura come anche la crescita tumorale *in vivo* in diversi modelli murini (5, 84, 98, 101, 107).

Il ruolo antitumorale che può essere svolto dai recettori Eph è stato anche dimostrato valutando gli effetti causati dal silenziamento dei geni codificanti questi recettori. Al

riguardo, molto interessante uno studio condotto nel 2009 inerente il ruolo di EphB4 nel tumore al colon (108). In questo lavoro è emerso che la modulazione dei livelli di questo recettore in diverse linee cellulari di carcinoma del colon provoca una diversa crescita tumorale quando le cellule vengono impiantate in topi. In particolare bassi livelli di EphB4 sono associati ad una crescita più veloce. Sempre in questo studio l'inattivazione di un allele di EphB4 in topi APC<sup>min/+</sup> (topi mutanti per l'allele APC, che spontaneamente sviluppano tumori multipli nell'intestino), provoca una maggiore capacità proliferativa sia del tessuto epiteliale normale che della massa tumorale, lo sviluppo di tumori più grandi nell'intestino tenue e di un numero maggiore di tumori nell'intestino crasso. Infine gli studi *in vitro*, condotti sulle stesse linee cellulari impiegate negli xenograft, mostrano che la perdita di EphB4 conferisce alle cellule un'aumentata capacità invasiva attraverso la matrice extracellulare.

L'attività antitumorale del *forward signal* mediato dall'attivazione dei recettori Eph potrebbe essere ascrivibile al loro naturale ruolo nell'omeostasi tissutale, dove promuovono l'inibizione della crescita contatto dipendente e la transizione da un fenotipo mesenchimale (cellule mobili e non polarizzate) ad uno epiteliale (cellule polarizzate, caratterizzate da alti livelli di E-caderine e scarsa mobilità).

Il ruolo antitumorale che può essere svolto dai recettori Eph è sottolineato anche dall'individuazione di alcune strategie che le neoplasie mettono in atto al fine di minimizzare il *forward signal*.

In alcuni tumori ad esempio si registrano elevati livelli di recettori Eph, ma bassi livelli di ligandi efrinici con il risultato di avere un signalling efrinico quasi del tutto assente (95, 100, 101).

Un'alternativa alla riduzione dei ligandi efrinici al fine di ridurre il *forward signal* dei recettori Eph può essere rappresentata dalla perdita delle E-caderine (109). In uno studio condotto nel 1999 si dimostrava infatti che nell'epitelio non trasformato del seno (cellule MCF-10A, MCF-12A e MCF-2) il recettore EphA2 risulta essere fosforilato e localizzato ai siti di contatto cellula-cellula, mentre nelle linee cellulari di cancro al seno metastatico (linee cellulari MDA-MB-231, e cellule MDA-MB-435), che mancano delle E-caderine, EphA2 è presente a livelli più alti, ma in forma non fosforilata e ridistribuito in regioni del plasmalemma non interagenti con le cellule vicine. Il ripristino dell'espressione delle E-caderine nelle cellule tumorali comporta un allineamento del recettore EphA2 a quello dell'epitelio non trasformato in termini di localizzazione e grado di fosforilazione. L'attivazione del recettore EphA2 attraverso il ripristino delle E-caderine o attraverso la stimolazione del recettore EphA2 con anticorpi ad attività agonista riduce la crescita delle cellule tumorali e la loro adesione alla matrice extracellulare.

Il *forward signal* dei recettori Eph può anche essere modulato negativamente attraverso l'attività di tirosin fosfatasi (110, 111). Uno studio del 2008 mostra come le cellule leucemiche LK63, esprimenti il recettore EphA3 rispondono all'ephrinA5 acquisendo un fenotipo adesivo e polarizzato piuttosto che un fenotipo non polarizzato-non adesivo.

Questo effetto è dovuto al mancato signalling da parte di EphA3 nonostante il legame con ephrinA5, mediato dall'iperattività delle fosfatasi fosfotirosiniche di queste cellule. In uno studio del 2002 invece si dimostrava che le proprietà trasformanti di LMW-PTP (low molecular weight protein tyrosine phosphatase) sulle cellule epiteliali del seno erano ascrivibili alla sua attività di defosforilazione sul recettore EphA2, che scavalcava in questo modo il *forward signal* mediato dal legame di EphA2 con i ligandi efrinici (111).

Infine il *forward signal* mediato dai recettori Eph potrebbe essere inibito nei tumori attraverso mutazioni dei geni codificanti per questi recettori e a tal proposito esempi di mutazioni che impediscono ai recettori Eph di legare i ligandi efrinici o che ne impediscono la funzionalità chinasi sono già stati riportati in letteratura (112, 113, 114).

Se pur meno numerosi, la letteratura riporta anche esempi in cui è il *reverse signal* mediato dai ligandi efrinici ad avere un ruolo antitumorale.

In uno studio condotto da Li e colleghi nel 2009 si mostra come in cellule di glioma umano U373 il ripristino dell'espressione di ephrinA5, che nel glioma primario è significativamente ridotto rispetto ai livelli di ephrinA5 del tessuto normale, riduce la tumorigenicità di queste cellule attraverso la riduzione dei livelli di EGFR (epidermal growth factor receptor), riconosciuta oncoproteina in questo tipo di neoplasia (94). La stimolazione con EphA2-Fc (al fine di indurre solo il *reverse signal*) di queste cellule transfettate con ephrinA5 è sufficiente a ridurre i livelli di EGFR.

Anche le efrine di tipo B hanno dimostrato di poter trasdurre segnali antitumorali (5, 20, 115, 116). A tal riguardo molto interessante uno studio condotto su cellule di adenocarcinoma di colon (HT-29) nel 2008 (115). In questo lavoro si mostra che ephrinB1, normalmente non attivata in queste cellule tumorali, è in grado di competere con la GTPasi Cdc42 per l'associazione con PAR6, proteina ponte per il complesso PAR-6/aPKC/Cdc42-GTP. Questo complesso, importante per la formazione delle tight junctions, risulta quindi essere inibito nelle HT-29 da ephrinB1 non fosforilata/non attivata. L'attivazione del ligando efrinico attraverso l'impiego di EphB1-Fc, provoca la fosforilazione dei residui citosolici di ephrinB1, che si dissocia da PAR6, consentendo quindi il ripristino del normale complesso regolante la formazione delle tight junctions.

Diversi sono anche gli esempi riportati in letteratura in cui i componenti del sistema efrinico promuovono lo sviluppo e la crescita tumorale.

In uno studio del 2009, condotto da Genander e colleghi, si dimostra come nell'adenoma intestinale il recettore EphB2 sia in grado allo stesso tempo di promuovere la proliferazione cellulare e di inibire la crescita invasiva. In questo lavoro viene mostrato che il posizionamento cellulare è regolato dai recettori EphB indipendentemente dalla loro attività chinasi, che al contrario stimola la proliferazione cellulare. Durante la progressione tumorale l'adenoma diviene carcinoma silenziando EphB2 solo dopo aver sganciato il pathway che stimola la proliferazione cellulare dal *forward signal* mediato da EphB2 (117).

Ancora, l'attivazione del *forward signal* di EphA2 o EphB4 ha dimostrato di promuovere una migrazione di tipo ameboide nelle cellule tumorali e di essere in grado di destabilizzare le giunzioni epiteliali di adesione in varie linee cellulari tumorali (118, 119).

Nello specifico Fang e colleghi, lavorando su cellule tumorali del seno 4T1, naturalmente esprimenti EphA2 ed ephrinA1, dimostrano che la fosforilazione del recettore e la sua attività chinasi contribuiscono almeno in parte alla malignità tumorale. Per dimostrare questo hanno sviluppato varianti di EphA2 mancanti o del dominio citosolico o portanti una mutazione puntiforme che inibisce l'attività chinasi. Le 4T1 transfettate con questi mutanti di EphA2, una volta impiantate nel cuscinetto adiposo mammario dei topolini, inducono lo sviluppo di tumori di dimensioni minori e con una minore capacità di formare metastasi al polmone, caratteristica quest'ultima dovuta ad una difettiva attivazione di RhoA GTPasi e di conseguenza dei processi di mobilità cellulari (118).

In uno studio condotto da Yang e colleghi si mostra invece che i recettori EphB, e in particolare EphB4, regolano la migrazione delle cellule di melanoma murine. In particolare le cellule più maligne e metastatiche, le SW1, esprimono livelli più alti di EphB4, totale e fosforilato, rispetto alle cellule di melanoma C19 e C23, meno maligne e meno metastatiche. Sempre le SW1, una volta transfettate con un mutante di EphB4, mancante della porzione citosolica o portante una mutazione puntiforme inattivante nel dominio chinasi, mostrano capacità migratorie significativamente ridotte. Inoltre la capacità migratoria di queste cellule può essere contrastata con l'impiego di EphB2-Fc che funge da antagonista nell'interazione tra EphB4 e le ephrinB cellulari. Come nel lavoro riportato sul recettore EphA2 anche in questo caso il *forward signal* di EphB4 promuove la migrazione attivando RhoA GTPasi (119).

Un altro studio, riguardante sempre il ruolo del sistema efrinico nel melanoma, mostra che sulle linee cellulari C8161 (cellule umane di melanoma cutaneo metastatico) e MUM-2B (cellule umane di melanoma uveale metastatico) il *forward signal* mediato da EphA2 è importante nel sostenere il processo di mimica vasculogenica (processo assomigliante alla vasculogenesi embrionale, che consiste nella formazione nel microambiente, da parte delle cellule tumorali, di un network di strutture tubulari ricche di matrice, che clinicamente aumenta il rischio metastatico) (120).

Il ruolo oncogenico che possono avere i recettori Eph è sottolineato anche dal fatto che la down-regolazione di EphA2 o EphB4 attraverso l'utilizzo di siRNAs (small interfering RNAs) o oligonucleotidi antisenso ha mostrato di ridurre la malignità delle cellule tumorali in cultura e inibire la crescita tumorale *in vivo* in diversi modelli di cancro murino (90, 91, 121, 122, 123,).

Inoltre l'overespressione di EphA2 causa la trasformazione oncogenica delle cellule epiteliali della mammella sia in cultura che *in vivo* (105, 124).

In particolare Zelinski e colleghi nel 2005 dimostrarono che la semplice overespressione del recettore EphA2 nelle cellule epiteliali non trasformate del seno MCF-10A, era sufficiente a trasformare le cellule e a conferire loro un potenziale tumorigenico.

Curiosamente la stimolazione del recettore con il ligando efrinico era in grado di revertire la crescita maligna e l'invasività delle MCF-10A trasformate, sottolineando che le proprietà oncogeniche del recettore erano indipendenti dalla sua attività chinasi (105).

In casi come questi, in cui cioè l'overespressione di un recettore Eph è accompagnata da bassi livelli di attivazione, l'attività oncogenica dei recettori Eph è indipendente dalla stimolazione efrinica e dalla loro attività chinasi, ma bensì dovuta ai loro domini citosolici, che recenti lavori mostrano come parte integrante di pathways di altri segnali oncogenici (106, 116, 125, 126).

A tal riguardo EphA2 ha mostrato di mediare alcuni dei segnali oncogenici sostenuti dai membri della famiglia degli EGFR, come la migrazione cellulare *in vitro* o la crescita tumorale e metastatica in un modello murino di cancro alla mammella (125, 126).

Nel primo studio, condotto nel 2007 da Larsen e colleghi, si dimostra che nelle linee cellulari HN5 (cellule di carcinoma umano del collo e della testa) e A431 (cellule epidermoidi di carcinoma umano), la stimolazione di EGFR, naturalmente overespresso in queste cellule, induce l'espressione di EphA2, che risulta essere determinante nel processo di migrazione sostenuto da EGF. Infatti il silenziamento di EphA2, mediante siRNA in queste due linee cellulari inibisce il processo di migrazione indotto da EGF. Curiosamente anche la stimolazione di EphA2 con ephrinA1-Fc provoca lo stesso effetto, sottolineando ancora una volta la dicotomia che può sussistere tra recettore attivato e non attivato (125).

Nel secondo studio invece, condotto nel 2008 da Brantley-Sieders e colleghi, si mostra il ruolo determinante dell'espressione di EphA2 in un modello murino transgenico di carcinoma mammario (Neu, topolini sovraespressanti ErbB2). In questi animali infatti il contemporaneo silenziamento di EphA2 impedisce l'iniziazione tumorale e la progressione metastatica nell'epitelio della mammella. L'analisi istologica ed *ex-vivo* condotta sui topi Neu wild type per EphA2, dimostrano che questo recettore aumenta la proliferazione cellulare e la motilità cellulare. Analisi biochimiche successive hanno infine evidenziato che l'attività oncogenica di EphA2 è indipendente dalla stimolazione con il ligando, ma è dovuta all'interazione fisica con ErbB2, che utilizza nel suo downstream del segnale i domini citosolici del recettore Eph.

Sempre EphA2 sembra essere necessario per l'invasività mediata dalle Src chinasi in culture cellulari di carcinoma al colon (116).

Infine recentemente Miao e colleghi hanno rivelato il connubio che può esistere tra Akt ed EphA2 (106). Akt è una serina/treonina chinasi citosolica, che media molti dei segnali mediati dai fattori di crescita. In questo lavoro si mostra come EphA2 sia substrato di Akt e che la fosforilazione su un residuo di serina in posizione 897 sia indispensabile per il signalling mediato da Akt, che determina la migrazione e l'invasione di cellule di glioma umano O373 e di cancro della prostata PC-3M. Interessante notare inoltre gli effetti della stimolazione di EphA2 con ephrinA1-Fc: da un lato si arresta il pathway di Akt, che non riesce più ad utilizzare come substrato EphA2, mentre dall'altro il *forward signal* innescato dall'interazione tra EphA2 ed ephrinA1-Fc porta a disattivare la stessa Akt.

Anche se le conoscenze al riguardo sono inferiori, in letteratura si possono trovare lavori che mostrano come pure il *reverse signal* mediato dai ligandi efrinici possa promuovere la crescita e lo sviluppo dei tumori.

A tal proposito in un lavoro del 2005 condotto da Lida e colleghi si dimostra che ephrinA1 è altamente espresso in campioni di carcinoma epatocellulare, quando comparato con campioni prelevati da tessuto epatico non trasformato, e che in cultura la trasfezione di cellule di epatoma HLE con ephrinA1 promuove la proliferazione di queste cellule, mentre il silenziamento di questo ligando efrinico in cellule Huh7, mediante un oligonucleotide antisense, ne inibisce la proliferazione. In questa neoplasia gli effetti proliferativi e promuoventi la crescita tumorale di ephrinA1 sono dovuti all'induzione nell'espressione di geni correlati al ciclo cellulare (p21), all'angiogenesi (angiopoietin1 e trombospondina1) e all'interazione cellula-cellula (RhoGTPasi, integrine e metalloproteasi) (127).

In uno studio condotto nel 2006 da Campbell e colleghi si dimostra invece che l'espressione di ephrinA5 nei fibroblasti murini aumenta il potenziale oncogenico cellulare attraverso un incremento del comportamento invasivo e della crescita indipendente da ancoraggio. Infatti fibroblasti 3T3 transfettati con ephrinA5 e stimolati con EphA5-Fc formano colonie cellulari più grandi rispetto a quelle formate dalle cellule non trasfettate, quando cresciute in soft-agar; inoltre queste cellule trasfettate mostrano un potenziale invasivo maggiore che è mediato dall'attivazione di chinasi Src tramite il *reverse signal* di ephrinA5 (128).

Anche il *reverse signal* mediato da ephrin di tipo B può mediare segnali promuoventi la crescita e lo sviluppo tumorale (129, 130, 131).

Jiang e colleghi nel 2008 dimostrarono che ephrinB1 è overespressa nei linfociti T maligni e che la sua attivazione mediante EphB3-Fc sopprime le risposte cellulari di tipo adesivo e promuove un comportamento invasivo (130).

Analoga funzione sembra avere ephrinB2 nel glioblastoma (GBM). Nello studio condotto da Nakada e collaboratori nel 2010 si mostra come ephrinB2 sia altamente espresso in campioni di GBM rispetto ai livelli presenti nel cervello normale e studi condotti *in vitro* su cellule di glioma U87 altamente invasivo evidenziano il ruolo di ephrinB2 nei processi di migrazione ed invasione. Infatti in questa linea cellulare la stimolazione di ephrinB2 con EphB2-Fc accresce le proprietà migratorie e invasive di queste cellule, mentre l'impiego di un anticorpo bloccante ephrinB2 contrasta significativamente sia la migrazione che l'invasione cellulare (131).

## SISTEMA EFRINICO COME TARGET TERAPUTICO NEI TUMORI

Le conoscenze, riguardo il ruolo svolto dai membri del sistema efrinico nelle neoplasie umane, sono ancora limitate e contraddistinte da una marcata dicotomia, che appare dipendente dal sistema cellulare coinvolto e dallo stadio della neoplasia studiata. Ad ogni modo, diverse strategie sono state prese in considerazione sia per interferire con il sistema efrinico, nei casi in cui promuove lo sviluppo tumorale, che per aumentarne la funzione nei casi in cui sembra invece giocare contro la crescita del tumore. Inoltre, dato che molte neoplasie sembrano contraddistinte dall'overespressione di uno specifico recettore Eph o di un'efrina, molecole altamente selettive per questi target molecolari, potrebbero essere sfruttate per una veicolazione specifica di farmaci, tossine o peptidi antigenici stimolanti una risposta immunitaria.

### STRATEGIE DI INIBIZIONE DEL SISTEMA EFRINICO

Ad oggi sembra chiaro che il sistema efrinico svolga un ruolo determinante nel promuovere l'angiogenesi tumorale e quindi l'inibizione di questo sistema potrebbe risultare utile nella terapia antiangiogenica così come in quelle neoplasie dove il sistema efrinico sembra promuovere la crescita tumorale.

Tre sono le strategie fin'ora indagate al fine di ridurre il signalling efrinico: lo sviluppo di inibitori chinasi dei recettori Eph, l'impiego di siRNAs o oligonucleotidi antisenso e infine la ricerca di molecole in grado di interferire con il legame Eph-ephrin.

Tra gli inibitori del dominio chinasi Eph, possono essere annoverati alcuni selettivi bloccanti per il recettore EphB4 sviluppati da alcuni gruppi di ricerca (132, 133, 134), o alcuni inibitori chinasi designati per altri target molecolari che sono risultati in grado di inibire anche l'attività dei recettori Eph (135, 136, 137) (figura 9).

Molecules	Targets	Activity
<b>Kinase inhibitors</b>		
Anilino pyrimidine derivatives	EPHB4*	ATP competitors
Benzenesulfonamide derivative	EPHB4*	ATP competitor
XL647 (also known as EXEL-7647)*	EPHB4*	ATP competitor
Xanthine derivatives	Eph receptors	ATP competitors
LDN-211904	Eph receptors	ATP competitor
Pyrido[2,3-d]pyrimidine PD173955	Eph receptors	ATP competitor
Nilotinib and analogues†	Eph receptors	ATP competitors
Dasatinib	Eph receptors*	ATP competitor

Figura 9: Inibitori chinasi dei recettori Eph. \*In sperimentazione clinica (5).

Tra questi, il caso più conosciuto, è sicuramente quello del Dasatinib, che oltre alle chinasi della famiglia Src e Abl è in grado di inibire anche EphA2 ed altri recettori Eph (135, 136).

XL647 (o EXEL-7647) invece, inibitore somministrabile per via orale di EGFR e VEGFR è attualmente in fase di sperimentazione clinica nel cancro al polmone anche come inibitore di EphB4 (137).

L'inibizione del legame Eph-ephrin è un'altra strategia che ha già dato risultati nella terapia antiangiogenica. A tal riguardo EphA2-Fc e il monomero solubile di EphB4 hanno già dimostrato di essere in grado di inibire la crescita tumorale in diversi modelli murini inibendo l'angiogenesi associata allo sviluppo del cancro e sostenuta dall'attivazione del signalling efrinico (103, 138, 139, 140, 141, 142).

L'inibizione dell'interazione proteina-proteina può essere anche raggiunta attraverso l'impiego di peptidi (143, 144) e anticorpi (145).

Riguardo i peptidi, i primi successi nel campo si sono ottenuti tra il 2003 e il 2005 grazie al lavoro del gruppo di ricerca di Pasquale, che ha portato all'identificazione dei primi peptidi in grado di riconoscere i recettori EphA (143) ed EphB (144) a seguito di un lavoro di screening basato sul phage display.

Tra gli anticorpi invece, è da ricordare il lavoro condotto nel 2002 da Mao e colleghi, che svilupparono una serie di anticorpi monoclonali diretti verso la sequenza extracellulare di EphB2 e uno di questi, denominato mAb 2H9 risultò efficace nell'inibire il legame tra EphB2 e i suoi ligandi efrinici e la conseguente fosforilazione da essi indotta (145).

## **STRATEGIE DI ATTIVAZIONE DEL SISTEMA EFRINICO**

Nelle neoplasie in cui il *forward signal* dei recettori Eph sembra giocare un ruolo antitumorale, la stimolazione del sistema efrinico potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico e i risultati ottenuti fin'ora sia *in vitro* che *in vivo* utilizzando i ligandi efrinici ricombinanti dimerizzati (ephrin-Fc) lasciano ben sperare.

Come per la ricerca degli antagonisti del sistema efrinico, anche nel campo degli agonisti dei recettori Eph la letteratura riporta già esempi di peptidi o anticorpi monoclonali in grado di attivare i recettori Eph e il *forward signal* da esso sostenuto.

## **TARGETING DEL SISTEMA EFRINICO PER LA CONSEGNA DI FARMACI, TOSSINE O AGENTI D'IMMAGINE**

L'overespressione di molti recettori e ligandi efrinici nelle neoplasie potrebbe essere sfruttato in terapia per la veicolazione mirata di farmaci e tossine mediante coniugazione con anticorpi selettivi per i membri del sistema efrinico.

A tal riguardo sono risultati molto promettenti due studi condotti coniugando un anticorpo selettivo rispettivamente per EphB2 o per EphA2 con derivati del farmaco peptidico auristatina, inibitore della polimerizzazione della tubulina (145, 146).

Nello specifico, nello studio condotto da Mao e colleghi nel 2002 e che portò alla scoperta di mAb 2H9 come anticorpo monoclonale agonista del recettore EphB2, la coniugazione di questo anticorpo con monometilauristatina E permette di eliminare selettivamente cellule

tumorali esprimenti EphB2 *in vitro* (cellule di fibrosarcoma HT1080 transfettate con EphB2). Lo stesso trattamento per via intraperitoneale inoltre è in grado di inibire significativamente la crescita tumorale *in vivo*, dopo iniezione sottocutanea di queste cellule in “nude mice” (145).

Analoghi risultati si sono ottenuti nel 2008 quando Jackson e colleghi hanno coniugato un anticorpo monoclonale specifico per EphA2 (mAb 1C1), da loro stessi scoperto, con monometilauristatinafenilalanina. In particolare la somministrazione intraperitoneale del coniugato è risultato efficace *in vivo* nel contrastare la crescita tumorale sia di cellule di adenocarcinoma prostatico PC3 impiantate sottocute in “nude mice” sia di cellule di glioma di ratto F98 o RG2 impiantate nei ratti Fisher (146).

Risultati incoraggianti sono anche arrivati dall’impiego di nano particelle d’oro ricoperte di ephrinA1 nel trattamento fototermico di culture cellulari tumorali prostatiche caratterizzate da elevati livelli di EphA2.

Infine gli elevati livelli di recettori e ligandi efrinici nelle neoplasie potrebbero essere sfruttati in diagnostica per la veicolazione, sempre mediante anticorpi, peptidi o efrine ricombinanti, di agenti di immagine per la rivelazione della massa tumorale.

## SCOPO DELLA RICERCA

Il lavoro svolto durante questa mia esperienza dottorale è da inserirsi in un contesto più ampio di uno specifico progetto di ricerca, finanziato dall'associazione italiana ricerca sul cancro (AIRC), volto ad identificare ligandi selettivi per il sistema efrinico.

Al fine di raggiungere tale obiettivo si è reso necessario:

- Progettare, mettere a punto e convalidare un modello sperimentale “in vitro” economicamente sostenibile per lo screening iniziale.
- Allestire una libreria di composti la più chimicamente diversificata possibile al fine di aumentare le possibilità di successo.
- Eseguire lo screening sulla libreria allestita.
- Caratterizzare farmacologicamente in maniera più approfondita quei composti risultati più promettenti nella prima fase di screening.
- Mettere a punto modelli sperimentali funzionali “in vitro” al fine di chiarire la natura agonista o antagonista dei ligandi selezionati, nonché l'efficacia e la selettività nei confronti del sistema efrinico.
- Ottimizzare il/gli hit di partenza al fine di ottenere ligandi più affini e potenti.

# MATERIALI E METODI

## ELISA SCREENING

Tutti i composti testati, sono stoccati alla concentrazione di 20mM in dimetilsolfossido (DMSO), conservati alla temperatura di -20°C e saggiati alla concentrazione iniziale di 50µM, DMSO 1%. Solo le molecole spiazzanti almeno il 40% del legame di ephrinA1-Fc biotinilata (R&D systems, BT602) da EphA2-fc (R&D systems, 639-A2-200) sono oggetto di ulteriori indagini miranti ad una piena caratterizzazione farmacologica. In breve il test consiste nel:

- Incubare overnight a 4°C 100µl/pozzetto di EphA2-fc alla concentrazione di 1µg/ml in PBS sterile (0,2g/l KCl, 8,0g/l NaCl, 0,2KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,15g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4), utilizzando piastre ELISA high binding da 96 pozzetti (constar).
- Lavare i pozzetti 3 volte con 300µl di wash buffer (0,05% tween 20 in PBS, pH 7,5) e incubare la piastra per 1h a 37°C con 300µl/pozzetto di blocking solution (0,5% BSA in PBS, pH 7,5).
- Lavare e incubare i pozzetti per 1h a 37°C con 90µl dei composti oggetto di screening (sciolti in PBS, DMSO 1%) o DMSO 1% utilizzato come controllo.
- Aggiungere 10µl di ephrinA1-Fc biotinilata ad una concentrazione pari alla sua Kd (calcolata di lotto in lotto) o una concentrazione equivalente di Fc (Millipore, AG714) per i bianchi. Incubare per 5 ore a temperatura ambiente.
- Lavare e aggiungere 100µl/pozzetto di streptavidina-HRP (Sigma, S5512) alla concentrazione di 0,05µg/ml in una soluzione di BSA 0,5% in PBS, pH 7,5. Incubare per 20 minuti a temperatura ambiente.
- Lavare e aggiungere 100µl/pozzetto di tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma, T2885) alla concentrazione di 0,1mg/ml in stable peroxide buffer (11,3g/l acido citrico, 9,7g/l di sodio fosfato, pH 5,0) addizionato al momento dell'uso con 0,02% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Incubare 20 minuti a temperatura ambiente.
- Bloccare la reazione colorimetrica aggiungendo a ciascun pozzetto 100µl di HCl 3N.
- Leggere l'assorbanza a 450nm mediante ELISA plate reader (Sunrise, TECAN, Svizzera).

La percentuale di inibizione del legame tra EphA2-fc ectodomain ed ephrinA1-Fc biotinilata da parte di ciascun composto viene quantificata mediante la seguente formula:

$$\% \text{ inibizione} = 1 - \frac{(\text{assorbanza pozzetto sostanza} - \text{bianco})}{(\text{assorbanza pozzetto DMSO 1\%} - \text{bianco})} * 100$$

Tutte le molecole, che alla concentrazione di 50 µM avevano prodotto una inibizione maggiore o uguale al 40% in questo studio di screening preliminare, sono testate nello stesso saggio a dosi diverse al fine di costruire curve complete di spiazzamento,

indispensabili per la determinazione dell' $IC_{50}$  del ligando. Per le molecole di maggiore interesse è stata determinata la  $K_i$  e il coefficiente di Hill costruendo curve di saturazione di ephrinA1-Fc biotinilata in assenza e in presenza di concentrazioni crescenti del composto in studio.

I valori di  $IC_{50}$  degli inibitori di legame e i valori di  $K_d$  delle curve di saturazione di ephrinA1-Fc biotinilata ottenute con o senza il composto in studio, sono stati calcolati usando una regressione non lineare mediante Prism Software (GraphPad Software Inc.). I valori di  $K_i$  degli inibitori di legame sono stati ottenuti tramite analisi di Schild.

## **SAGGIO DELL'ATTIVITÀ CHINASICA**

Il saggio commissionato alla Cerep valuta l'eventuale interferenza dei composti in studio con il dominio chinamico del recettore EphA2. Il saggio viene eseguito valutando il grado di fosforilazione di un substrato (il peptide Ulight-TK, 50nM) indotto dal recettore EphA2 in presenza o meno del composto di interesse. La staurosporina è utilizzata come controllo positivo (Cerep, 3055).

## SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE

La citotossicità dei composti in studio è stata valutata mediante saggio colorimetrico con MTT (Sigma-Aldrich, M2128) seguendo questo protocollo:

- Seminare le cellule (HT-29 o PC3) in piastre da 96 pozzetti alla concentrazione di  $10^5$  cellule/ml.
- Trattare i pozzetti con il composto di interesse o DMSO 1% (utilizzato come controllo) alle concentrazioni appropriate.
- Incubare per 2, 24, 48 o 72 ore.
- Aspirare il medium di cultura
- Aggiungere a ciascun pozzetto 100 $\mu$ l di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) alla concentrazione di 1mg/ml in medium di cultura. Incubare per 2h.
- Allontanare il medium di cultura e lavare i pozzetti una volta con 100 $\mu$ l di PBS.
- Sciogliere i cristalli di formazano formati in ciascun pozzetto con 100 $\mu$ l di DMSO.
- Leggere l'assorbanza a 550nm mediante ELISA plate reader.

La vitalità cellulare a seguito di ciascun trattamento è valutata rapportando il valore medio di assorbanza rilevato nei pozzetti trattati con il valore medio di assorbanza di quelli trattati con il solo veicolo. Saggio eseguito in triplicato.

$$\% \text{ vitalità} = (\text{assorbanza media nei pozzetti trattati} - \text{bianco}) / (\text{assorbanza media nei pozzetti veicolo} - \text{bianco}) * 100$$

## **SAGGIO DI LEGAME MEDIANTE PC3 CELL LINE**

- Incubare overnight a 4°C 100µl/pozzetto di ephrinA1-fc (R&D systems, 602-A1-200) alla concentrazione di 1µg/cm<sup>2</sup> in PBS sterile, utilizzando piastre ELISA high binding da 96 pozzetti.
- Lavare i pozzetti 3 volte con 300µl di PBS e bloccare la piastra per 1h a 37°C con 300µl di albumina di siero bovino (BSA) 1% sciolto in PBS.
- Lavare e aggiungere a ciascun pozzetto 100µl di una sospensione di cellule PC3 alla concentrazione di 5x10<sup>5</sup> cellule/ml, precedentemente incubate con il composto di interesse o DMSO 0,5% (utilizzato come controllo) in vials tenute in agitazione su di uno shaker per 30 minuti. Incubare a 37°C per 1h.
- Lavare e quantificare la quantità di cellule aderenti mediante colorazione con MTT.

## LISATI CELLULARI

- Seminare le cellule (PC3 o HT-29) in piastre da 12 pozzetti alla concentrazione di  $10^5$  cellule/ml in medium completo.
- Lasciare crescere le cellule nei pozzetti fino ad una confluenza di circa il 40%.
- Sostituire il medium di cultura con lo stesso medium, privato però di FCS, una volta raggiunta la confluenza desiderata.
- Lasciare le cellule overnight in questa condizione.
- Trattare le cellule con ephrinA1-Fc o EGF in presenza o assenza dei composti in studio.
- Aspirare il medium di cultura.
- Lavare i pozzetti una volta con PBS sterile e solubilizzare le cellule con lysis buffer (1%NP-40, 20mM Tris pH 8,0, 137mM NaCl, 10% glicerolo, 2mM EDTA, 1mM sodio ortovanadato, 10 $\mu$ g/ml aprotinina, 10 $\mu$ g/ml leupeptina).
- Trasferire i campioni in vials e lasciarli in agitazione su di uno shaker per 30 minuti a 4°C.
- Centrifugare i campioni a 14000 x g per 5 minuti a 4°C.
- Trasferire il supernatante in nuove vials e conservare a -70°C fino ad utilizzo.

Il contenuto proteico nei campioni di supernatante è valutato mediante BCA protein assay kit (Thermo scientific). I lisati sono impiegati per la determinazione, mediante saggi ELISA, di phospho-EphA2 e phospho-EGFR.

## **DETERMINAZIONE DI PHOSPHO-EPHA2 E PHOSPHO-EGFR**

La fosforilazione di EphA2 ed EGFR viene misurata mediante l'utilizzo di DuoSet® IC Sandwich ELISA Kit (R&D systems, #DYC4056 e #DYC1045 rispettivamente), seguendo il protocollo della ditta:

- Incubare overnight a temperatura ambiente 100µl/pozzetto dello specifico anticorpo di cattura all'appropriata concentrazione di utilizzo in PBS sterile, utilizzando piastre ELISA high binding da 96 pozzetti.
- Lavare i pozzetti 3 volte con 300µl di wash buffer e incubare la piastra per 1h a 37°C con 300µl/pozzetto di block buffer (1% BSA, 0,05% NaN<sub>3</sub> in PBS, pH 7,4).
- Lavare e aggiungere a ciascun pozzetto 100µl di lisato. Incubare per 2h a temperatura ambiente.
- Lavare e aggiungere 100µl/pozzetto di anticorpo di riconoscimento, diluito in una soluzione di BSA 0,1% in PBS. Incubare per 2h a temperatura ambiente.
- Lavare e aggiungere 100µl/pozzetto di TMB alla concentrazione di 0.1mg/ml in stable peroxide buffer addizionato al momento dell'uso con 0,02% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Incubare 20 minuti a temperatura ambiente.
- Bloccare la reazione colorimetrica aggiungendo a ciascun pozzetto 100µl di HCl 3N.
- Leggere l'assorbanza a 450nm mediante ELISA plate reader.

Il grado di fosforilazione di EphA2 o EGFR di ogni lisato è rapportato ai valori ottenuti nei lisati della stessa piastra trattati con ephrinA1-Fc o EGF in presenza del solo veicolo (DMSO 1% o PBS) utilizzato per le soluzioni dei composti in studio. Tali valori sono assunti arbitrariamente come 100%.

## ATTIVITÀ NEI CONFRONTI DI IRK $\beta$ E IGFR

L'eventuale attività dell'acido litocolico nei confronti dei due recettori ad attività tirosin chinasi IRK $\beta$  (insulin receptor kinase  $\beta$ ) e IGFR1 $\beta$  (insulin like growth factor receptor) è stato commissionato alla CEREP (Cerep, G153 e G163 rispettivamente) ed effettuato sfruttando l' $\alpha$  tecnologia (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

In breve:

- Seminare cellule HepG2 (per IRK $\beta$ ) o cellule A431 (per IGFR1 $\beta$ ) in micropiastre alla concentrazione di  $4 \cdot 10^4$  cellule/ pozzetto e incubare per 5 minuti con LCA o solo veicolo (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS).
- Stimolare per 10 minuti le cellule HepG2 con insulina 100nM e le cellule A431 con IGF1 5nM.
- Lisare e incubare per 2 ore con un accettore fluorescente (alphaLISA protein A beads ricoperte con anti-phospho-IRK $\beta$  o anti-phospho-IGFR1 $\beta$ ).
- Aggiungere un donatore di fluorescenza (streptavidin coupled-beads ricoperte con anti-IRK $\beta$  o anti-IGFR1 $\beta$ ) e incubare per 2 ore.
- Leggere con microplate reader (EnVision, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) a  $\lambda_{ex}=680\text{nm}$  e a  $\lambda_{em}=500\text{nm}$  e  $600\text{nm}$ . Le letture saranno proporzionali alla quantità di recettore fosforilato.

## **ATTIVITÀ NEI CONFRONTI DI VEGFR**

L'eventuale attività dell'acido litocolico nei confronti del recettore tirosin chinasi VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) è stato commissionato alla CEREP (Cerep, G142) ed effettuato sfruttando la spettroscopia dielettrica cellulare.

In breve:

- Seminare cellule HUVE (human umbelical vein endothelial) in piastre da 96 pozzetti alla concentrazione di  $5 \cdot 10^4$  cellule/pozzetto.
- Il giorno seguente sostituire il medium di crescita con HBSS addizionato di HEPES 20mM e lasciare equilibrare per 75 minuti in presenza o assenza dell'acido litocolico.
- Stimolare con VEGF 0,1nM e monitorare per 10 minuti per via impedenzometrica.

## SAGGIO FUNZIONALE DI RETRAZIONE DELLE PC3

- Seminare le PC3 in piastre da 12 pozzetti e lasciarle crescere fino a una confluenza di circa il 60%.
- Sostituire il medium di cultura con lo stesso medium privato però di FCS.
- Lasciare le cellule overnight in questa condizione.
- Trattare le cellule con il composto di interesse o con il solo veicolo (DMSO 0,25%). Lasciare incubare per 20 minuti.
- Aggiungere ephrinA1-Fc o Fc (utilizzato come controllo) alla concentrazione di 0.5µg/ml.
- Monitorare il cambiamento morfologico cellulare nel corso di 30 minuti utilizzando un microscopio e scattando fotografie ai tempi 0, 5, 10, 20 e 30 minuti.
- Analizzare le foto mediante ImageJ.

La percentuale di cellule che si retraggono in risposta al trattamento con ephrinA1-Fc è valutata considerando per ciascun trattamento un minimo di 100 cellule (rappresentative di tutto il pozzetto) di morfologia iniziale (t 0') allungata. Ciascuna di queste cellule è contata come retratta se al termine del periodo di osservazione (t 30') ha assunto forma rotondeggiante e/o area totale inferiore almeno al 25% dell'area iniziale.

L'efficacia dei composti in studio è stata quantificata rapportando il numero di cellule rispondenti ad ephrinA1-Fc nei pozzetti trattati con il composto di interesse rispetto al numero di cellule rispondenti ad ephrinA1-Fc nei pozzetti trattati con il solo veicolo.

# RISULTATI

## 1 STANDARDIZZAZIONE DELLA METODICA DI SCREENING

La scelta sul modello sperimentale da adottare per la fase di screening è caduta su un test ELISA tipo sandwich, data la disponibilità sul mercato sia del dimero della frazione extracellulare del recettore EphA2, sia del dimero biotinilato della frazione di ephrinA1 in grado di legare EphA2. In questo modo, incubando il recettore EphA2-Fc su piastre ELISA high binding, è possibile quantificare il legame del ligando ephrinA1-Fc biotinilato mediante l'utilizzo di streptavidina-HRP e grazie allo sviluppo di colore con opportuno substrato (TMB nel nostro caso).

Una volta deciso il modello sperimentale è stato necessario standardizzarlo analizzando alcuni parametri fondamentali quali:

- L'intervallo di concentrazioni di legame di ephrinA1-Fc biotinilata con EphA2-Fc.
- Time course.
- Concentrazione di EphA2-Fc da piastrare.
- Specificità del legame tra ephrinA1-Fc biotinilata ed EphA2-Fc.

### 1.1 CONCENTRAZIONI DI LEGAME

L'intervallo di concentrazioni entro cui si risolve la curva di legame tra ephrinA1-Fc biotinilata e EphA2-Fc ectodomain è compresa tra 1ng/ml e 2000ng/ml come si può apprezzare dalla curva mostrata nel grafico sottostante (figura 10).

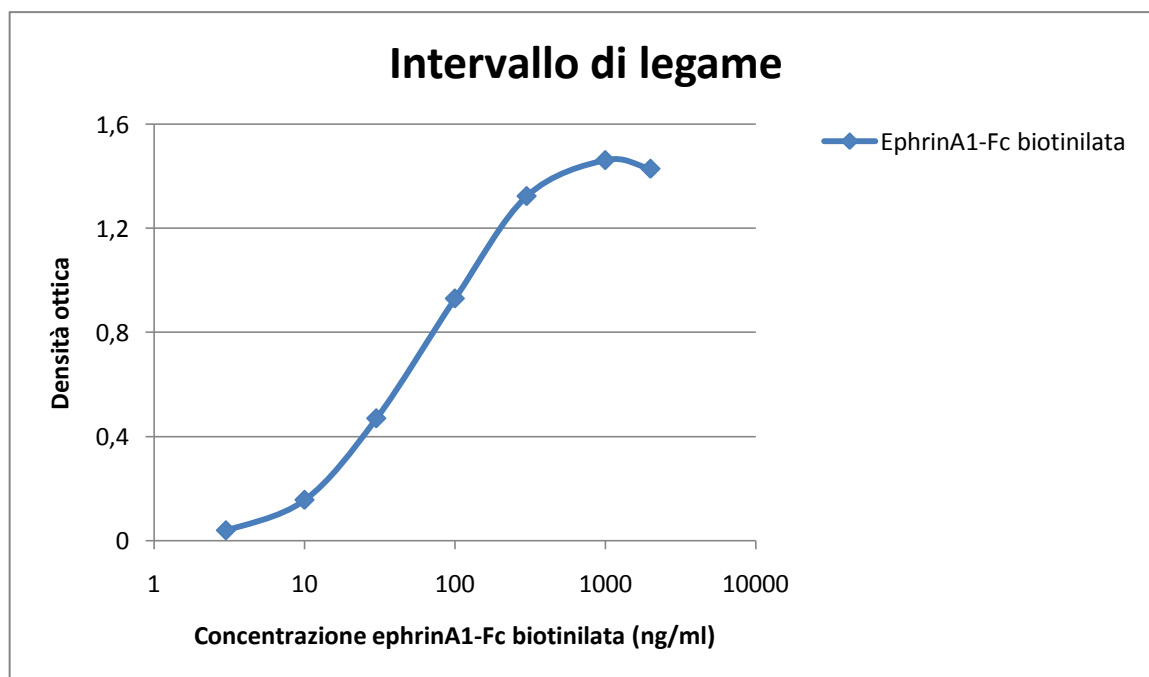


Figura 10: Intervallo di legame tra ephrinA1-Fc biotinilata ed EphA2-Fc ectodomain.

## 1.2 TIME COURSE

Una volta determinato l'intervallo di concentrazioni di legame tra ephrinA1-Fc biotinilata e EphA2-Fc ectodomain è stato condotto uno studio volto ad ottimizzare i tempi di incubazione tra ligando e recettore in modo da compiere gli esperimenti successivi in condizioni di equilibrio. Come mostrato nella figura 11, la  $K_D$  di ephrinA1-Fc biotinilata diminuisce all'aumentare dei tempi di incubazione ligando-recettore a temperatura ambiente.

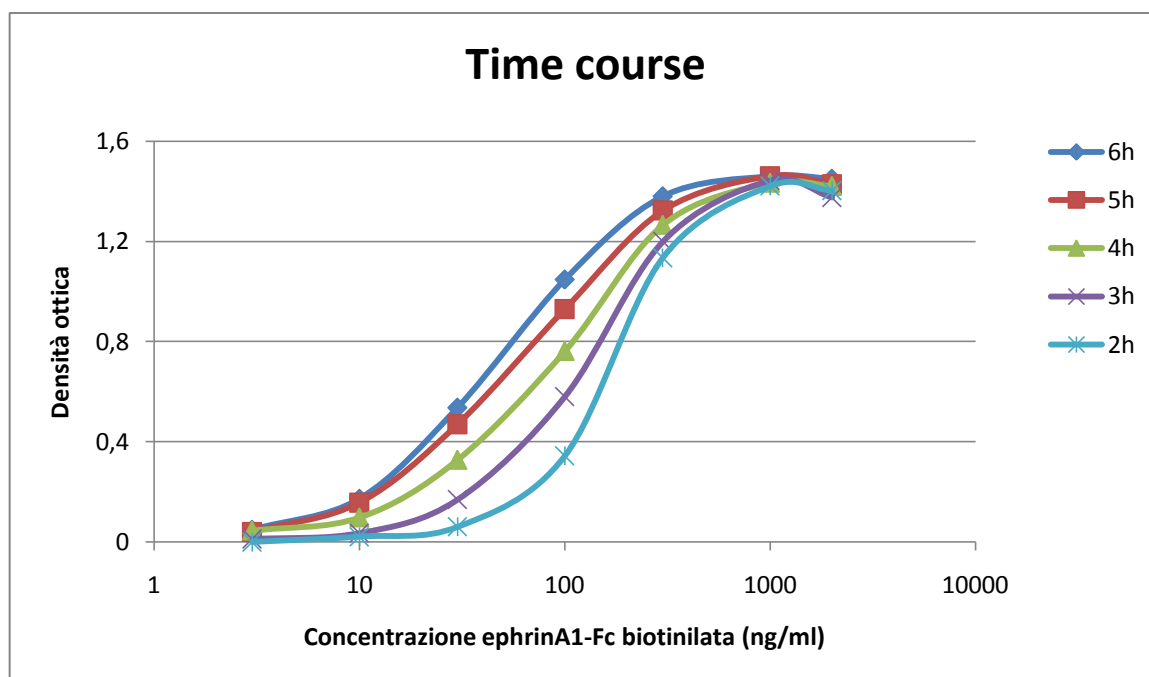


Figura 11: Curve di legame ephrinA1-Fc biotinilata – EphA2-Fc. Time course.

Il raggiungimento dello stato di equilibrio tra ephrinA1-Fc biotinilata e EphA2-Fc ectodomain avviene dopo 5h, in quanto l'ulteriore prolungamento del tempo di incubazione non comporta cambiamenti significativi nella  $K_D$  calcolata (figura 12).

Ore di incubazione	$K_D$ ephrin A1-Fc biotinilata (ng/ml)
2	238
3	159
4	103
5	62,4
6	58,9

Figura 12: Valori di  $K_D$  di ephrinA1-Fc biotinilata ai diversi tempi di incubazione.

### 1.3 CONCENTRAZIONE DI EPHA2-FC DA PIASTRARE

Nella progettazione di un nuovo modello sperimentale va tenuto presente il fattore economico. Nel saggio ELISA adottato in questa sperimentazione, la quantità di EphA2-Fc ectodomain da piastrare per pozzetto incide in modo rilevante sui costi dell'analisi. Al fine di contenere i costi si è quindi individuata la concentrazione minima ottimale di EphA2-Fc da piastrare, costruendo curve di saturazione di ephrinA1-Fc biotinilata in presenza di diverse concentrazioni (0,25-2 $\mu$ g/ml) di EphA2-Fc ectodomain piastrato (figura 13).

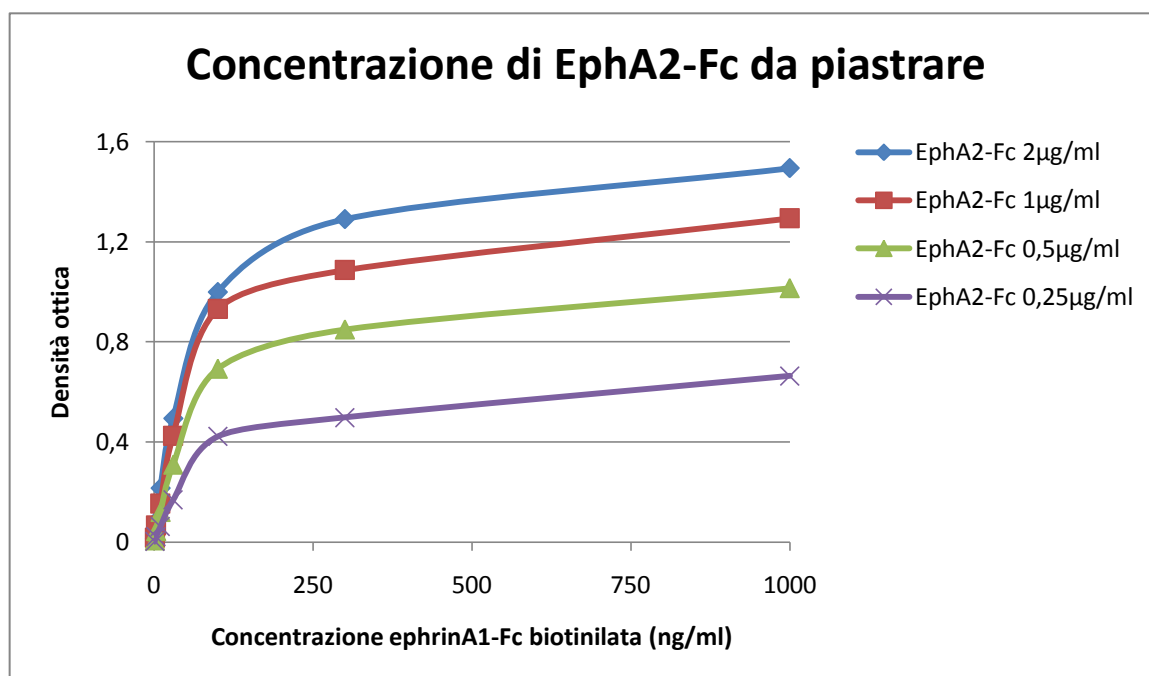


Figura 13: Curve di legame ephrinA1-Fc biotinilata - EphA2-Fc ectodomain.

Poichè le  $K_D$  di ephrinA1-Fc biotinilata erano confrontabili nell'intervallo di concentrazioni di EphA2-Fc ectodomain compreso tra 2 $\mu$ g/ml e 0.5 $\mu$ g/ml (figura 13), è stata scelta come concentrazione d'uso la 1 $\mu$ g/ml, giusto compromesso tra la sensibilità del modello e i costi da sostenere.

EphA2-Fc ectodomain piastrato ( $\mu$ g/ml)	$K_D$ ephrinA1-Fc biotinilata (ng/ml)
0,25	84
0,50	67
1	60
2	62

Figura 14: Valori di  $K_D$  di ephrinA1-Fc biotinilata a diverse concentrazioni di EphA2-Fc ectodomain.

#### 1.4 SPECIFICITÀ DEL LEGAME EPHRINA1-FC BIOTINILATA – EPHA2-FC ECTODOMAIN

Sebbene la forma delle curve di legame di ephrinA1-Fc biotinilata – EphA2-Fc ectodomain e la saturabilità del segnale alle concentrazioni più alte di ligando lasciassero intuire la specificità di binding nel nostro sistema ELISA, questa è stata dimostrata attraverso due esperimenti.

Nel primo, mostrato nella figura 15, la curva di legame di ephrinA1-Fc biotinilata è stata costruita in presenza o assenza di EphA2-Fc ectodomain. Nelle nostre condizioni sperimentali (5 ore di incubazione) ephrinA1-Fc biotinilata non da alcun legame aspecifico alle concentrazioni di utilizzo (1ng/ml – 2000ng/ml) in quanto, in assenza del recettore EphA2-Fc ectodomain, non è in grado di legarsi ai pozzetti piastrati con il solo Fc (1μg/ml).

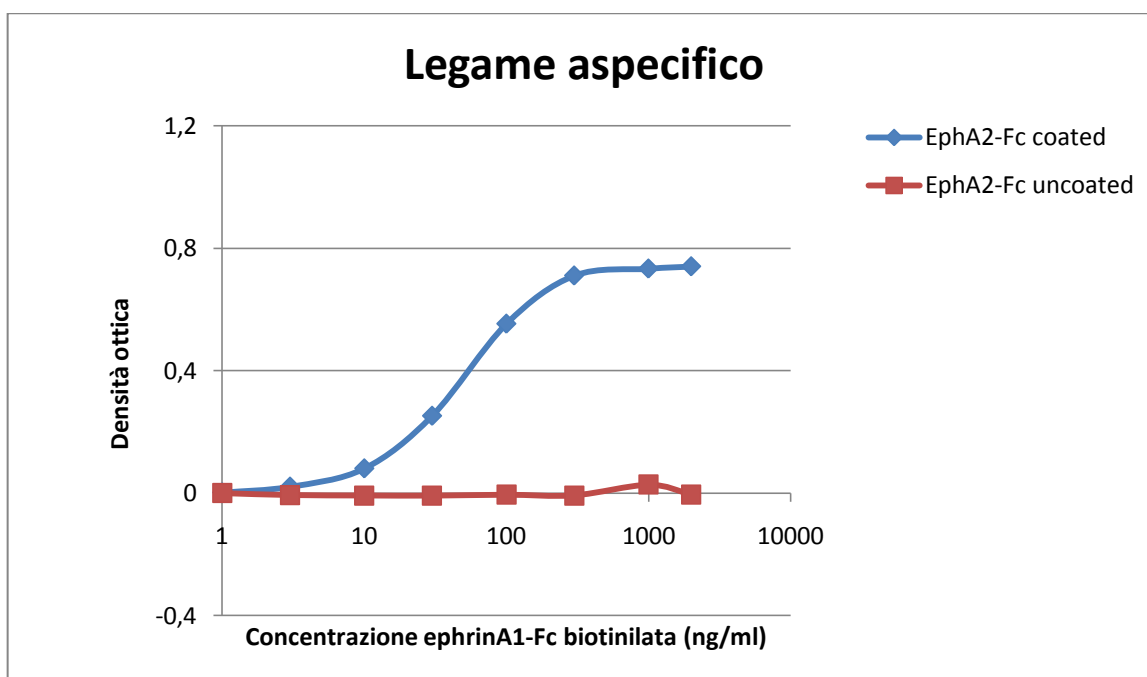


Figura 15: Curve di legame ephrinA1-Fc biotinilata in presenza o assenza di EphA2-Fc ectodomain 1μg/ml.

Nel secondo test invece, sono state costruite curve di legame di ephrinA1-Fc biotinilata al recettore EphA2-Fc (1 $\mu$ g/ml) in presenza di ephrinA1-Fc non biotinilata, impiegata alle concentrazioni di 30ng/ml, 100ng/ml e 300ng/ml. Ciò che si osserva è uno spostamento proporzionale verso destra delle curve di binding senza che vari la risposta massima, indice di competizione competitiva sul sito di legame EphA2-Fc (figura 16).

## Spiazzamento con ephrinA1-Fc non biotinilata

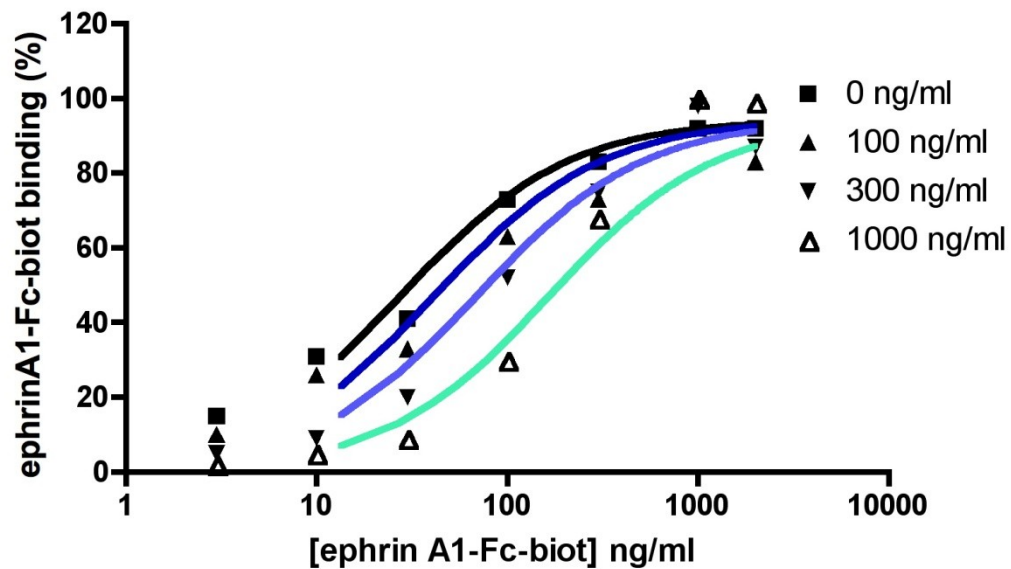


Figura 16: Curve di spiazzamento di ephrinA1-Fc biotinilata da parte di ephrinA1-Fc.

L'elaborazione dei dati ottenuti in questo esperimento mediante analisi di Schild, ha confermato la natura competitiva del legame nel processo di spiazzamento, avendo ottenuto un coefficiente di Hill pari a 1,1977, non significativamente diverso da 1.

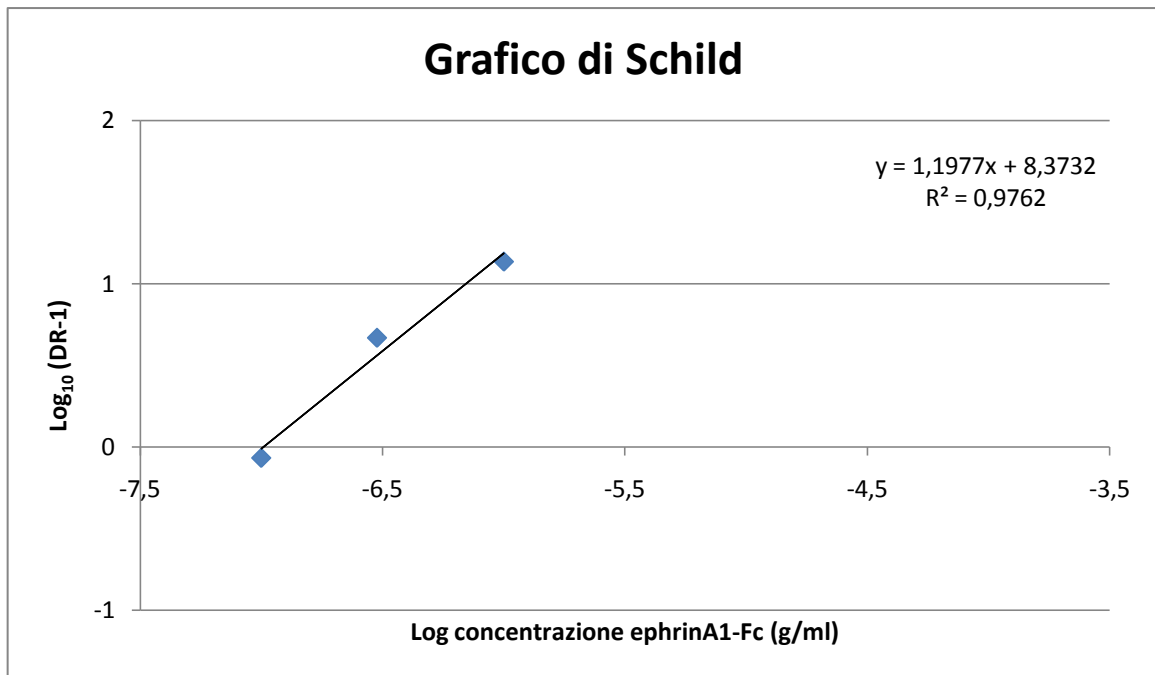


Figura 17: Grafico di Schild e coefficiente di Hill di ephrinA1-Fc.

## 2 FASE DI SCREENING

### 2.1 RIFERIMENTO POSITIVO NEL MODELLO DI SCREENING

Nell'estate del 2008 Noberini e colleghi (148) pubblicarono la scoperta di alcune piccole molecole, derivati dell'acido 4-(2,5-dimetil-1-pirrolil)benzoico, in grado di inibire selettivamente il legame efrinico ai recettori EphA4 ed EphA2. In particolare uno di questi derivati, l'acido 2-idrossi-4-(2,5-dimetil-1-pirrolil)benzoico, qui denominato NOBE C, presentava un valore  $IC_{50}$  di circa  $90\mu M$  nell'inibire il binding tra ephrinA1-Fc ed EphA2-Fc coniugato con fosfatasi alcalina (EphA2 AP). Tale composto voleva essere preso come riferimento positivo nella fase di screening.

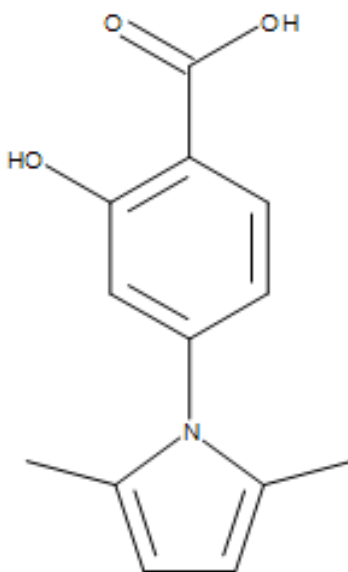


Figura 18: NOBE C.

Per questo si è costruita una curva di spiazzamento di ephrinA1-Fc biotinilata (utilizzata alla concentrazione pari alla sua  $K_D$ ) da EphA2-Fc ectodomain ad opera di concentrazioni crescenti di NOBE C (figura 19).

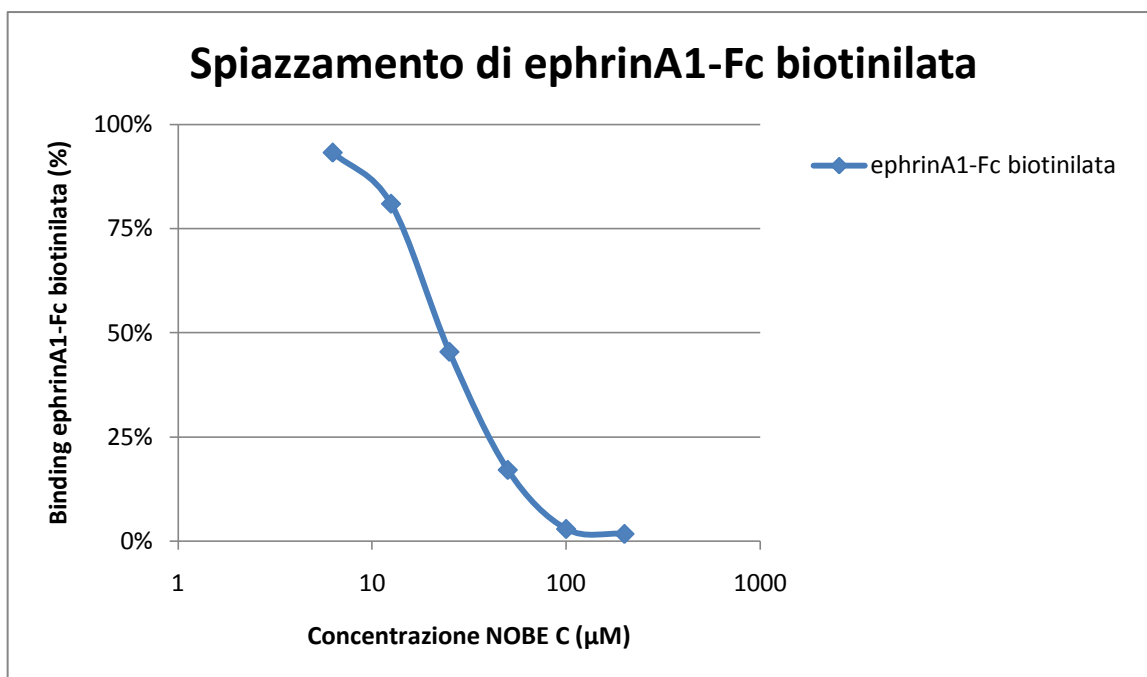


Figura 19: Curva di spiazzamento di ephrinA1-Fc biotinilata (impiegata alla sua  $K_D$ ) da EphA2-Fc ectodomain da parte di NOBE C.

Il risultato ottenuto fu alquanto inatteso sia per il particolare andamento della curva di spiazzamento, sia per l'anomala potenza dello spiazzante di riferimento NOBE C. Infatti, a fronte del convenzionale intervallo di concentrazioni dello spiazzante (circa 2 unità logaritmiche) richieste per ottenere il 100% dello spiazzamento, NOBE C spiazzava ephrinA1-Fc biotinilata con concentrazioni comprese in circa un unità logaritmica generando una sigmoide troppo ripida. Inoltre mostrava un valore di  $IC_{50}$  intorno a  $25\mu\text{M}$  a fronte del  $90\mu\text{M}$  riportato in letteratura.

L'anomalia evidenziata ci spinse a determinare la natura dell'antagonismo di NOBE C attraverso la costruzione di curve di saturazione di ephrinA1-Fc biotinilata in presenza di dosi diverse di NOBE C (figura 20).

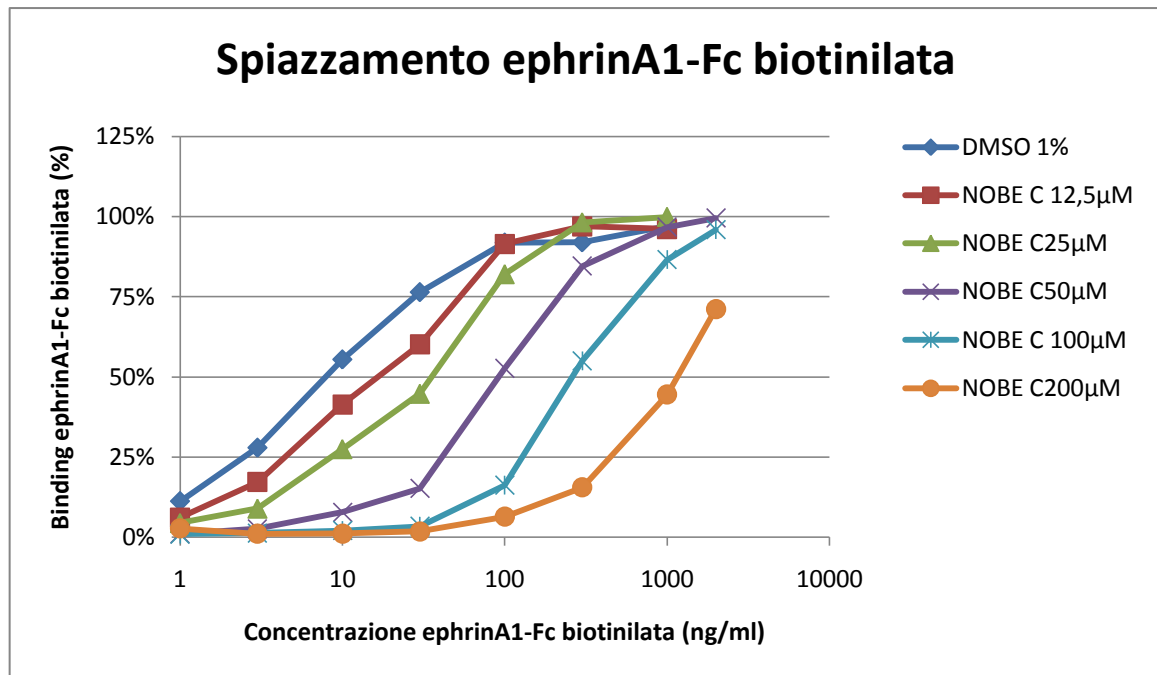


Figura 20: curve di legame ephrinA1-Fc biotinilata – EphA2-Fc ectodomain in presenza di NOBE C.

Dalle  $K_D$  di ephrinA1-Fc biotinilata ottenibili da questo studio di legame fu possibile determinare mediante analisi di Schild il coefficiente di Hill uguale a 2,0347, che evidenziò la natura non competitiva di NOBE C nell'inibire il binding di ephrinA1-Fc biotinilata ad EphA2-Fc ectodomain (figura 21).

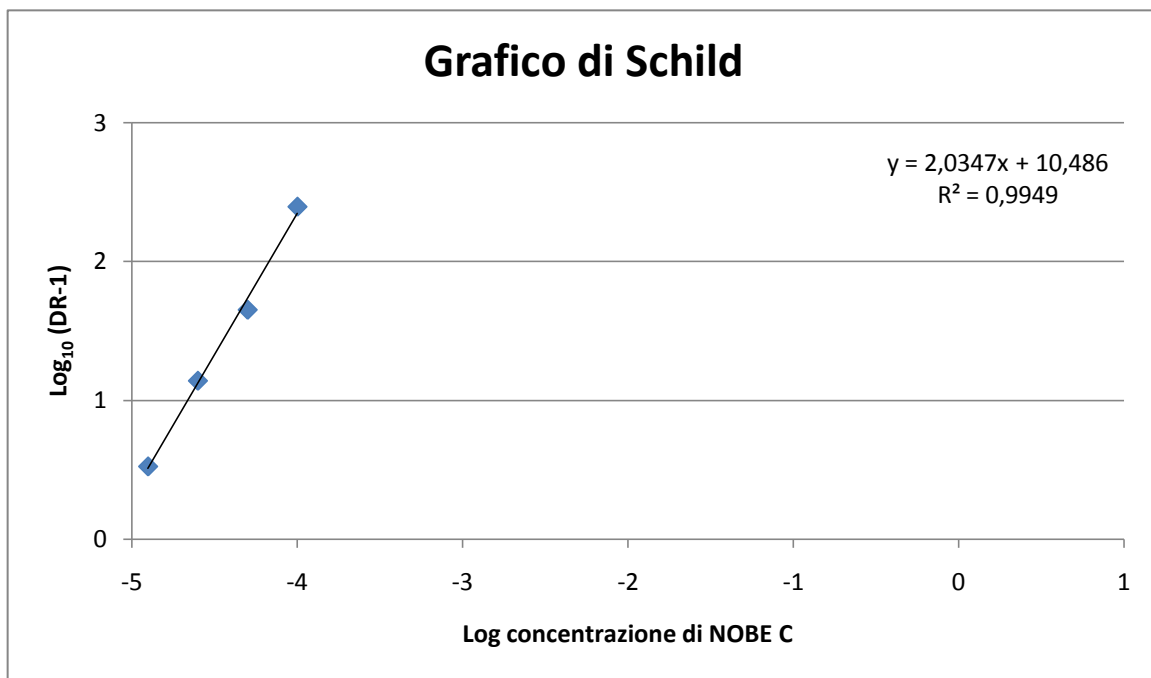


Figura 21: Grafico di Schild e coefficiente di Hill di NOBE C.

Infine, per caratterizzare ulteriormente la natura dell'interferenza di NOBE C con il sistema Eph-ephrin, il composto NOBE C fu incubato per un'ora con il recettore EphA2-Fc, e rimosso dai pozzetti mediante lavaggi con PBS, prima dell'aggiunta di ephrinA1-Fc biotinilata. Il risultato, riassunto nelle figure 22 e 23, evidenziò che il composto NOBE C continuava ad inibire il legame di ephrinA1-Fc biotinilata a EphA2-Fc ectodomain anche in quei pozzetti lavati prima dell'aggiunta di ephrinA1-Fc biotinilata, suggerendo dunque un'interazione con EphA2-Fc di tipo non reversibile.

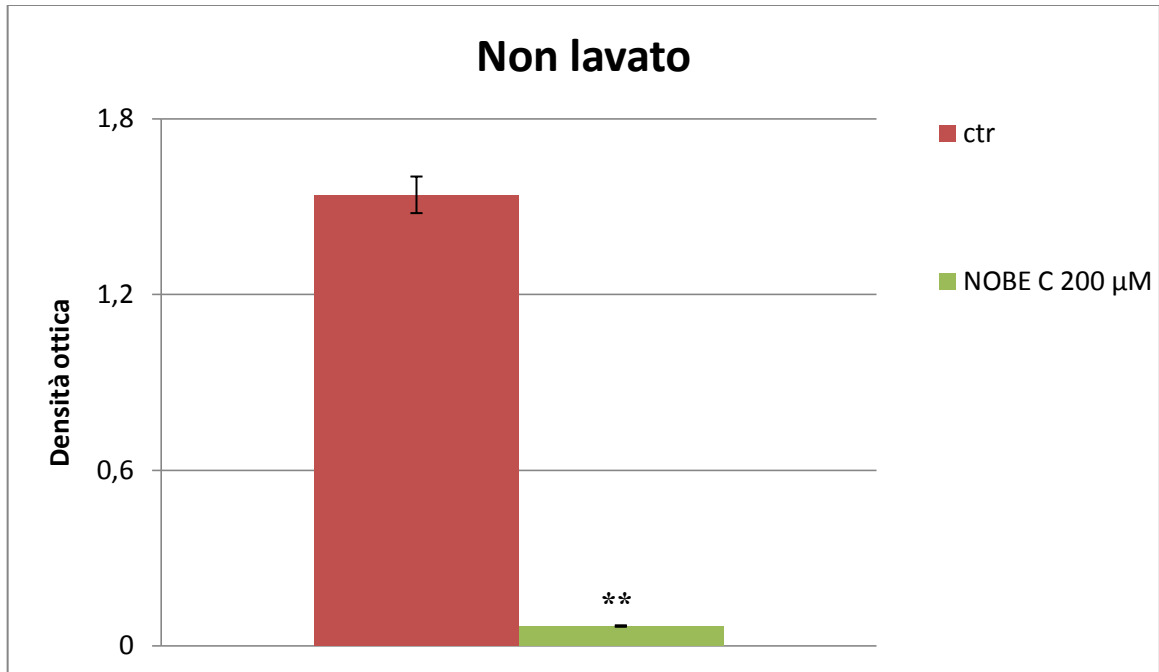


Figura 22: NOBE C inibisce il legame tra EphA2-Fc ectodomain e ephrinA1-Fc biotinilata.

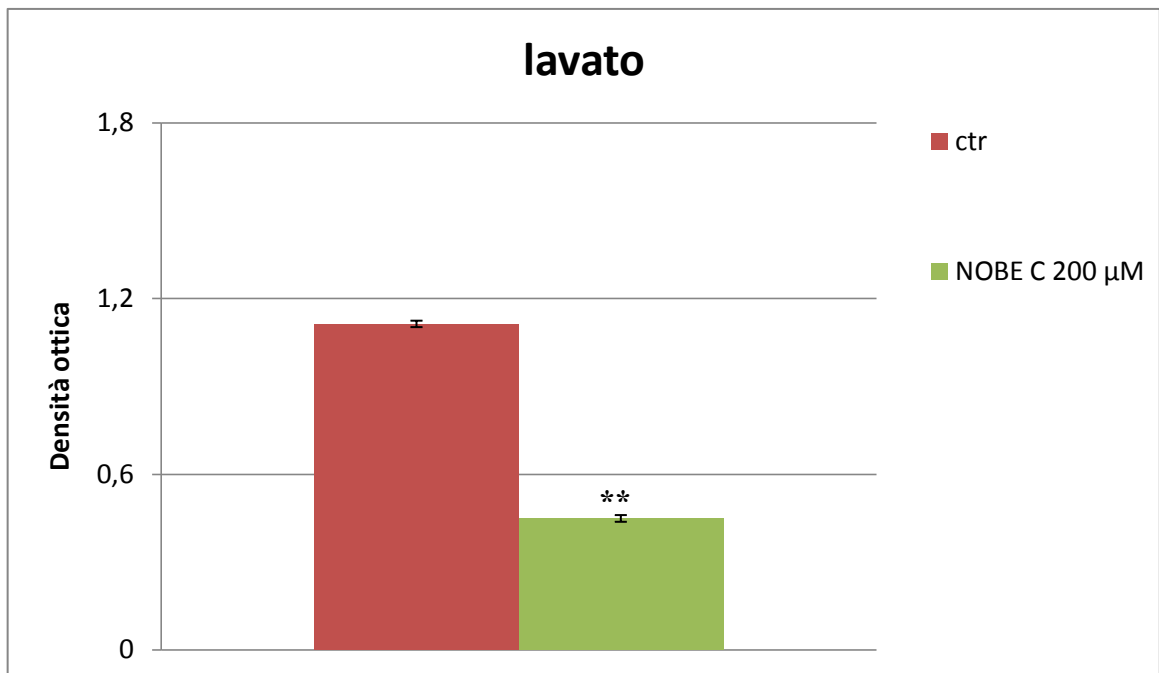


Figura 23: NOBE C lega in maniera non reversibile EphA2-Fc ectodomain.

Curiosamente, l'analisi NMR del composto NOBE C commerciale utilizzato nei test, effettuata in collaborazione con il dipartimento farmaceutico di questa facoltà, coinvolto nel progetto AIRC, rivelò uno spettro NMR, che lasciava presupporre la presenza di molti prodotti di degradazione (figura 24).

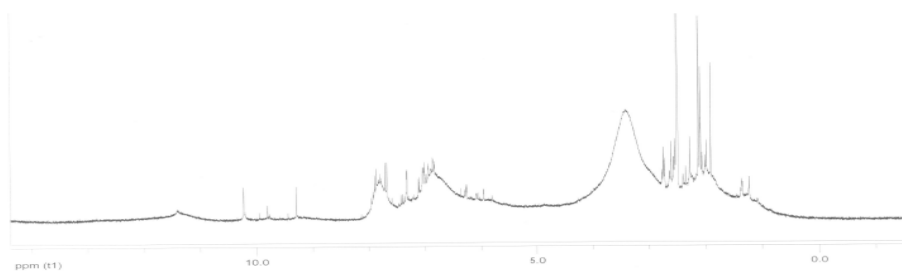


Figura 24: Spettro NMR del composto commerciale NOBE C

Lo studio farmacologico effettuato con il composto sintetizzato ex-novo (NOBE C1), che presentava uno spettro NMR conforme alla sua natura chimica (figura 25), e una corsa in TLC in linea con quella di un composto puro (figura 26), dimostrò che NOBE C1 era totalmente inattivo nell'inibire il binding di ephrinA1-Fc biotinilata ad EphA2-Fc ectodomain (figura 27).

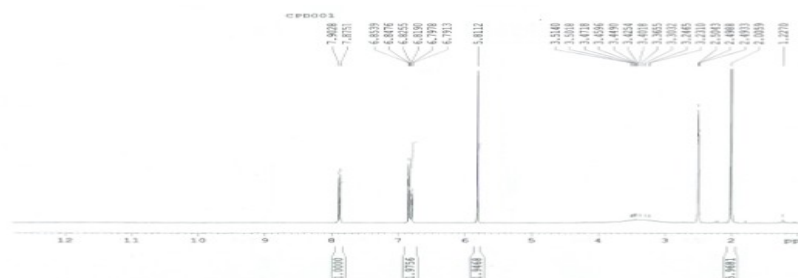


Figura 25: Spettro NMR del composto sintetizzato ex-novo NOBE C1



Figura 26: Analisi TLC comparata tra NOBE C1 (macchia a sinistra) e NOBE C (macchie a destra). Al centro il risultato della corsa di entrambe le sostanze.

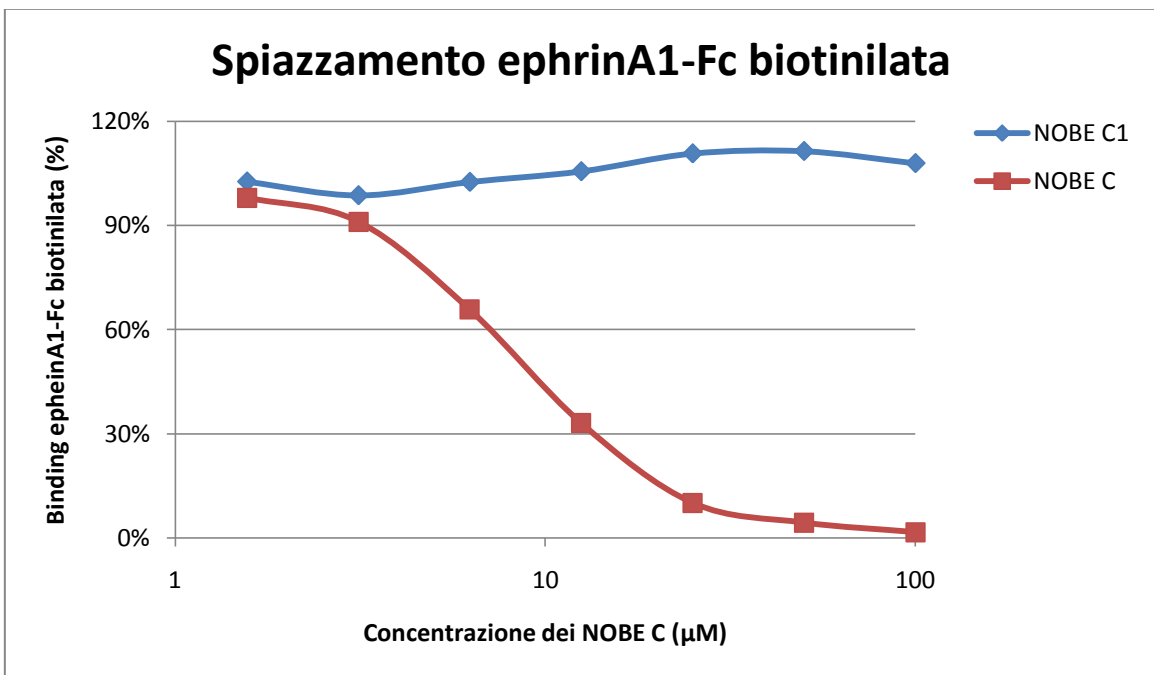


Figura 27: Curve di spiazzamento di ephrinA1-Fc biotinilata (impiegata alla sua  $K_D$ ) da parte di NOBE C e NOBE C1.

Queste osservazioni hanno portato a concludere che l'attività inibitoria nei confronti dell'interazione EphA2-ephrinA1 non è peculiare dell'acido 2-idrossi-4-(2,5-dimetil-1-pirroli)benzoico, bensì è determinata dai suoi prodotti di degradazione, i quali mostrano un'attività aspecifica e di tipo non reversibile. A supporto di queste conclusioni va citata una successiva pubblicazione di Baell e colleghi (149) che inseriva i derivati 1,2,3-araalchilpirrolici, compreso NOBE C, tra le entità chimiche capaci, data la loro instabilità strutturale, di generare falsi positivi in studi di screening. Il nostro lavoro di screening è stato per questo motivo condotto senza l'impiego di un controllo positivo.

## **2.2 SCREENING DI UNA LIBRERIA DI COMPOSTI**

Nella libreria di molecole presa in esame (più di un migliaio) sono stati inclusi anche principi attivi di farmaci convenzionali e molecole endogene bioattive (figura 28). Questa scelta è motivata dal fatto che i principi attivi dei farmaci in commercio hanno già una farmacocinetica ottimizzata e un profilo tossicologico noto, mentre dall'altro canto l'eventuale scoperta di nuove azioni da parte di composti endogeni bioattivi può fornire le basi per nuove investigazioni nel campo fisiopatologico.

Tra tutti i composti testati nello screening iniziale, solamente l'acido litocolico (LCA), è stato in grado di inibire il binding di ephrinA1-Fc biotinilata ad EphA2-Fc ectodomain di almeno il 40% alla dose iniziale di 50 $\mu$ M DMSO 1%.

Acetylsalicylic acid	Clavulanic acid	L-citrulline	Pilocarpine
Acetylthiocholine	Clonidine	Levulinic acid	(+) - Pinorelinol
ADP	Clozapine	L-glutamic acid	Piracetam
Alcian blue	p-Coumarinic acid	L-histidine	Pirenzepine
Alpha fluor methyl histidine	Creatinine phosphate	Lidocaine	Potassium methane sulfonate
alpha-Bisabolol	Cromolyn	Linalool	Prazosin
Aminguanidine bicarbonate	Daidzein	Lithocholic acid	Procaine
Aminguanidine hydroxy chloride	Damascone	L-Tartaric acid	Proglumide
4-aminobutyric acid	Deoxycholic acid	L-Tyrosine	Promethazine
5-Aminovaleric acid	2-Deoxyglucose	Luminol	Propranolol
4-Aminopyridine	Dexamethasone	Luteolin	Purpurogallin
Antipyrine	DF 545	Malic acid	Pyrilamine
2-APB	DF 594	D-Mannitol	Pyrogallallic acid
Arginine	Diazepam	D(+)-Melezitose	Quercetin
Ascorbic acid	Dimaprit	Methocramine	Ranitidine
Atenolol	2,3-Dimethylindole	Methyl histamine	Ranitidine hydroxy chloride
ATP	Donepezil hydroxy chloride	2-methyl-5-HT	Reserpine
Atropine	2,2-diphenyl-1-pyrcilhydrazyl	Methyl orange	RP 73401
Avertin	Dopamine	methylene blue	Rutin
7-Azaindole	DPCPX	3-methylindole	Salbutamol
Azathioprine	DPPH	4-Methylumbelliferone	Salicylic acid
Azelaic-acid	EDTA	Methysergide	Serotonin
Benzenesulfonamide	EGTA	Metamide	Sinapinic acid
Benzisothiazol	(-)-Epicatechin	Myristic acid	Impromidine
Beta-escin	(+)-Epicatechin	NAD	Sodium borate
Beta-Gentiobiose	Epinephrine	Naloxone hydroxy chloride	Sodium nitroprussiate
Bethanecol	Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine	Naphazoline	Sodium taurocholate
Betulinol	Eugenol	Naringin	Spinaceamin
Borneol	Famotidine	Nerol	Streptomycin
Bromophenol blue	Ferulic acid	Nesosteine	Suberic acid
Burimamide	Gallic acid	Nifedipine	Sulglycotide
Buspiron	Genistein	n-isopropyl epinephrine	Sulphanilamide
2,3-Butanedione monoxime	Geraniol	Nitrobenzylthioinosin	Sulphanilic acid
Caffeic acid	Gibberellic acid	Nitrotetrazolium blue chloride	Sulpiride
Caffeine	Guanethidine	Nw-nitro-L-arginine-methyl ester	Suramin
Carbamoylcholine chloride	Hesperidin	1-Octacosanol	Sylmarin
Carbenoxolone	Hexamethonium	Octatropine methylbromide	Tacrine
Carvacrol	Histamine	Orthovanadate	Theobromine
(-)-trans-Caryophyllene	3-Hydroxytyramine hydrochloride	Oxlate Calcium	Theophylline
Chenodeoxycolic acid	HTAB	Oxmetidine	Thidiazuron
1-(2-chlorophenyl)-3-(dimethylamino)-1-phenyl-prapan-1-ol	Hypoxanthine	Oxybutynin hydrochloride	Thiobarbituric acid
Chlorpheniramine	Ibuprofen	Papaverine hydrochloride	Thiopramide
Chlor-trimeton maleate	Imidazole	Paracetamol	Thymol
Cholestan	Imipramine	para-Nitrophenylphosphate	Tiotidine
5-alpha-Cholestan-3-beta-ol	Indigo carmine	Pelargonaldehyde	Trehalose
Cholesterol	Indole	Phenazine methosulfate	Tripelennamine
Cholic acid	Indomethacin	Phenolphthalein	Tyramine
Choline chloride	Inositol	S(+)-N6-(2-phenyl-isopropyl)adenosine	Ursodeoxycholic acid
Cimetidine	Ipratropine	Phenylbutazone	Valeraldehyde
Cinnamaldehyde	Isoprotenerol	Phenylephrine hydrochloride	Verapamil
Cinnamic acid	Kanamycin sulfate	2-Phenylindole	Xylitol
Citric acid	Ketanserine	Physostigmine	Yohimbine

Figura 28: Tabella dei principi attivi e delle molecole endogene bioattive testate

### 2.3 CARATTERIZZAZIONE FARMACOLOGICA DELL'ACIDO LITOCOLICO

Per la determinazione della  $IC_{50}$  di LCA si è costruita una curva di spiazzamento di ephrinA1-Fc biotinilata dal recettore EphA2-Fc in presenza di dosi crescenti di LCA (figura 29). La  $IC_{50}$  calcolata è stata di  $57\mu M$  ( $pIC_{50} = 4,24 \pm 0,068$ ).

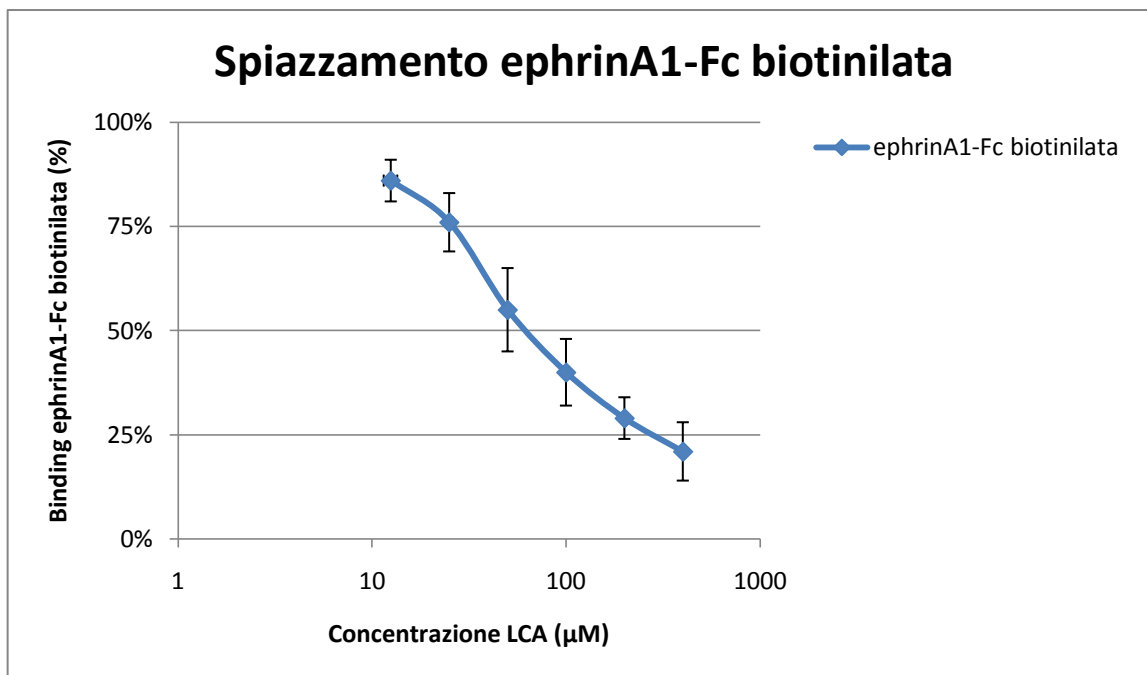


Figura 29: Curva di spiazzamento di ephrinA1-Fc biotinilata (impiegata alla sua  $K_D$ ) da parte di LCA.

Lo stesso esperimento è stato poi ripetuto testando nella stessa piastra LCA e gli altri acidi biliari naturali principali, ossia l'acido colico (CA), l'acido chenodesossicolico (CDCA) e l'acido desossicolico (DCA), caratterizzati da minime modificazioni strutturali rispetto ad LCA.

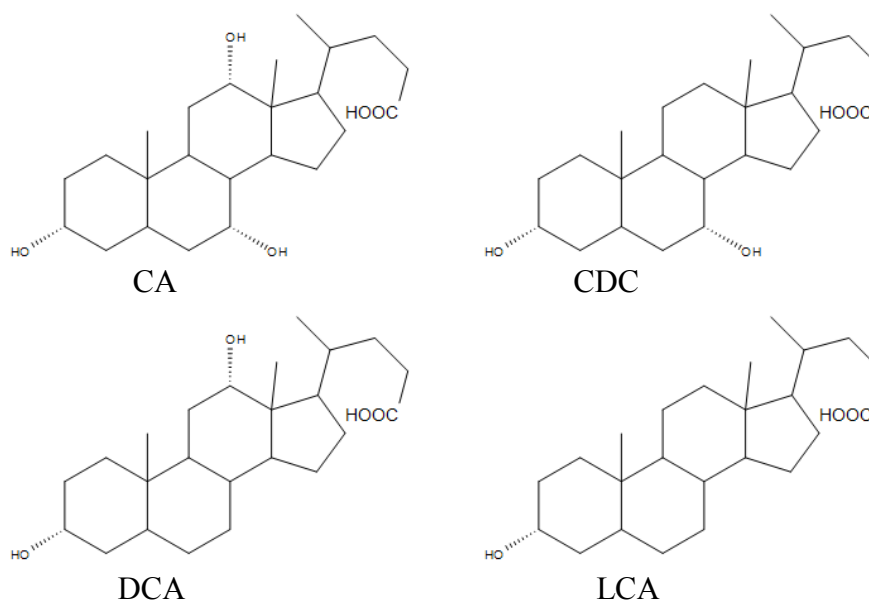


Figura 30: Strutture acidi biliari naturali.

Come si può apprezzare dal grafico sotto rappresentato nessuno degli altri acidi biliari naturali è stato in grado di ridurre il legame di ephrinA1-Fc biotinilata ad EphA2-Fc ectodomain fino alla dose di 400µM (figura 31).

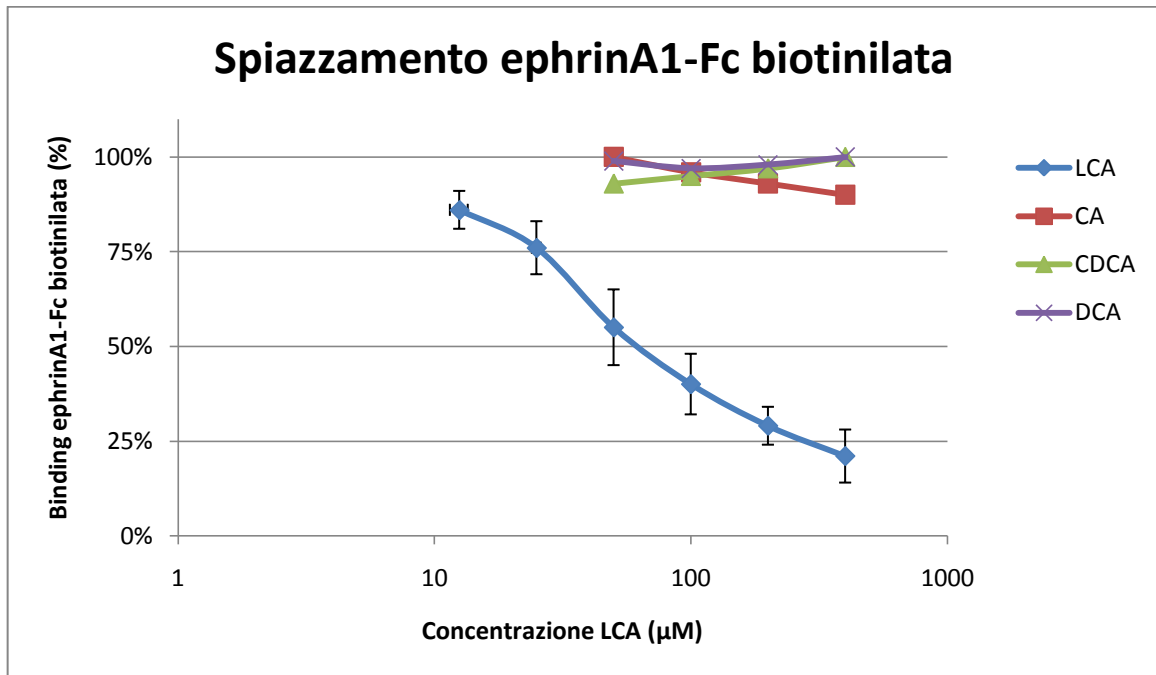


Figura 31: Curve di spiazzamento di ephrinA1-Fc biotinilata (impiegata alla sua  $K_D$ ) da parte degli acidi biliari naturali.

Al fine di valutare la natura di questa inibizione sono state costruite curve di saturazione di legame di ephrinA1-Fc biotinilata – EphA2-Fc ectodomain in presenza di concentrazioni crescenti di LCA (figura 32).

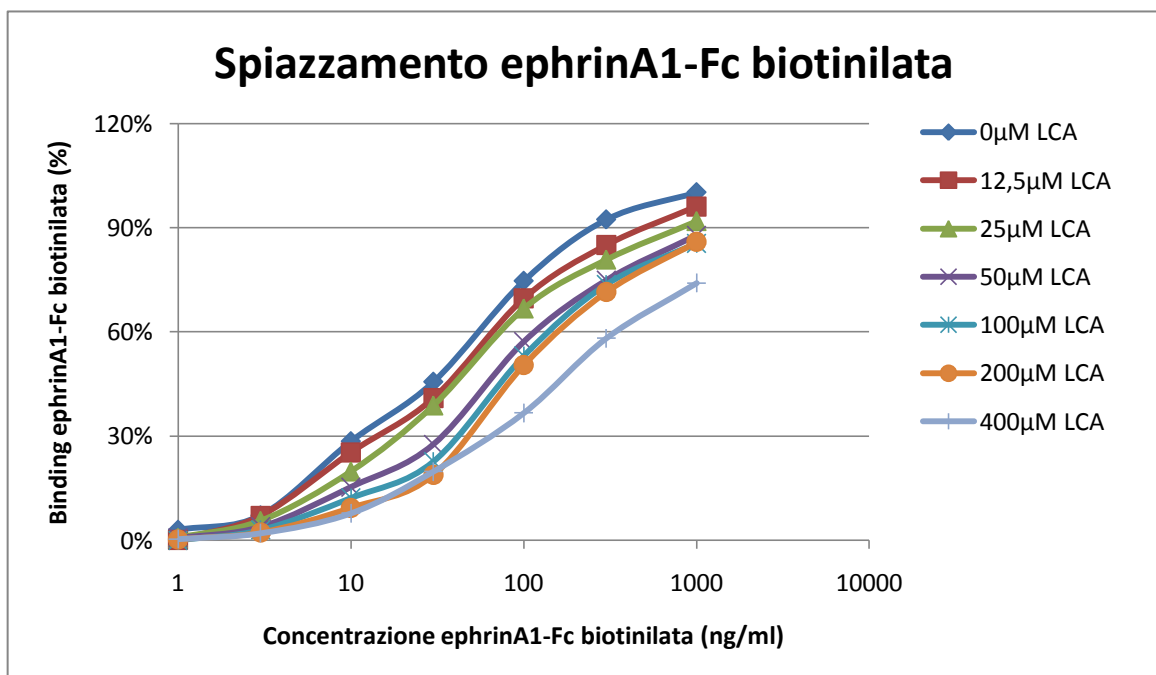


Figura 32: Curve di legame ephrinA1-Fc biotinilata – EphA2-Fc ectodomain in presenza di LCA.

Dopo aver calcolato la  $K_D$  o la  $K_D$  apparente di ephrinA1-Fc biotinilata in ciascuna curva di legame si è proceduto all'analisi di Schild, dove il  $\log[DR-1]$  è la variabile dipendente in funzione del logaritmo negativo della concentrazione di inibitore impiegata (figura 32). L'analisi di regressione lineare dei punti ottenuti è risultata essere ben interpolata ( $R^2 = 0,9664$ ) e con una pendenza (coefficiente di Hill) pari ad 0,8618, non significativamente diversa da 1 e quindi indice di una competizione competitiva. La  $pK_i$  calcolata, risultante dall'intersezione con l'asse delle ascisse della retta interpolata, è risultata essere uguale a  $4,31 \pm 0,03$ , corrispondente ad una  $K_i$  di  $49\mu M$ .

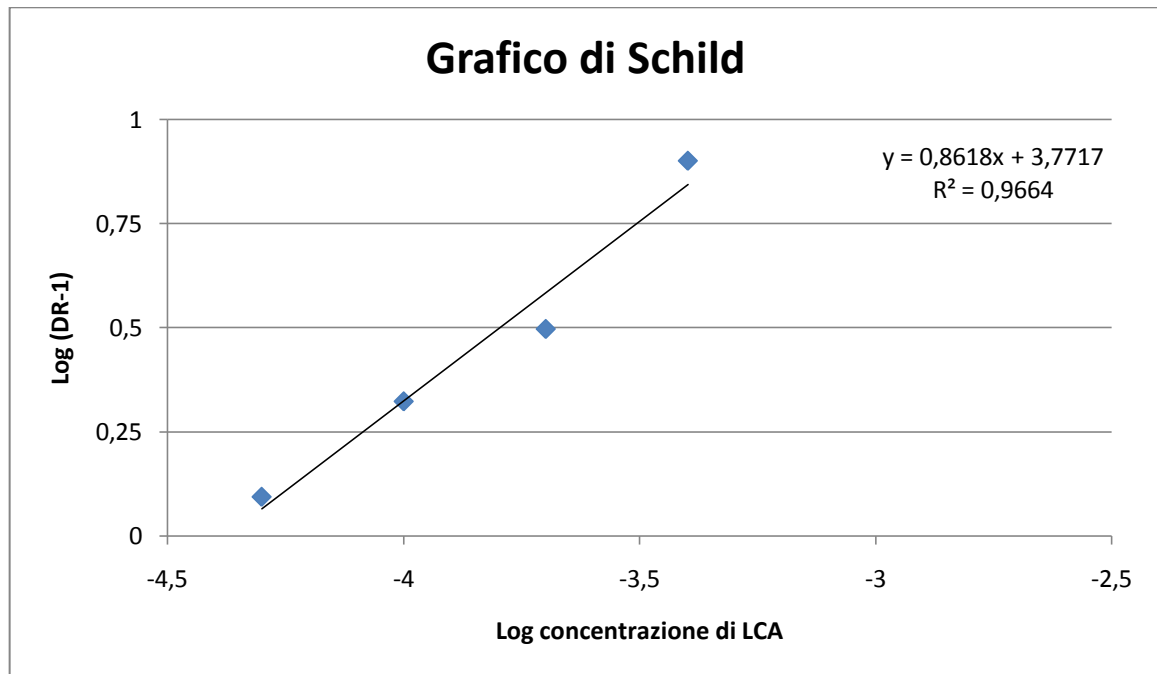


Figura 33: Grafico di Schild e coefficiente di Hill di LCA.

Al fine di determinare la reversibilità del legame di LCA a EphA2-Fc ectodomain, LCA è stato incubato alla dose di 200 $\mu$ M e successivamente rimosso mediante lavaggio, prima dell'aggiunta di ephrinA1-Fc biotinilata. Il test ha rivelato che solo in assenza del lavaggio LCA era ancora in grado di inibire il legame tra EphA2-Fc ectodomain e ephrinA1-Fc biotinilata, suggerendo che l'interazione di LCA con EphA2-Fc ectodomain non è irreversibile. (figure 34 e 35).

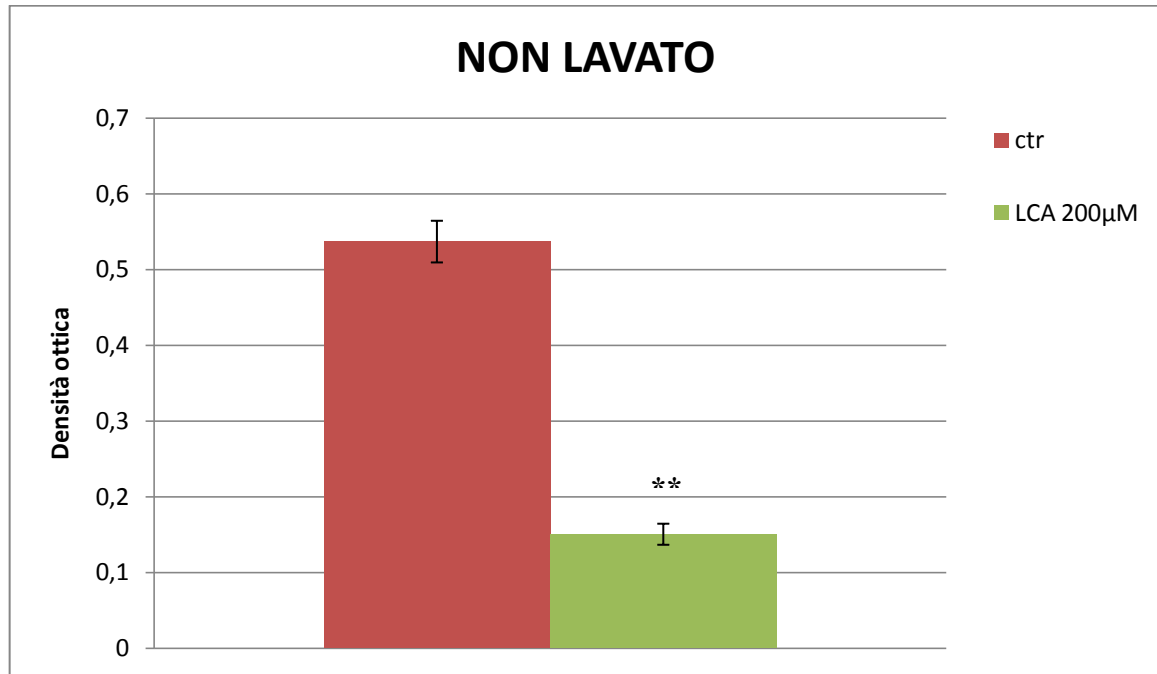


Figura 34: LCA inibisce il legame tra EphA2-Fc ectodomain ed ephrinA1-Fc biotinilata.

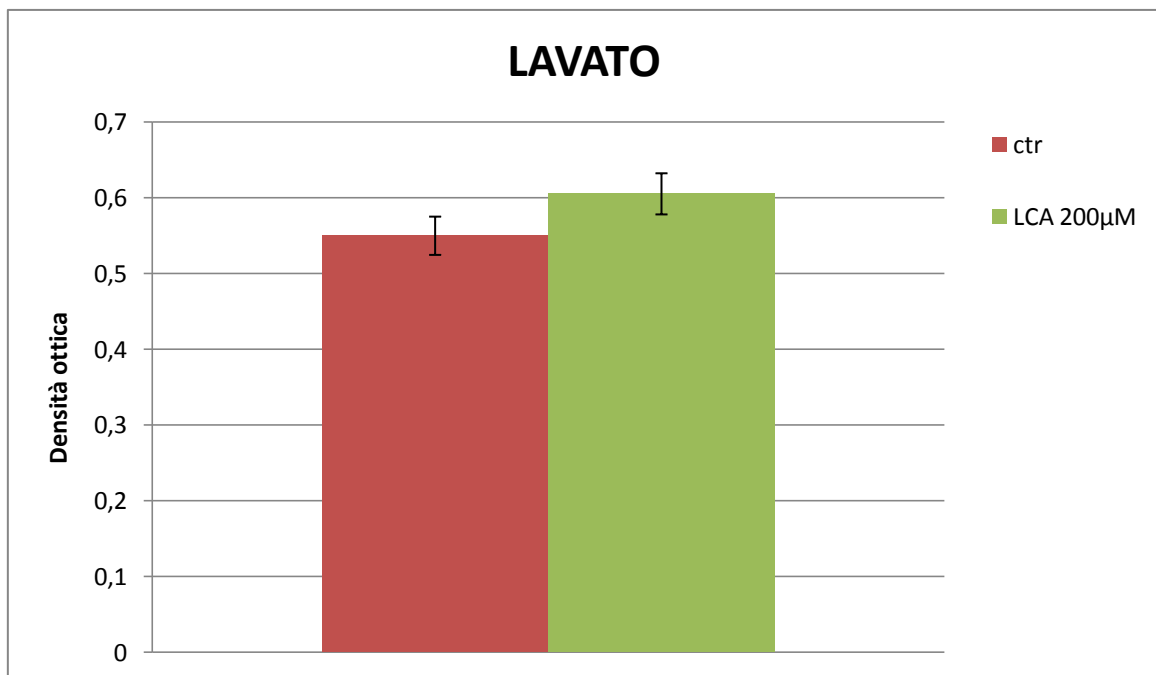


Figura 35: LCA non lega in maniera irreversibile EphA2-Fc ectodomain.

A questo punto si è valutata la selettività di binding di LCA all'interno del sistema efrinico testando questa molecola contro i recettori EphA (A1-A8) ed EphB (B1-B4) utilizzando rispettivamente ephrinA1-Fc biotinilata ed ephrinB1-Fc biotinilata a concentrazioni pari ai rispettivi valori di  $K_D$  ottenuti nel nostro modello. Come si può apprezzare dai grafici sotto riportati, LCA mostra di essere un ligando promiscuo delle sottofamiglie recettoriali EphA e EphB, suggerendo quindi un meccanismo comune di interferenza nel legame Eph-ephrin (figure 36 e 37).

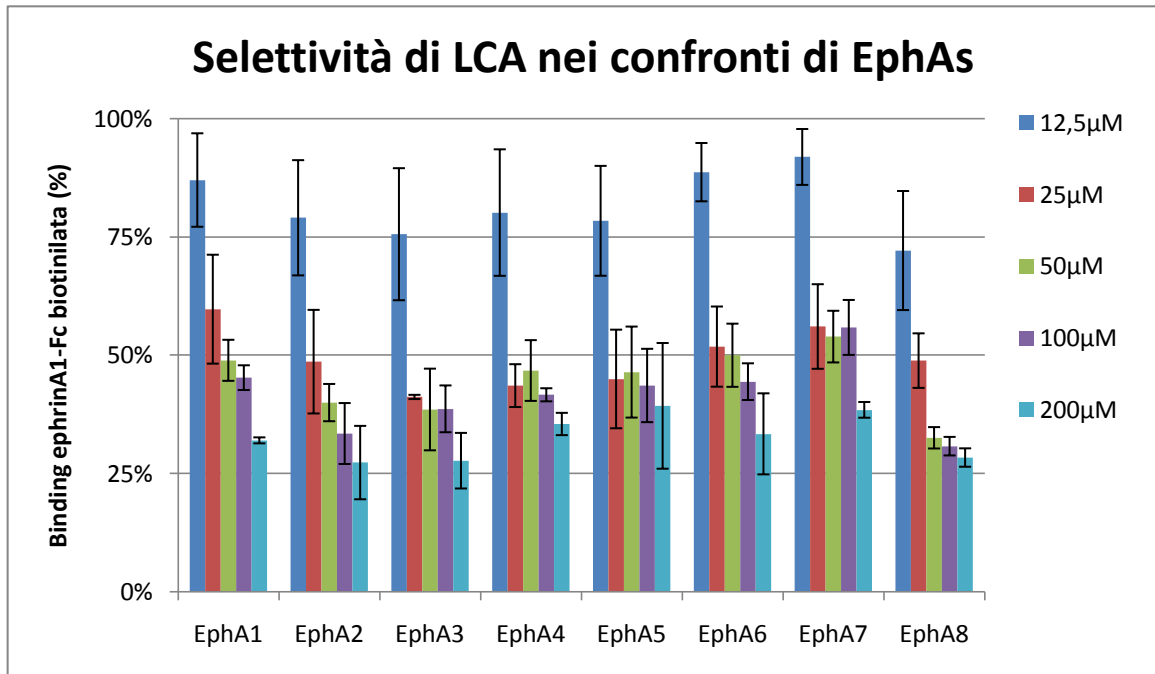


Figura 36: Selettività di LCA nei confronti dei recettori EphA.

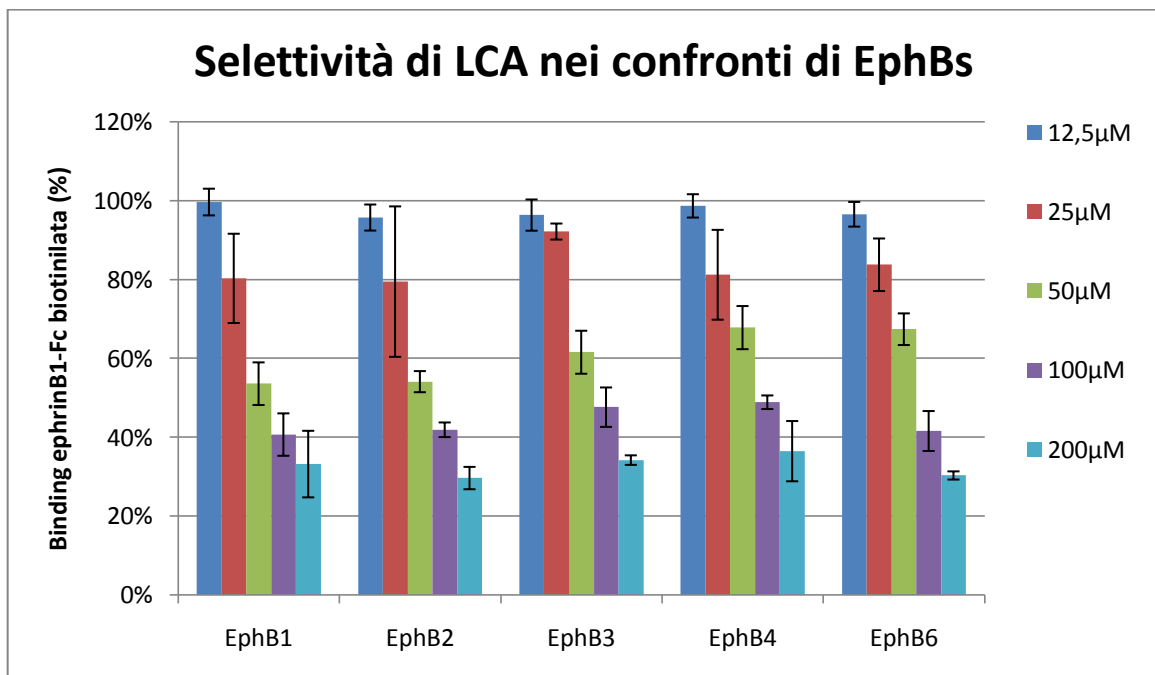


Figura 37: Selettività di LCA nei confronti dei recettori EphB.

Infine dal modello originale di test “cell free” si è passati ad un altro esperimento di binding condotto su cellule PC3 esprimenti il recettore EphA2 (150). In particolare le piastre ELISA high binding sono state incubate con ephrinA1-Fc per poi valutare se LCA fosse in grado di prevenire il legame del recettore EphA2 espresso naturalmente sulle PC3. Come si può apprezzare dal grafico sotto riportato anche in queste condizioni, se pur a concentrazioni più elevate di quelle registrate nel sistema acellulare, LCA è in grado di inibire in modo concentrazione dipendente il binding tra EphA2 cellulare ed ephrinA1-Fc adeso alla piastra. In questo esperimento EphA2-Fc ed ephrinA1-Fc sono stati presi come controlli positivi (figura 38).

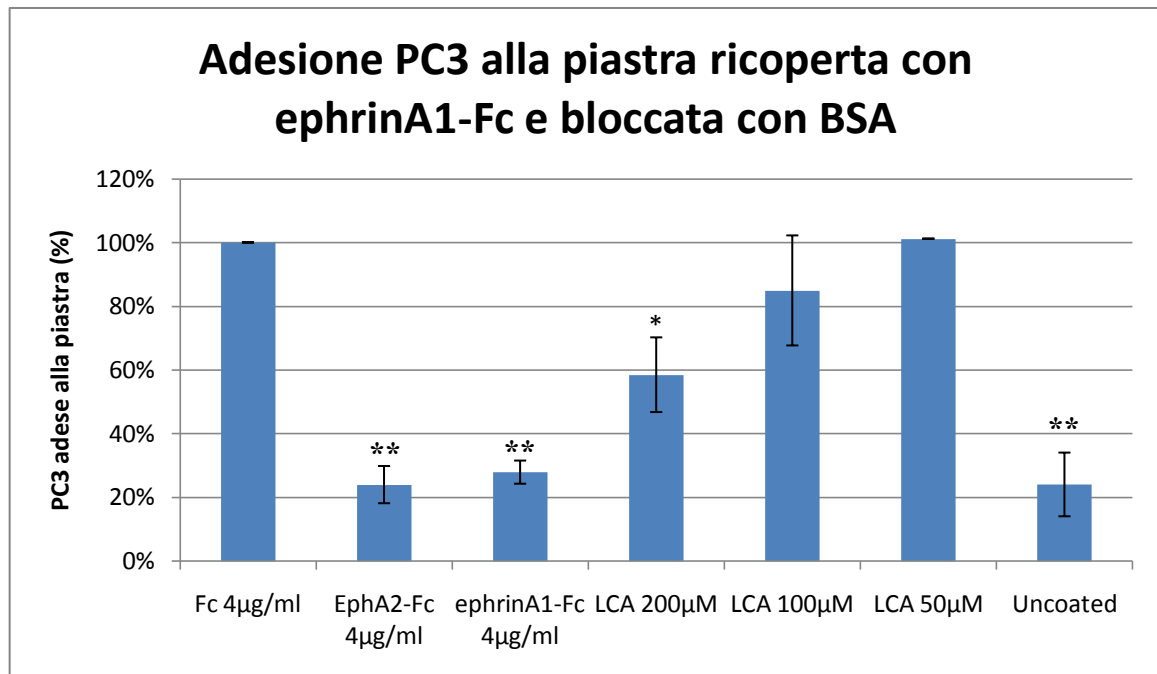


Figura 38: Inibizione del legame ephrinA1-Fc - EphA2 cellulare.

La specificità dell'interazione di LCA con il sistema efrinico in questo modello sperimentale è sottolineata dal fatto che LCA non è in grado di inibire l'adesione delle cellule PC3 alla piastra non ricoperta con ephrinA1-Fc e non bloccata con BSA, condizione questa, in cui il processo di adesione è mediato da fattori indipendenti dall'interazione tra ephrinA1-Fc ed EphA2 cellulare (figura 39).

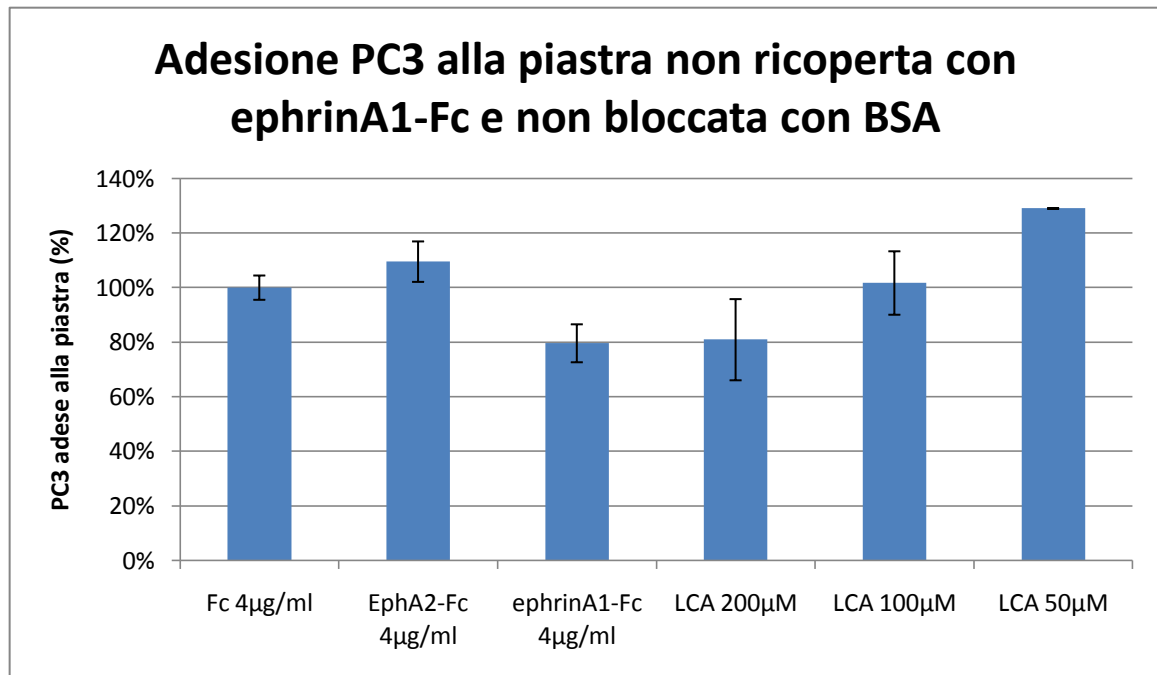


Figura 39: Inibizione dell'adesione delle PC3 alla piastra.

Al fine di valutare la natura agonista o antagonista di LCA si è ricorsi a studi funzionali. In questi esperimenti sono state impiegate cellule di adenocarcinoma prostatico PC3 e cellule di adenocarcinoma di colon HT-29 perché esprimenti naturalmente il recettore EphA2 (150, 151) (figura 40). Inoltre le PC3 sono un modello classico per lo studio del sistema efrinico, mentre le HT-29 sono comunemente usate negli studi riguardanti gli acidi biliari (152).

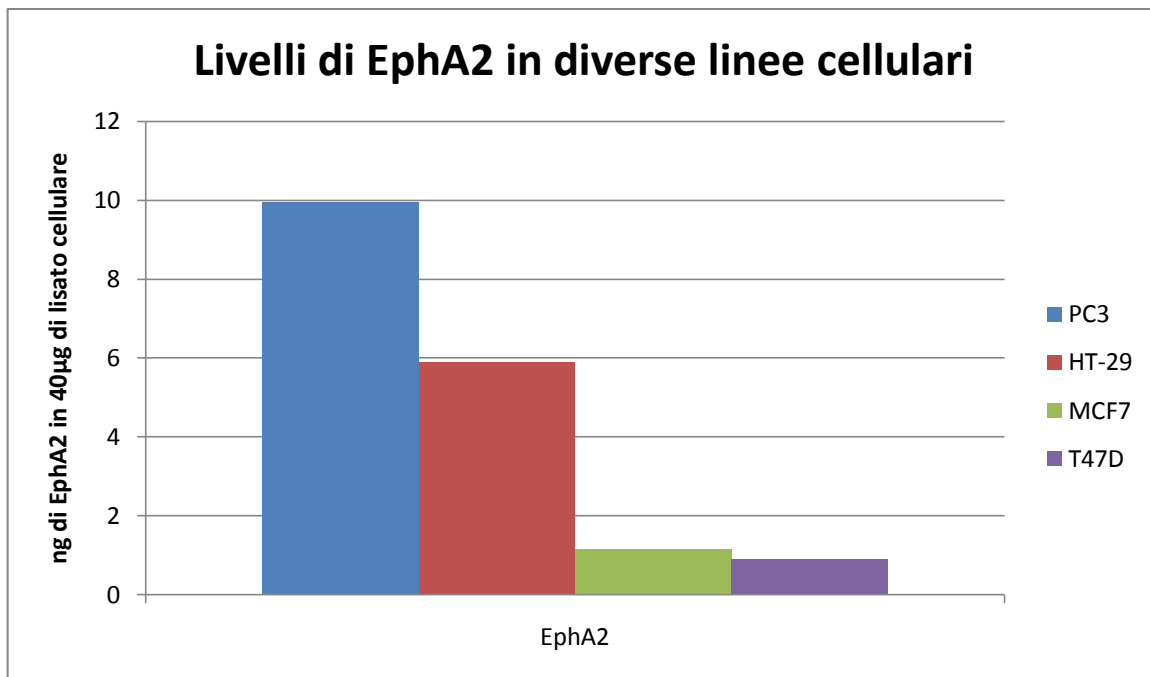


Figura 40: Livelli di EphA2 in diverse linee cellulari quantificati mediante saggio ELISA.

In questi studi abbiamo stimolato la fosforilazione del recettore EphA2 espresso nelle linee cellulari PC3 o HT-29 con ephrinA1-Fc 0,25µg/ml in presenza degli acidi biliari o del solo veicolo (DMSO 1%). Il Dasatinib, inibitore multichinasico, è impiegato come farmaco di riferimento in quanto composto molto potente nell'inibire anche l'attività chinasi di EphA2 (135, 136). Consistentemente con gli studi di legame condotti in precedenza CA, CDCA e DCA sono risultati essere completamente inattivi sia quando impiegati come agonisti (figura 41) sia quando testati come antagonisti (figura 42) alla dose di 100µM su entrambe le linee cellulari.

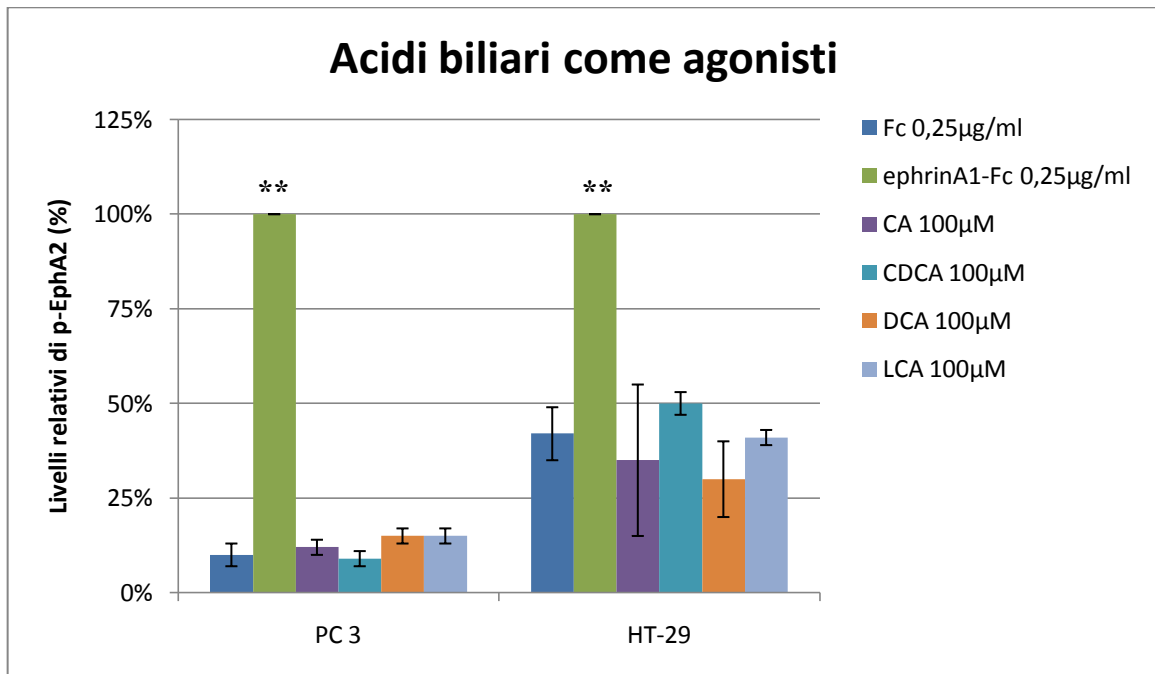


Figura 41: Acidi biliari come agonisti del recettore EphA2.

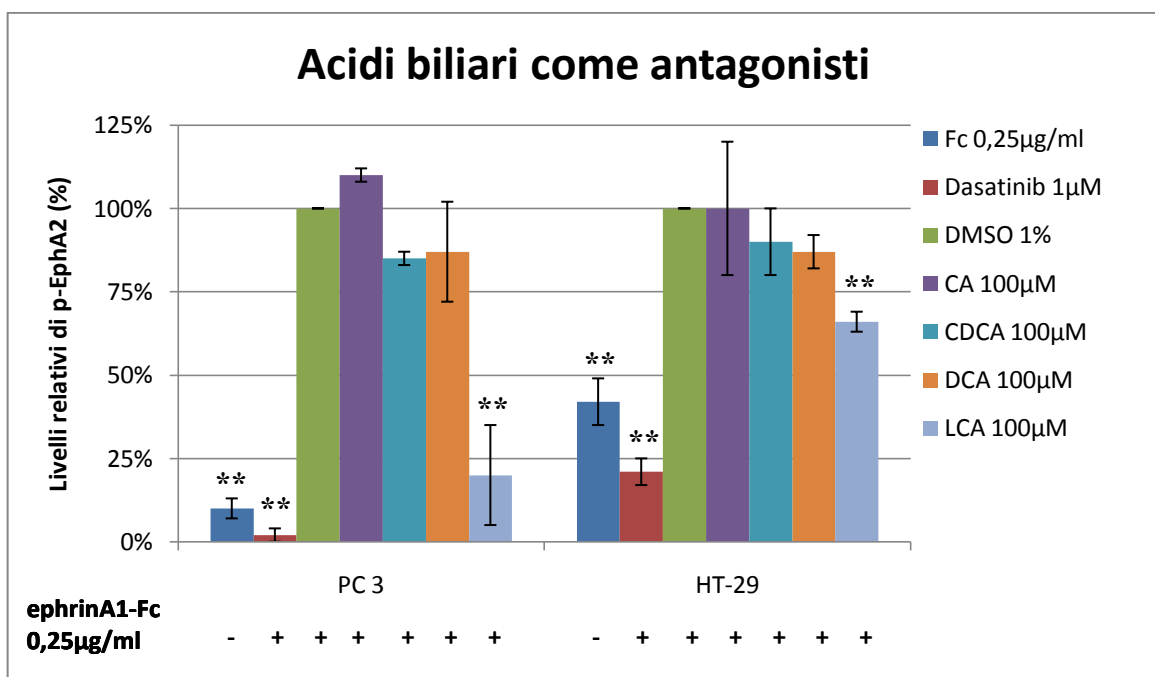


Figura 42: Acidi biliari come antagonisti del recettore EphA2.

Al contrario, LCA, incapace di attivare il recettore EphA2 espresso nelle due linee cellulari (figura 41), è in grado di inibire la fosforilazione di EphA2 mediata da ephrinA1-Fc in entrambe le linee cellulari in maniera dose dipendente (Figura 43) e a dosi non citotossiche, come dimostrato dal saggio di vitalità cellulare con MTT (figura 44).

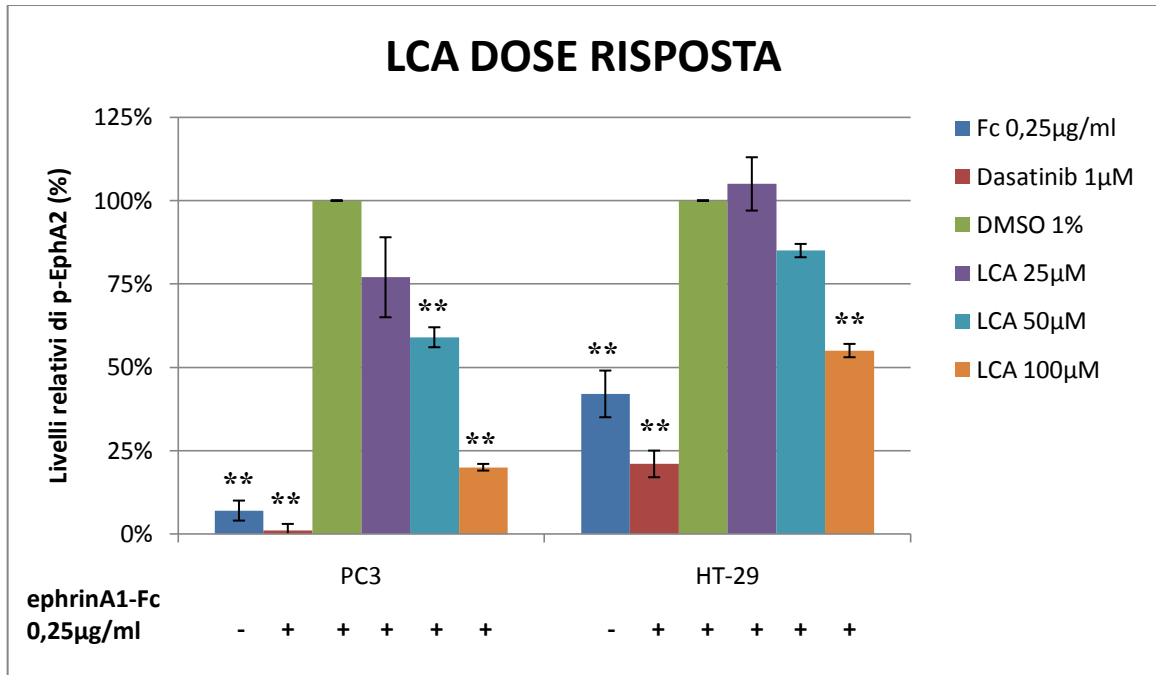


Figura 41: LCA, studio funzionale dose-risposta.

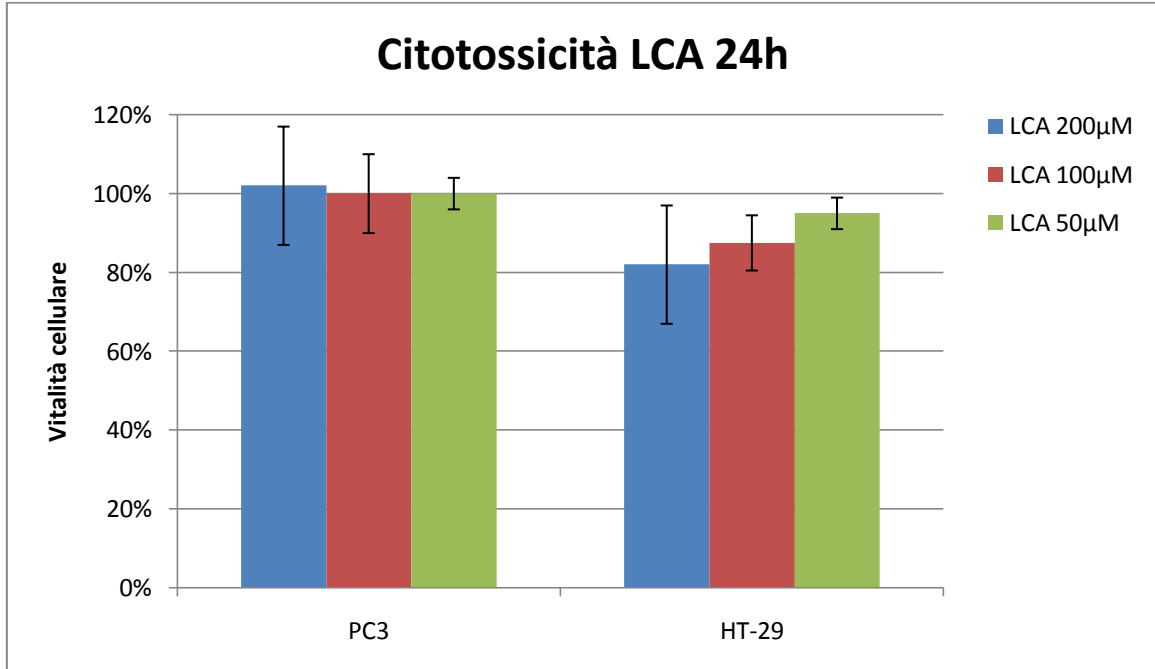


Figura 42: Citotossicità LCA 24h.

Al fine di escludere una inibizione diretta di LCA sul dominio chinasi Eph abbiamo testato il composto verso l'attività del dominio chinasi di EphA2. Il saggio, commissionato alla Cerep, dimostra che LCA, almeno fino alla dose di 100 $\mu$ M, non è in grado di inibire direttamente il dominio chinasi del recettore. In questo saggio la staurosporina è utilizzata come controllo positivo (figura 45). I dati quindi confermano che LCA inibisce l'attivazione del recettore EphA2, mediata da ephrinA1-Fc, inibendo l'interazione proteina proteina.

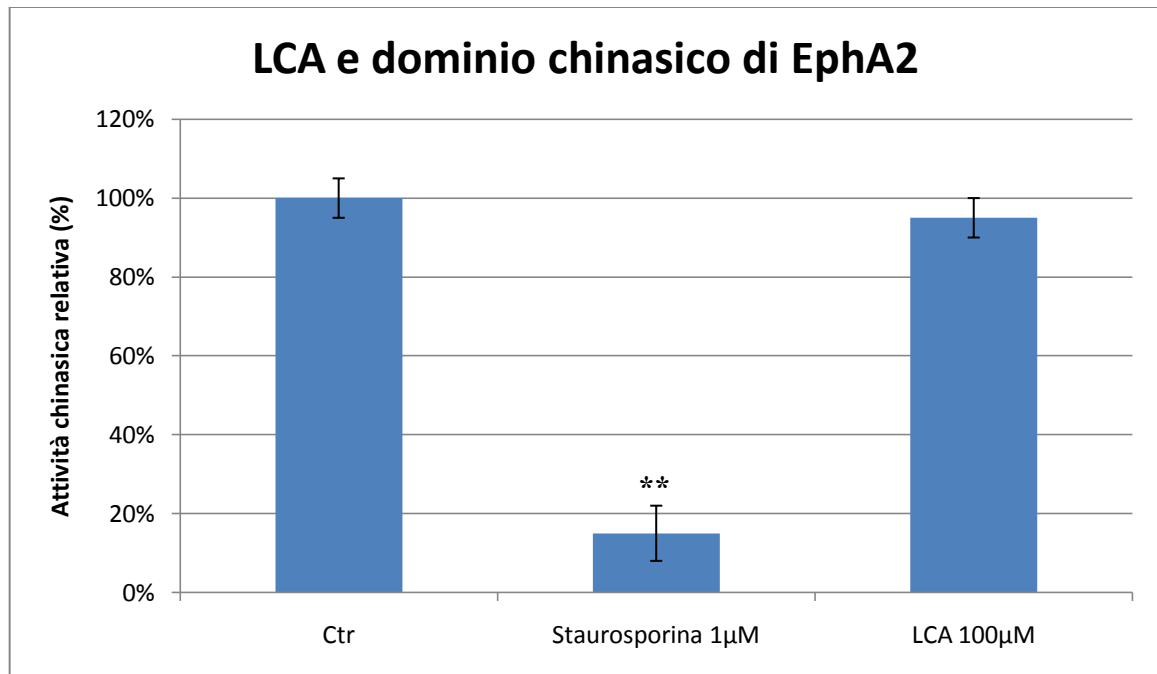


Figura 43: Saggio di inibizione del dominio chinasi di EphA2.

LCA pur non mostrando selettività d'azione all'interno del sistema efrinico è in grado di discriminare altri RTK in quanto alla dose di 100 $\mu$ M è risultato essere inattivo nei confronti di EGFR, VEGFR, IRK $\beta$  e IGFR $\beta$  sia quando testato come antagonista che quando impiegato come agonista (figura 46). La valutazione su EGFR è stata effettuata nel nostro laboratorio utilizzando cellule PC3 (A) o HT-29 (B) e stimolando il sistema con EGF 30 ng/ml nelle PC3 e 10ng/ml nelle HT-29. Il gefitinib alla dose di 10 $\mu$ M è stato impiegato come farmaco di riferimento.

Lo studio su VEGFR, IRK $\beta$  e IGFR $\beta$  è stato commissionato invece alla CEREP, che per i test funzionali di fosforilazione ha impiegato rispettivamente cellule HUVE (stimolate per 10minuti con VEGF 0,1nM; farmaco di riferimento inibitore vegfr II 1 $\mu$ M), A431 (stimolate per 10 minuti con insulina 100nM; farmaco di riferimento AG538 10 $\mu$ M) e HepG2 (stimolate per 10 minuti con IGF1 5nM).

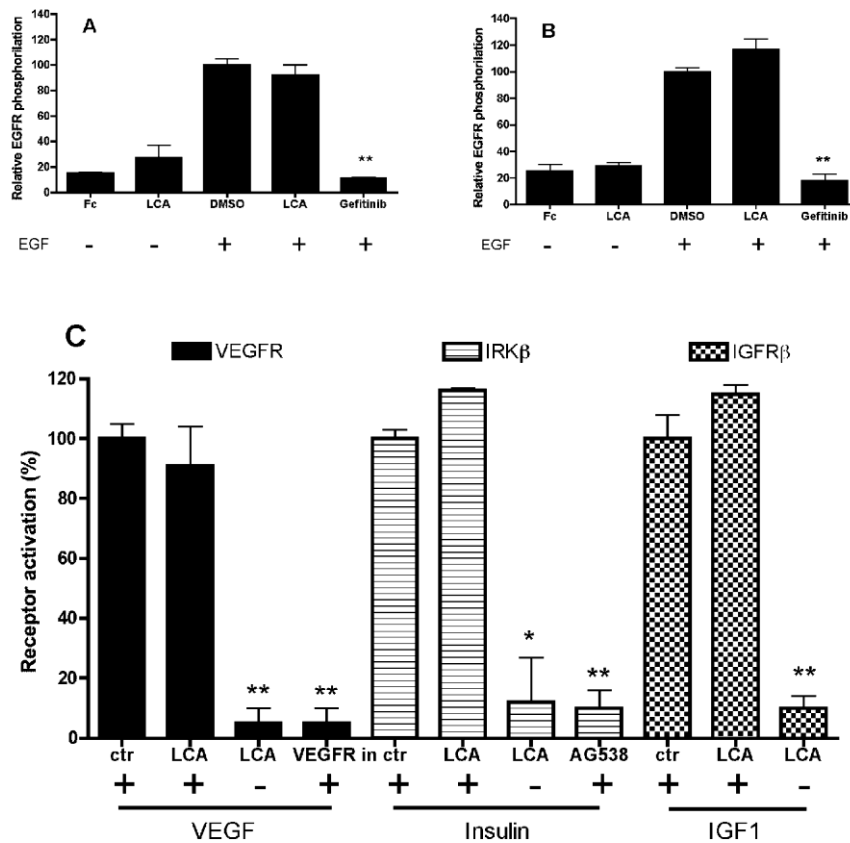


Figura 46: Specificità d'azione di LCA.

Infine LCA ha antagonizzato i cambiamenti morfologici indotti dall'attivazione del recettore EphA2 con ephrinA1-Fc nella linea cellulare PC3. A tal proposito abbiamo registrato la retrazione delle cellule PC3 indotta dall'attivazione di EphA2 da parte di ephrinA1-Fc 0,5µg/ml. Come si può apprezzare dal grafico sotto riportato LCA inibisce in maniera significativa la risposta mediata da ephrinA1-Fc ad una dose, la 100µM, che è in grado di abolire completamente la fosforilazione di EphA2 in risposta ad ephrinA1-Fc. Al contrario, quando testato alla dose soglia di 10µM, risulta essere inattivo nei confronti dell'azione mediata da ephrinA1-Fc.

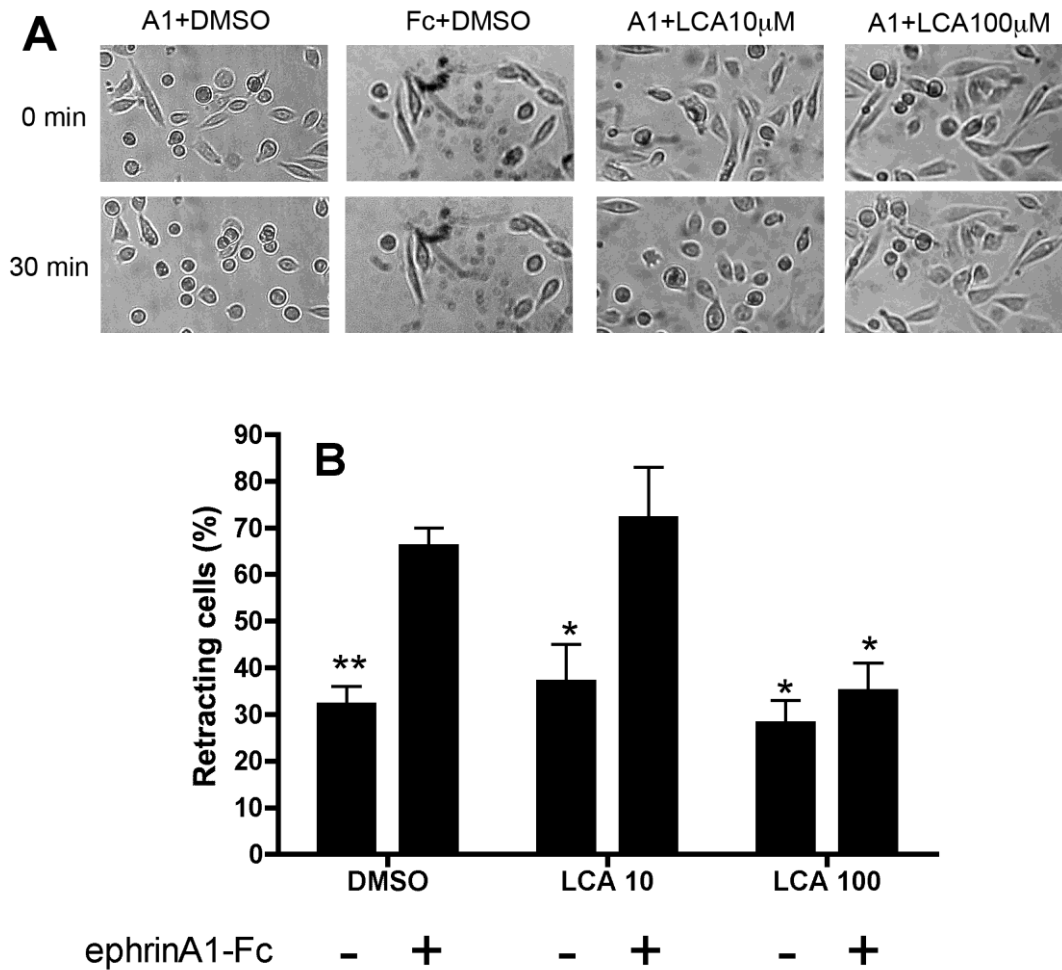


Figura 47: LCA antagonizza il cambiamento morfologico delle PC3 mediato dall'attivazione recettoriale di EphA2 utilizzando ephrinA1-Fc 0,5µg/ml.

# CONCLUSIONI

Il primo obiettivo raggiunto nel progetto alla base delle attività di ricerca svolte durante la mia esperienza dottorale è stato la messa a punto di un modello ELISA semplice, specifico, selettivo ed economico per lo screening di molecole in grado di interferire con il legame tra il recettore EphA2 e il suo ligando fisiologico ephrinA1. La specificità del modello è dimostrata dal fatto che ephrinA1-Fc biotinilata non si lega in maniera aspecifica alla piastra ELISA anche quando impiegata a dosi elevate (2000ng/ml) e per tempi prolungati (5 ore a temperatura ambiente).

Il modello è selettivo in quanto il legame tra ephrinA1-Fc biotinilata ed EphA2-Fc ectodomain è inibito in maniera competitiva da ephrinA1-Fc.

Infine il modello è economico in quanto l'ottimizzazione della concentrazione di recettore EphA2-Fc ectodomain impiegato nella fase solida porta il costo di ciascun pozzetto a circa 60 centesimi di euro.

Poichè ogni test farmacologico richiede la presenza di controlli positivi e negativi, il proposito iniziale era quello di utilizzare l'acido 2-idrossi-4-(2,5-dimetil-1-pirrolil)benzoico come standard di riferimento, in quanto unica piccola molecola, riportata in letteratura, in grado di inibire il legame tra ephrinA1 ed EphA2. Tuttavia, nel tentativo di accertare anche nel presente sistema sperimentale le proprietà inibitorie dell'acido 2-idrossi-4-(2,5-dimetil-1-pirrolil)benzoico, è emerso che tale composto, in realtà, è del tutto inattivo e che l'attività riportata in letteratura è probabilmente dovuta ai suoi prodotti di degradazione. L'acido 2-idrossi-4-(2,5-dimetil-1-pirrolil)benzoico, infatti, è estremamente instabile e difficilmente conservabile anche a temperature ridotte. I saggi da noi condotti sui prodotti di degradazione del composto dimostrano che il legame di tali prodotti, al momento non identificati, è aspecifico e di tipo irreversibile.

Questi dati dimostrano, inoltre, che al momento non sono disponibili piccole molecole in grado di interferire in modo competitivo con il legame Eph-ephrin.

L'attività di screening, condotta su di una libreria di oltre mille composti, tra i quali erano compresi anche principi attivi di farmaci e molecole endogene bioattive, ha portato alla scoperta dell'acido litocolico (LCA), come inibitore competitivo, reversibile e specifico del sistema efrinico.

Gli acidi biliari sono stati considerati per lungo tempo solo come molecole detergenti necessarie per la solubilizzazione e l'assorbimento dei lipidi a livello intestinale durante la digestione. Tuttavia, molti studi hanno esplorato l'ipotesi che gli acidi biliari funzionino anche come molecole regolatrici.

Un recente articolo (152), basato sull'utilizzo degli enantiomeri degli acidi biliari al fine di distinguere gli effetti recettoriali da quelli non recettoriali mediati da questa classe di molecole, ha dimostrato che la citotossicità e l'apoptosi che questi inducono sulle linee cellulari tumorali di colon HT-29 e HCT-116 è enantiospecifica e quindi correlata all'interazione con un recettore piuttosto che attribuibile alle generiche proprietà detergenti di queste molecole.

Altri gruppi di ricerca hanno dimostrato l'interazione specifica degli acidi biliari con il recettore nucleare FXR, principalmente coinvolto nel metabolismo epatico dei lipidi e del glucosio (153) piuttosto che con TGR5, recettore accoppiato a proteina G (154).

Anche i dati emersi dal presente lavoro suggeriscono il coinvolgimento di siti recettoriali specifici nelle risposte indotte da LCA. Infatti negli studi di binding, LCA ha inibito in modo competitivo l'interazione tra ephrin-A1-Fc biotinilata e EphA2-Fc ectodomain come dimostrato da un proporzionale spostamento delle curve di saturazione di ephrinA1-Fc biotinilata e dalla pendenza unitaria del grafico di Schild. Inoltre, l'effetto inibitorio è altamente specifico poiché gli acidi biliari strutturalmente correlati a LCA sono risultati essere completamente inattivi, sia negli studi di binding che di fosforilazione. Ancora, la  $K_i$  di LCA nell'interferenza dell'interazione EphA2-ephrinA1 è sei volte inferiore rispetto alla sua concentrazione micellare critica (155) indice di una significativa potenza inibitoria verso il sistema Eph-ephrin e la sua inattività alla dose di  $100\mu\text{M}$  contro altri RTK, quali EGFR, VEGFR, IRK $\beta$ , IGFR1 $\beta$  conferma la mirata specificità verso il sistema efrinico. Infine, LCA è privo di tossicità alle concentrazioni studiate e sia negli studi di binding che in quelli funzionali risulta essere attivo nello stesso range di concentrazioni compreso tra  $20\mu\text{M}$  e  $100\mu\text{M}$ .

Così come il legame Eph-ephrin è altamente promiscuo anche LCA non discrimina all'interno delle sottoclassi recettoriali EphA e EphB. Pertanto si può ipotizzare un'interazione di questa molecola con una regione altamente conservata ed essenziale nel legame dei recettori Eph ai loro ligandi efrinici. A tale riguardo il legame delle efrine ai recettori Eph è mediato da un loop GH (chiave) che si inserisce in un canale idrofobico del recettore Eph formato dalle sequenze DE e JK (serratura). Queste evidenze sperimentali suggeriscono un'interferenza di LCA con il corretto e completo inserimento del loop efrinico GH nel canale idrofobico di Eph. Studi futuri di relazione struttura-attività saranno fondamentali per chiarire la dinamica di questa interazione.

Per finire, grazie agli studi funzionali condotti sulla linea cellulare PC3 esprime il recettore EphA2, sono state fornite evidenze del ruolo inibitorio di LCA sul peculiare effetto di retrazione ed arrotondamento cellulare indotto da stimolazione di EphA2 con ephrinA1-Fc, suggerendo che questo acido biliare può antagonizzare gli effetti mediati dall'attivazione di EphA2.

## PROSPETTIVE FUTURE

L'inibizione dell'interazione EphA2-ephrinA1 e più in generale del signalling efrinico potrebbe essere utile nella pratica oncologica ed in particolare estremamente vantaggiosa nel contrastare l'angiogenesi patologica associata alla crescita e progressione tumorale. Attualmente diverse strategie miranti a inibire il signalling efrinico sono oggetto di indagine da parte di diversi gruppi di ricerca e a tale riguardo recettori solubili, anticorpi specifici, peptidi e SiRNA rappresentano ad oggi gli unici strumenti per modulare il sistema efrinico e studiarne funzioni e peculiarità. In prospettiva terapeutica però tali strategie, basate sull'utilizzo di ligandi a prevalente struttura peptidica, risultano essere ancora di difficile impiego a causa di un profilo farmacocinetico e farmacodinamico altamente sfavorevole. Lo sviluppo di ligandi di piccole molecole costituisce quindi anche in questo caso la via migliore per lo sviluppo e la somministrazione di farmaci. Per queste ragioni i risultati di questa ricerca potrebbero essere un punto di inizio per ricerche future miranti a sviluppare piccole molecole aventi come bersaglio l'interazione Eph-ephrin, fermo restando la necessità di chiarire se LCA legghi la tasca recettoriale Eph o il GH loop delle efrine. Ad ogni modo la modulazione degli elementi farmacoforici presenti nell'acido litocolico potrebbe condurre alla progettazione di molecole ad alta affinità come precedentemente testimoniato dallo sviluppo di agonisti per i recettori FXR e TGR5 (156).

Oltre a fornire le basi chimiche per lo sviluppo razionale di ligandi del sistema efrinico, questi dati offrono spunto per considerazioni sul rapporto che intercorre tra acidi biliari e sistema efrinico con interessanti risvolti patofisiologici. Infatti i livelli di espressione dei recettori Eph e dei ligandi efrinici giocano un ruolo critico nel rinnovamento cellulare intestinale organizzato (72, 74). Ora, essendo l'acido litocolico presente nelle feci ad una concentrazione di circa 2mM (157), è ragionevole supporre un coinvolgimento di questo acido biliare secondario con il signalling efrinico *in vivo* nel distretto intestinale. Di conseguenza, l'acido litocolico potrebbe giocare un ruolo nell'omeostasi dell'intestino e un'alterazione dei suoi livelli fisiologici potrebbe modificare l'espressione e il signalling di recettori e ligandi efrinici. In questo modo i corretti meccanismi di segregazione, proliferazione e differenziazione cellulare, alla base dell'omeostasi tissutale di questo distretto, potrebbero risultare alterati. Quindi, i presenti risultati sembrano fornire qualche elemento utile per interpretare la stretta correlazione che sussiste tra la concentrazione degli acidi biliari nelle feci (in primis DCA e LCA), e l'incidenza di cancro al colon, evidenziata da numerosi studi epidemiologici, ma i cui meccanismi sono oggi lontani dall'essere chiariti.

## BIBLIOGRAFIA

1. Pasquale, E. B. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 133, 38-52 (2008).
2. Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J., Takaku, F. A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* 238, 1717-1720 (1987).
3. Gale, N. W., Yancopoulos, G. D. Ephrins and their receptors: a repulsive topic? *Cell Tissue Res.* 290, 227-241 (1997).
4. Wykosky, J., Debinski, W. The EphA2 receptor and ephrinA1 ligand in solid tumors: function and therapeutic targeting. *Mol. Cancer Res.* 6, 1795-1806 (2008).
5. Pasquale, E. B., Eph receptor signaling casts a wide net on cell behavior. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 462-475 (2005).
6. Gale, N. W., Holland, S. J., Valenzuela, D. M., Flenniken, A., Pan, L., Ryan, T. E., Henkemeyer, M., Strebhardt, K., Hirai, H., Wilkinson, D. G., Pawson, T., Davis, S., Yancopoulos, G. D. Eph Receptors and Ligands Comprise Two Major Specificity Subclasses and Are Reciprocally Compartmentalized during Embryogenesis. *Neuron.* 17, 9-19 (1996).
7. Himanen, J. P., Chumley, M. J., Lackmann, M., Li, C., Barton, W. A., Jeffrey, P. D., Vearing, C., Geleick, D., Feldheim, D. A., Boyd, A. W., Henkemeyer, M., Nikolov, D. B. Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat. Neurosci.* 7, 501-509 (2004).
8. Himanen, J.P., Saha, N., Nikolov, D. B. Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 534-542 (2007).
9. Koolpe, M., Burgess, R., Dail, M., Pasquale, E. B. EphB receptor-binding peptides identified by phage display enable design of an antagonist with ephrin-like affinity. *J. Biol. Chem.* 280, 17301-17311 (2005).
10. Chrencik, J. E., Brooun, A., Recht, M. I., Kraus, M. L., Koolpe, M., Kolatkar, A. R., Bruce, R. H., Martiny-Baron, G., Widmer, H., Pasquale, E. B., Kuhn, P. Structure and thermodynamic characterization of the EphB4/Ephrin-B2 antagonist peptide complex reveals the determinants for receptor specificity. *Structure (Lond.)* 14, 321-330 (2006).
11. Chrencik, J. E., Brooun, A., Recht, M. I., Nicola, G., Davis, L. K., Abagyan, R., Widmer, H., Pasquale, E. B., Kuhn, P. Three-dimensional structure of the EphB2 receptor in complex with an antagonistic peptide reveals a novel mode of inhibition. *J. Biol. Chem.* 282, 36505-36513 (2007).
12. Nikolov, D., Li, C., Lackmann, M., Jeffrey, P., Himanen, J. Crystal structure of the human ephrin-A5 ectodomain. *Protein Sci* 16, 996-1000 (2007).
13. Himanen, J. P., Rajashankar, K. R., Lackmann, M., Cowan, C. A., Henkemeyer, M., Nikolov, D. B. Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature* 414, 933-938 (2001).

14. Pasquale, E. B. Eph-ephrin promiscuity is now crystal clear. *Nat. Neurosci.* 7, 417-418 (2004).
15. Bartley, T. D., Hunt, R. W., Welcher, A. A., Boyle, W. J., Parker V. P., Lindberg, R. A., Lu, H. S., Colombero, A. M., Elliott, R. L., Guthrie, B. A., Holst, P. L., Skrine, J. D., Toso, R. J., Zhang, M., Fernandez, E., Trail, G., Varnum, B., Yarden, Y., Hunter, T., Fox, G. M. B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase. *Nature* 368, 558-560 (1994).
16. Alford S. C., Bazowski, J., Lorimer, H., Elowe, S., Howard, P. L. Tissue transglutaminase clusters soluble A-type ephrins into functionally active high molecular weight oligomers. *Exp. Cell. Res.* 313, 4170-4179 (2007).
17. Wykosky, J., Palma, E., Gibo, D. M., Ringler, S., Turner, C. P., et al. Soluble monomeric EphrinA1 is released from tumor cells and is a functional ligand for the EphA2 receptor. *Oncogene* 27, 7260-7273 (2008).
18. Dixit, V. M., Green, S., Sarma, V., Holzman, L. B., Wolf, F. W., O'Rourke, K., Ward, P. A., Prochownik, E. V., Marks, R. M. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage specific chemotaxin. *J. Biol. Chem.* 265, 2973-2978 (1990).
19. Lawrence, B., Holzman, L. B., Marks, R. M. A novel immediate-early response gene of endothelium is induced by cytokines and encodes a secreted protein. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5830-5838 (1990).
20. Arvanitis, D., Davy, A. Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev.* 22, 416-429 (2008).
21. Lim, Y. S., McLaughlin, T., Sung T. C., Santiago, A., Lee, K. F., O'Leary, D. D. p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron.* 59, 746-758 (2008).
22. Pasquale, E. B. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 10,165-180 (2010).
23. Parri, M., Buricchi, F., Taddei, M. L., Giannoni, E., Raugei, G., Ramponi, G., Chiarugi, P. Ephrin-A1 repulsive response is regulated by an EPHA2 tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* 280, 34008-34018 (2008).
24. Dail, M., Richter, M., Godement, P., Pasquale, E. B. Eph receptors inactivate R-Ras through different mechanisms to achieve cell repulsion. *J. Cell Sci.* 119, 1244-1254 (2006).
25. Tolias, K. F., Bikoff, J. B, Kane, C. G, Tolias, C. S, Hu, L., Greenberg, M. E. The Rac1 guanine nucleotide exchange factor Tiam1 mediates EphB receptor-dependent dendritic spine development. *Proc. Nat.l Acad. Sci. U S A* 104, 7265-7270 (2007).
26. Cowan C. W., Shao, Y. R, Sahin, M., Shamah, S. M., Lin, M. Z., Greer, P. L., Gao, S., Griffith, E. C., Brugge, J. S., Greenberg, M. E. Vav family GEFs link activated Ephs to endocytosis and axon guidance. *Neuron.* 46, 205-217 (2005).
27. Hunter, S. G, Zhuang, G., Brantley-Sieders, D., Swat, W., Cowan, C. W., Chen, J. Essential role of Vav family guanine nucleotide exchange factors in EphA receptor-mediated angiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4830-4842 (2006).

28. Shamah, S. M., Lin M. Z., Goldberg, J. L., Estrach, S., Sahin, M., Hu, L., Bazalakova, M., Neve, R. L., Corfas, G., Debant, A., Greenberg, M. E. EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* 105, 233-244 (2001).
29. Sahin, M., Greer, P. L., Lin, M. Z., Poucher, H., Eberhart, J., Schmidt, S., Wright, T. M., Shamah, S. M., O'connell, S., Cowan, C. W., Hu, L., Goldberg, J. L., Debant, A., Corfas, G., Krull, C. E., Greenberg, M. E. Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexin1 modulates growth cone collapse. *Neuron*. 46, 191-204 (2005).
30. Miao, H., Burnett, E., Kinch, M., Simon, E., Wang, B. Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 2, 62-69 (2000).
31. Carter, N., Nakamoto, T., Hirai, H., Hunter, T. EphrinA1-induced cytoskeletal reorganization requires FAK and p130(cas). *Nat. Cell Biol.* 4, 565-573 (2002).
32. Torres, R., Firestein, B. L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E. N., Haganir, R. L., Brecht, D. S., Gale, N. W., Yancopoulos, G. D. PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron*. 21, 1453-1463 (1998).
33. Hock, B., Bohme, B., Karn, T., Yamamoto, T., Kaibuchi, K., Holtrich, U., Holland, S., Pawson, T., RübSamen-Waigmann, H., Strebhardt, K. PDZ-domain-mediated interaction of the Eph-related receptor tyrosine kinase EphB3 and the ras-binding protein AF6 depends on the kinase activity of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 9779-9784 (1998).
34. Holland, S. J, Gale, N. W., Gish, G. D, Roth, R. A., Songyang, Z., Cantley, L. C., Henkemeyer, M., Yancopoulos, G. D., Pawson, T. Juxtamembrane tyrosine residues couple the Eph family receptor EphB2/Nuk to specific SH2 domain proteins in neuronal cells. *EMBO J.* 16, 3877-3888 (1997).
35. Pandey, A., Duan H., Dixit, V. M. Characterization of a novel Src-like adapter protein that associates with the Eck receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 19201-19204 (1995).
36. Ellis C., Kasmi, F., Ganju, P., Walls, E., Panayotou, G., Reith, A. D. A juxtamembrane autophosphorylation site in the Eph family receptor tyrosine kinase, Sek, mediates high affinity interaction with p59fyn. *Oncogene* 12, 1727-1736 (1996).
37. Knoll, B., Drescher, U. Src family kinases are involved in EphA receptor mediated retinal axon guidance. *J. Neurosci.* 24, 6248-6257 (2004).
38. Pandey, A., Lazar, D. F., Saltiel, A. R., Dixit, V. M. Activation of the Eck receptor protein tyrosine kinase stimulates phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Biol. Chem.* 269, 30154-30157 (1994).
39. Georgakopoulos, A. Litterst, C., Ghersi, E., Baki, L., Xu, C., Serban, G., Robakis, N. K. Metalloproteinase/Presenilin1 processing of ephrinB regulates EphB induced Src phosphorylation and signaling. *EMBO J.* 25, 1242-1252 (2006).
40. Litterst, C., Georgakopoulos, A., Shioi, J., Ghersi, E., Wisniewski, T., Wang, R., Ludwig, A., Robakis, N. K. Ligand binding and calcium influx induce distinct

- ectodomain/ $\gamma$ -secretase-processing pathways of EphB2 receptor. *J. Biol. Chem.* 282,16155-16163 (2007).
41. Inoue, E., Deguchi-Tawarada, M., Togawa, A., Matsui, C., Arita, K., Katahira-Tayama, S., Sato, T., Yamauchi, E., Oda, Y., Takai, Y. Synaptic activity prompts  $\gamma$ -secretase-mediated cleavage of EphA4 and dendritic spine formation. *J. Cell Biol.* 185, 551-564(2009).
  42. Wu, C. Qiu, R., Wang, J., Zhang, H., Murai, K., Lu, Q. ZHX2 Interacts with Ephrin-B and regulates neural progenitor maintenance in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 29, 7404-7412 (2009).
  43. Hattori, M., Osterfield, M., Flanagan, J. G. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 289, 1360-1365 (2000).
  44. Janes, P. W., Saha, N., Barton, W. A., Kolev, M. V., Wimmer-Kleikamp, S. H., Nievergall, E., Blobel, C. P., Himanen, J. P., Lackmann, M., Nikolov, D. B. Adam meets Eph: An ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* 123, 291–304 (2005).
  45. Tomita, T., Tanaka, S., Morohashi, Y., Iwatsubo, T. Presenilin-dependent intramembrane cleavage of ephrin-B1. *Mol. Neurodegener.* 1:2, doi: 10.1186/1750-1326-1-2 (2006).
  46. Janes, P. W., Wimmer-Kleikamp, S. H., Frangakis, A. S., Treble, K., Griesshaber, B., Sabet, O., Grabenbauer, M., Ting, A. Y., Saftig, P., Bastiaens, P. I., Lackmann, M. Cytoplasmic relaxation of active Eph controls ephrin shedding by ADAM10. *PLoS Biol.* 7:e1000215 (2009).
  47. Mann, F., Miranda, E., Weigl, C., Harmer, E., Holt, C. E. B-type Eph receptors and ephrins induce growth cone collapse through distinct intracellular pathways. *J. Neurobiol.* 57, 323-336 (2003).
  48. Marston, D. J., Dickinson, S., Nobes, C. D. Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph–ephrin contact repulsion. *Nat. Cell Biol.* 5, 879-888 (2003).
  49. Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J., Klein, R. EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat. Cell Biol.* 5, 869-878 (2003).
  50. Lauterbach, J., Klein, R. Release of full-length EphB2 receptors from hippocampal neurons to cocultured glial cells. *J. Neurosci.* 26, 11575-11581(2006).
  51. Pitulescu, M. E., Adams, R. H. Eph/ephrin molecules--a hub for signaling and endocytosis. *Genes Dev.* 24, 2480-2492 (2010).
  52. Yamaguchi, Y., Pasquale, E.B. Eph receptors in the adult brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 288-296 (2004).
  53. Kayser, M. S., McClelland, A. C., Hughes, E. G., Dalva, M. B. Intracellular and trans-synaptic regulation of glutamatergic synaptogenesis by EphB receptors. *J. Neurosci.* 26, 12152-12164 (2006).
  54. Aoto, J., Ting, P., Maghsoodi, B., Xu, N., Henkemeyer, M., Chen, L. Postsynaptic ephrinB3 promotes shaft glutamatergic synapse formation. *J. Neurosci.* 27, 7508-7519 (2007).
  55. Dalva, M. B., McClelland, A. C., Kayser, M. S. Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 206-220 (2007).

56. Tremblay, M. E., Riad, M., Bouvier, D., Murai, K. K., Pasquale, E. B., Descarries, L., Doucet, G. Localization of EphA4 in axon terminals and dendritic spines of adult rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 501, 691-702 (2007).
57. Du, J., Fu, C., Sretavan, D. W. Eph/ephrin signaling as a potential therapeutic target after central nervous system injury. *Curr. Pharm. Des.* 13, 2507-2518 (2007).
58. Wu, Z., Ghosh-Roy, A., Yanik, M. F., Zhang, J. Z., Jin, Y., Chisholm, A.D. *Caenorhabditis elegans* neuronal regeneration is influenced by life stage, ephrin signaling, and synaptic branching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 15132-15137 (2007).
59. Liu, X., Hawkes, E., Ishimaru, T., Tran, T., Sretavan, D. W. EphB3: an endogenous mediator of adult axonal plasticity and regrowth after CNS injury. *J. Neurosci.* 26, 23087-3101 (2006).
60. Fabes, J., Anderson, P., Brennan, C., Bolsover, S. Regeneration-enhancing effects of EphA4 blocking peptide following corticospinal tract injury in adult rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 26, 2496-2505 (2007).
61. Wu, J., Luo, H. Recent advances on T-cell regulation by receptor tyrosine kinases. *Curr. Opin. Hematol.* 12, 292-297 (2005).
62. Munoz, J. J., Alfaro, D., Garcia-Ceca, J., Alonso, C. L., Jimenez, E., Zapata, A. Thymic alterations in EphA4-deficient mice. *J. Immunol.* 177, 804-813 (2006).
63. Alfaro, D., Garcia-Ceca, J.J., Cejalvo, T., Jimenez, E., Jenkinson, E.J., Anderson, G., Munoz, J.J., Zapata, A. EphrinB1-EphB signaling regulates thymocyte-epithelium interactions involved in functional T cell development. *Eur. J. Immunol.* 37, 2596-2605 (2007).
64. Luo, H. Y., Yu, G., Tremblay, J., Wu, J. P. EphB6-null mice mutation results in compromised T cell function. *J. Clin. Invest.* 114, 1762-1773 (2004).
65. Yu, G., Luo, H. Y., Wu, Y. L., Wu, J. P. EphrinB2 induces T cell costimulation. *J. immunol.* 171, 106-114 (2003).
66. Yu, G., Mao, J. N., Wu, Y. L., Luo, H. Y., Wu, J. P. EphrinB1 is critical in T-cell development. *J. Biol. Chem.* 281, 10222-10229 (2006).
67. Prévost, N., Woulfe D. S., Jiang, H., Stalker, T. J., Marchese, P., Ruggeri, Z. M, Brass, L. F. Eph kinases and ephrins support thrombus growth and stability by regulating integrin outside-in signaling in platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102, 9820-9825 (2005).
68. Konstantinova, I., Nikolova, G., Ohara-imaizumi, M., Meda, P., Kucera, T., Zarbalis, K., Wurst, W., Nagamatsu, S., Lammert, E. EphA-ephrinA-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. *Cell* 129, 359-370 (2007).
69. Davy, A., Bush, J. O., Soriano, P. Inhibition of gap junction communication at ectopic Eph/ephrin boundaries underlies craniofrontonasal syndrome. *PLOS Biol.* 4, e335 (2006).
70. Zhao, C., Irie, N., Takada, Y., Shimoda, K., Miyamoto, T., Nishiwaki, T., Suda, T., Matsuo, K. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab.* 4, 111-121 (2006).

71. Schneikert, J., Behrens, J. The canonical WNT signalling pathway and its APC partner in colon cancer development. *Gut* 56, 417-425 (2007).
72. Battle, E., Henderson, J. T., Beghtel, H., van den Born, M. M., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van den Wetering, M., Pawson, T., Clevers, H.  $\beta$ -catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111, 251-263 (2002).
73. Cortina, C., Palomo-Ponce, S., Iglesias, M., Fernandez-Masip, J. L., Vivancos, A., Whissell, G., Huma, M., Peiro, N., Gallego, L., Jonkheer, S., Davy, A., Lloreta, J., Sancho, E., Battle, E. EphB-ephrinB interactions suppress colorectal cancer progression by compartmentalizing tumor cells. *Nat. Genet.* 39, 1376-1383 (2007).
74. Kosinski, C., Li, V. S., Chan, A. S., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W. Y., Chan, T. L., Mifflin, R. C., Powell, D. W., Yuen, S. T., Leung, S. Y., Chen, X. Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 15418-15423 (2007).
75. Andres, A. C., Ziemiecki, A. Eph and ephrin signaling in mammary gland morphogenesis and cancer. *J. Mammary Gland Biol.* 8, 475-485 (2003).
76. Munarini, N., Jager, R., Abderhalden, S., Zuercher, G., Rohrbach, V., Loercher, S., Pfanner-Meyer, B., Andres, A. C., Ziemiecki, A. Altered mammary epithelial development, pattern formation and involution in transgenic mice expressing the EphB4 receptor tyrosine kinase. *J. Cell Sci.* 115, 25-37 (2002).
77. Kuijper, S., Turner, C. J., Adams, R. H. Regulation of angiogenesis by Eph-ephrin interactions. *Trends Cardiovas. Med.* 17, 145-151 (2007).
78. Foo, S. S., Turner, C. J., Adams, S., Compagni, A., Aubyn, D., Kogata, N., Lindblom, P., Shani, M., Zicha D., Adams, R. H. EphrinB2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell* 124, 161-173 (2006).
79. Erber, R., Eichelsbacher, U., Powajbo, V., Korn, T., Djonov, V., Lin, J. H., Hammes, H. P., Grobholz, R., Ullrich, A., Vajkoczy, P. EphB4 controls blood vascular morphogenesis during postnatal angiogenesis. *EMBO J.* 25, 628-641 (2006).
80. Gale, N. W., Baluk, P., Pan, L., Kwan, M., Holash, J., DeChiara, T. M., McDonald, D. M., Yancopoulos, G. D. EphrinB2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells. *Dev. Biol.* 230, 151-160 (2001).
81. Shin D., Garcia-Cardena, G., Hayashi, S. I., Gerety, S., Asahara, T., Stavrakis, G., Isner, J., Folkman, J., Gimbrone, M. A., Anderson, D. J. Expression of ephrinB2 identifies a stable genetic difference between arterial and venous vascular smooth muscle as well as endothelial cells, and marks subsets of microvessels at sites of adult neovascularization. *Dev. Biol.* 230, 139-150 (2001).
82. Brantley-Sieders, D. M., Chen, J. Eph receptor tyrosine kinases in angiogenesis: from development to disease. *Angiogenesis* 7, 17-28 (2004).
83. Heroult, M., Schaffner, F., Augustin, H. G. Eph receptor and ephrin ligand-mediated interactions during angiogenesis and tumor progression. *Exp. Cell Res.* 312, 642-650 (2006).

84. Noren, N. K., Pasquale, E. B. Paradoxes of the EphB4 receptor in cancer. *Cancer Res.* 67, 3994–3997 (2007).
85. Chen, J., Hicks, D., Brantley-Sieders, D., Cheng, N., McCollum, G. W., Qi-Werdich, X., and Penn, J. Inhibition of retinal neovascularization by soluble EphA2 receptor. *Exp. Eye Res.* 82, 664-673 (2006).
86. Foubert, P., Silvestre, J. S., Souttou, B., Barateau, V., Martin, C., Ebrahimian, T. G., Lere-Dean, C., Contreres, J. O., Sulpice, E., Levy, B. I., Plouët, J., Tobelem, G., Le Ricousse-Roussanne, S.. PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J. Clin. Invest.* 117, 1527-1537 (2007).
87. Ireton, R. C., Chen, J. EphA2 receptor tyrosine kinase as a promising target for cancer therapeutics. *Curr. Cancer Drug Targets.* 5, 149-157 (2005).
88. Landen, C. N., Kinch, M. S., Sood, A. K. EphA2 as a target for ovarian cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets.* 9, 1179-1187 (2005).
89. Zhuang, G. Brantley-Sieders, D. M, Vaught, D., Yu, J., Xie, L., Wells, S., Jackson, D., Muraoka-Cook, R., Arteaga, C., Chen, J. Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy. *Cancer Res.* 70, 299-308 (2010).
90. Kumar, S. R. Masood, R., Spannuth, W. A., Singh, J., Scehnet, J., Kleiber, G., Jennings, N., Deavers, M., Krasnoperov, V., Dubeau, L., Weaver, F. A, Sood, A. K., Gill, P. S. The receptor tyrosine kinase EphB4 is overexpressed in ovarian cancer, provides survival signals and predicts poor outcome. *Br. J. Cancer* 96, 1083-1091 (2007).
91. Kumar, S. R. Scehnet, J. S., Ley, E. J., Singh, J., Krasnoperov, V., Liu, R., Manchanda, P. K., Ladner, R. D., Hawes, D., Weaver, F. A., Beart, R. W., Singh, G., Nguyen, C., Kahn, M., Gill, P. S. Preferential induction of EphB4 over EphB2 and its implication in colorectal cancer progression. *Cancer Res.* 69, 3736-3745 (2009).
92. Hafner, C., Becker, B., Landthaler, M., Vogt, T. Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in human skin and downregulation of EphA1 in non melanoma skin cancer. *Mod. Pathol.* 19, 1369-1377 (2006).
93. Herath, N. I., Doecke, J., Spanevello, M. D., Leggett, B. A., Boyd, A. W. Epigenetic silencing of EphA1 expression in colorectal cancer is correlated with poor survival. *Br. J. Cancer* 100, 1095-1102 (2009).
94. Li, J. J., Liu, D. P., Liu, G. T., Xie, D. EphrinA5 acts as a tumor suppressor in glioma by negative regulation of epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 28, 1759-1768 (2009).
95. Battle, E., Bacani, J, Begthel, H., Jonkheer, S., Gregorieff, A., van de Born, M., Malats, N., Sancho, E., Boon, E., Pawson, T., Gallinger, S., Pals, S., Clevers, H. EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* 435, 1126-1130 (2005).
96. Alazzouzi, H. Davalos, V., Kokko, A., Domingo, E., Woerner, S. M., Wilson, A. J, Konrad, L., Laiho, P., Espín, E., Armengol, M., Imai, K., Yamamoto, H., Mariadason, J. M., Gebert, J. F., Aaltonen, L. A., Schwartz, S. Jr., Arango, D.

- Mechanisms of inactivation of the receptor tyrosine kinase EPHB2 in colorectal tumors. *Cancer Res.* 65, 10170-10173 (2005).
97. Davalos, V., Dopeso, H., Castaño, J., Wilson, A. J., Vilardell, F., Romero-Gimenez, J., Espín, E., Armengol, M., Capella, G., Mariadason, J. M., Aaltonen, L. A., Schwartz, S. Jr., Arango, D. EPHB4 and survival of colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 66, 8943-8948 (2006).
  98. Chiu, S. T., Chang, K. J., Ting, C. H., Shen, H. C., Li, H., Hsieh, F. J. Over-expression of EphB3 enhances cell-cell contacts and suppresses tumor growth in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 30, 1475-1486 (2009).
  99. Muller-Tidow, C., Diederichs, S., Bulk, E., Pohle, T., Steffen, B., Schwäble, J., Plewka, S., Thomas, M., Metzger, R., Schneider, P. M., Brandts, C. H., Berdel, W. E., Serve, H. Identification of metastasis associated receptor tyrosine kinases in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 65, 1778-1782 (2005).
  100. Macrae, M., Neve, R. M., Rodriguez-Viciana, P., Haqq, C., Yeh, J., Chen, C., Gray, J. W., McCormick, F. A conditional feedback loop regulates Ras activity through EphA2. *Cancer Cell* 8, 111-118 (2005).
  101. Noren, N. K., Foos, G., Hauser, C. A., Pasquale, E. B. The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway. *Nature Cell Biol.* 8, 815-825 (2006).
  102. Pandey, A., Shao, H., Marks, R. M., Polverini, P. J., Dixit, V. M. Role of B61, the ligand for the Eck receptor tyrosine kinase, in TNF- $\alpha$ -induced angiogenesis. *Science* 268, 567-569 (1995).
  103. Cheng, N., Brantley, D. M., Liu, H., Lin, Q., Enriquez, M., Gale, N., Yancopoulos, G., Cerretti, D. P., Daniel, T. O., Chen, J. Blockade of EphA receptor tyrosine kinase activation inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced angiogenesis. *Mol. Cancer Res.* 1, 2-11 (2002).
  104. Yamashita, T., Ohneda, K., Nagano, M., Miyoshi, C., Kaneko, N., Miwa, Y., Yamamoto, M., Ohneda, O., Fujii-Kuriyama, Y. Hypoxia-inducible transcription factor-2 $\alpha$  in endothelial cells regulates tumor neovascularization through activation of ephrin A1. *J. Biol. Chem.* 283, 18926-18936 (2008).
  105. Zelinski, D. P., Zantek, N. D., Stewart, J. C., Irizarry, A. R., Kinch, M. S. EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 61, 2301-2306 (2001).
  106. Miao, H., Li, D. Q., Mukherjee, A., Guo, H., Petty, A., Cutter, J., Basilion, J. P., Sedor, J., Wu, J., Danielpour, D., Sloan, A. E., Cohen, M. L., Wang, B. EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt. *Cancer Cell* 16, 9-20 (2009).
  107. Noblitt, L. W., Bangari, D. S., Shukla, S., Knapp, D. W., Mohammed, S., Kinch, M. S., Mittal, S. K. Decreased tumorigenic potential of EphA2-overexpressing breast cancer cells following treatment with adenoviral vectors that express EphrinA1. *Cancer Gene Ther.* 11, 757-766 (2004).
  108. Dopeso, H., Mateo-Lozano, S., Mazzolini, R., Rodrigues, P., Lagares-Tena, L., Ceron, J., Romero, J., Esteves, M., Landolfi, S., Hernández-Losa, J., Castaño, J.,

- Wilson, A. J., Ramon y Cajal, S., Mariadason, J. M., Schwartz, S. Jr., Arango, D. The receptor tyrosine kinase EPHB4 has tumor suppressor activities in intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* 69, 7430-7438 (2009).
109. Zantek, N. D., Azimi, M., Fedor-Chaiken, M., Wang, B., Brackenbury, R., Kinch, M. S. E-cadherin regulates the function of the EphA2 receptor tyrosine kinase. *Cell Growth Differ.* 10, 629–638 (1999).
110. Wimmer-Kleikamp, S. H., Nievergall, E., Gegenbauer, K., Adikari, S., Mansour, M., Yeadon, T., Boyd, A. W., Patani, N. R., Lackmann, M. Elevated protein tyrosine phosphatase activity provokes Eph/ephrin facilitated adhesion of pre-B leukemia cells. *Blood* 112, 721–732 (2008).
111. Kikawa, K. D., Vidale, D. R., Van Etten, R. L. & Kinch, M. S. Regulation of the EphA2 kinase by the low molecular weight tyrosine phosphatase induces transformation. *J. Biol. Chem.* 277, 39274–39279 (2002).
112. Ruhe, J. E., Streit, S., Hart, S., Wong, C. H., Specht, K., Knyazev, P., Knyazeva, T., Tay, L. S., Loo, H. L., Foo, P., Wong, W., Pok, S., Lim, S. J., Ong, H., Luo, M., Ho, H. K., Peng, K., Lee, T. C., Bezler, M., Mann, C., Gaertner, S., Hoefler, H., Iacobelli, S., Peter, S., Tay, A., Brenner, S., Venkatesh, B., Ullrich, A. Genetic alterations in the tyrosine kinase transcriptome of human cancer cell lines. *Cancer Res.* 67, 11368-11376 (2007).
113. Smith, F. M., Vearing, C., Lackmann, M., Treutlein, H., Himanen, J., Chen, K., Saul, A., Nikolov, D., Boyd, A. W. Dissecting the EphA3/Ephrin-A5 interactions using a novel functional mutagenesis screen. *J. Biol. Chem.* 279, 9522-9531 (2004).
114. Zogopoulos, G., Jorgensen, C., Bacani, J., Montpetit, A., Lepage, P., Ferretti, V., Chad, L., Selvarajah, S., Zanke, B., Hudson, T. J., Pawson, T., Gallinger, S. Germline EPHB2 receptor variants in familial colorectal cancer. *PLoS ONE* 3, e2885 (2008).
115. Lee, H. S., Nishanian, T. G., Mood, K., Bong, Y. S., Daar, I. O. EphrinB1 controls cell-cell junctions through the Par polarity complex. *Nature Cell Biol.* 10, 979-986 (2008).
116. Leroy, C. Fialin, C., Sirvent, A., Simon, V., Urbach, S., Poncet, J., Robert, B., Jouin, P., Roche, S. Quantitative phosphoproteomics reveals a cluster of tyrosine kinases that mediates SRC invasive activity in advanced colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 69, 2279-2286 (2009).
117. Genander, M., Halford, M. M, Xu, N. J., Eriksson, M., Yu, Z., Qiu, Z., Martling, A., Greicius, G., Thakar, S., Catchpole, T., Chumley, M. J., Zdunek, S., Wang, C., Holm, T., Goff, S. P., Pettersson, S., Pestell, R. G., Henkemeyer, M., Frisén, J. Dissociation of EphB2 signaling pathways mediating progenitor cell proliferation and tumor suppression. *Cell* 139, 679-692 (2009).
118. Fang, W. B., Brantley-Sieders, D. M., Parker, M. A., Reith, A. D., Chen, J. A kinase-dependent role for EphA2 receptor in promoting tumor growth and metastasis. *Oncogene* 24, 7859-7868 (2005).
119. Yang, N. Y., Pasquale, E. B., Owen, L. B., Ethell, I. M. The EphB4 receptor-tyrosine kinase promotes the migration of melanoma cells through Rho-

- mediated actin cytoskeleton reorganization. *J. Biol. Chem.* 281, 32574-32586 (2006).
120. Hess, A. R., Seftor, E. A., Gruman, L. M., Kinch, M. S., Seftor, R. E., Hendrix, M. J. VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: implications for vasculogenic mimicry. *Cancer Biol. Ther.* 5, 228–233 (2006).
  121. Carles-Kinch, K., Kilpatrick, K. E., Stewart, J. C., Kinch, M. S. Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior. *Cancer Res.* 62, 2840-2847 (2002).
  122. Duxbury, M. S., Ito, H., Zinner, M. J., Ashley, S. W., Whang, E. E. EphA2: a determinant of malignant cellular behavior and a potential therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* 23, 1448–1456 (2004).
  123. Landen, C. N. Jr., Chavez-Reyes, A., Bucana, C., Schmandt, R., Deavers, M. T., Lopez-Berestein, G., Sood, A. K. Therapeutic EphA2 gene targeting *in vivo* using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Res.* 65, 6910-6918 (2005).
  124. Fang, W. B., Ireton, R. C., Zhuang, G., Takahashi, T., Reynolds, A., Chen J. Overexpression of EPHA2 receptor destabilizes adherens junctions via a RhoA-dependent mechanism. *J. Cell Sci.* 121, 358-368 (2008).
  125. Larsen, A. B., Pedersen, M. W., Stockhausen, M. T., Grandal, M. V., van Deurs, B., Poulsen, H. S. Activation of the EGFR gene target EphA2 inhibits epidermal growth factor-induced cancer cell motility. *Mol. Cancer Res.* 5, 283-293 (2007).
  126. Brantley-Sieders, D. M., Zhuang, G., Hicks, D., Fang, W. B., Hwang, Y., Cates, J. M., Coffman, K., Jackson, D., Bruckheimer, E., Muraoka-Cook, R. S., Chen, J. The receptor tyrosine kinase EphA2 promotes mammary adenocarcinoma tumorigenesis and metastatic progression in mice by amplifying ErbB2 signaling. *J. Clin. Invest.* 118, 64-78 (2008).
  127. Lida, H., Honda, M., Kawai, H. F., Yamashita, T., Shirota, Y., Wang, B. C., Miao, H., Kaneko, S. Ephrin-A1 expression contributes to the malignant characteristics of  $\alpha$ -fetoprotein producing hepatocellular carcinoma. *Gut* 54, 843-851 (2005).
  128. Campbell, T. N., Attwell, S., Arcellana-Panlilio, M. & Robbins, S. M. Ephrin A5 expression promotes invasion and transformation of murine fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350, 623-628 (2006).
  129. Tanaka, M., Sasaki, K., Kamata, R., Sakai, R. The C-terminus of ephrin-B1 regulates metalloproteinase secretion and invasion of cancer cells. *J. Cell Sci.* 120, 2179-2189 (2007).
  130. Jiang, G., Freywald, T., Webster, J., Kozan, D., Geyer, R., DeCoteau, J., Narendran, A., Freywald, A. In human leukemia cells ephrin-B-induced invasive activity is supported by Lck and is associated with reassembling of lipid raft signaling complexes. *Mol. Cancer Res.* 6, 291-305 (2008).
  131. Nakada, M., Anderson, E. M., Demuth, T., Nakada, S., Reavie, L. B., Drake, K. L., Hoelzinger, D. B., Berens, M. E. The phosphorylation of ephrin-B2

- ligand promotes glioma cell migration and invasion. *Int. J. Cancer* 126, 1155-1165 (2010).
132. Miyazaki, Y., Nakano, M., Sato, H., Truesdale, A. T., Stuart, J. D., Nartey, E. N., Hightower, K. E., Kane-Carson, L. Design and effective synthesis of novel templates, 3,7-diphenyl-4-amino-thieno and furo-[3,2-c]pyridines as protein kinase inhibitors and *in vitro* evaluation targeting angiogenetic kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 250-254 (2007).
133. Bardelle, C., Cross, D., Davenport, S., Kettle, J. G., Ko, E. J., Leach, A. G., Mortlock, A., Read, J., Roberts, N. J., Robins, P., Williams, E. J. Inhibitors of the tyrosine kinase EphB4. Part 1: structure-based design and optimization of a series of 2,4-bis-anilinopyrimidines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 2776-2780 (2008).
134. Bardelle, C., Coleman, T., Cross, D., Davenport, S., Kettle, J. G., Ko, E. J., Leach, A. G., Mortlock, A., Read, J., Roberts, N. J., Robins, P., Williams, E. J. Inhibitors of the tyrosine kinase EphB4. Part 2: structure-based discovery and optimisation of 3,5-bis substituted anilinopyrimidines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 5717-5721 (2008).
135. Karaman, M. W., Herrgard, S., Treiber, D. K., Gallant, P., Atteridge, C. E., Campbell, B. T., Chan, K. W., Ciceri, P., Davis, M. I., Edeen, P. T., Faraoni, R., Floyd, M., Hunt, J. P., Lockhart, D. J., Milanov, Z. V., Morrison, M. J., Pallares, G., Patel, H. K., Pritchard, S., Wodicka, L. M., Zarrinkar, P. P. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnol.* 26, 127-132 (2008).
136. Chang, Q., Jorgensen, C., Pawson, T., Hedley, D. W. Effects of dasatinib on EphA2 receptor tyrosine kinase activity and downstream signalling in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 99, 1074-1082 (2008).
137. Gendreau, S. B., Ventura, R., Keast, P., Laird, A. D., Yakes, F. M., Zhang, W., Bentzien, F., Cancilla, B., Lutman, J., Chu, F., Jackman, L., Shi, Y., Yu, P., Wang, J., Aftab, D. T., Jaeger, C. T., Meyer, S. M., De Costa, A., Engell, K., Chen, J., Martini, J. F., Joly, A. H. Inhibition of the T790M gatekeeper mutant of the epidermal growth factor receptor by EXEL-7647. *Clin. Cancer Res.* 13, 3713-3723 (2007).
138. Brantley, D. M., Cheng, N., Thompson, E. J., Lin, Q., Brekken, R. A., Thorpe, P. E., Muraoka, R. S., Cerretti, D. P., Pozzi, A., Jackson, D., Lin, C., Chen, J. Soluble Eph A receptors inhibit tumor angiogenesis and progression *in vivo*. *Oncogene* 21, 7011-7026 (2002).
139. Cheng, N., Brantley, D., Fang, W. B., Liu, H., Fanslow, W., Cerretti, D. P., Bussell, K. N., Reith, A., Jackson, D., Chen, J. Inhibition of VEGF-dependent multistage carcinogenesis by soluble EphA receptors. *Neoplasia* 5, 445-456 (2003).
140. Dobrzanski, P., Hunter, K., Jones-Bolin, S., Chang, H., Robinson, C., Pritchard, S., Zhao, H., Ruggeri, B. Antiangiogenic and antitumor efficacy of EphA2 receptor antagonist. *Cancer Res.* 64, 910-919 (2004).
141. Martiny-Baron, G., Korff, T., Schaffner, F., Esser, N., Eggstein, S., Marmé, D., Augustin, H. G. Inhibition of tumor growth and angiogenesis by soluble EphB4. *Neoplasia* 6, 248-257 (2004).

142. Kertesz, N., Krasnoperov, V., Reddy, R., Leshanski, L., Kumar, S. R., Zozulya, S., Gill, P. S. The soluble extracellular domain of EphB4 (sEphB4) antagonizes EphB4-EphrinB2 interaction, modulates angiogenesis, and inhibits tumor growth. *Blood* 107, 2330-2338 (2006).
143. Murai, K. K., Nguyen, L. N., Koolpe, M., McLennan, R., Krull, C. E., Pasquale, E. B. Targeting the EphA4 receptor in the nervous system with biologically active peptides. *Mol. Cell Neurosci.* 24, 1000-1011 (2003).
144. Koolpe, M., Burgess, R., Dail, M., Pasquale, E. B. EphB receptor-binding peptides identified by phage display enable design of an antagonist with ephrin-like affinity. *J. Biol. Chem.* 280, 17301-17311 (2005).
145. Mao, W., Luis, E., Ross, S., Silva, J., Tan, C., Crowley, C., Chui, C., Franz, G., Senter, P., Koeppen, H., Polakis, P. W. EphB2 as a therapeutic antibody drug target for the treatment of colorectal cancer. *Cancer Res.* 64, 781-788 (2004).
146. Jackson, D., Gooya, J., Mao, S., Kinneer, K., Xu, L., Camara, M., Fazenbaker, C., Fleming, R., Swamynathan, S., Meyer, D., Senter, P. D., Gao, C., Wu, H., Kinch, M., Coats, S., Kiener, P. A., Tice, D. A. A human antibody-drug conjugate targeting EphA2 inhibits tumor growth *in vivo*. *Cancer Res.* 68, 9367-9374 (2008).
147. Gobin, A. M., Moon, J. J., West, J. L. EphrinA I-targeted nanoshells for photothermal ablation of prostate cancer cells. *Int. J. Nanomedicine* 3, 351-358 (2008).
148. Noberini, R., Koolpe, M., Peddibhotla, S., Dahl, R., Su, Y., Cosford, N. D., Roth, G. P., Pasquale, E. B. Small molecules can selectively inhibit ephrin binding to the EphA4 and EphA2 receptors. *J. Biol. Chem.* 283, 29461-29472 (2008).
149. Baell, J. B., Holloway, G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J. Med. Chem.* 53, 2719-2740 (2010).
150. Miao, H., Burnett, E., Kinch, M., Simon, E., Wang, B. Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 2, 62-69 (2000).
151. Tanaka, M., Kamata, R., Sakai, R. EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of Claudin-4 and mediates paracellular permeability. *J. Biol. Chem.* 280, 42375-42382 (2005).
152. Katona, B. W., Anant, S., Covey, D. F., Stenson, W. F. Characterization of enantiomeric bile acid-induced apoptosis in colon cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* 284, 3354-3364 (2009).
153. Makishima, M., Okamoto, A. Y., Repa, J. J., Tu, H., Learned, R. M., Luk, A., Hull, M. V., Lustig, K. D., Mangelsdorf, D. J., Shan, B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284, 1362-1365 (1999).
154. Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., Fukusumi, S., Habata, Y., Itoh, T., Shintani, Y., Hinuma, S., Fujisawa, Y., Fujino, M. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J. Biol. Chem.* 278, 9435-9440 (2003).

155. Katona, B. W., Cummins, C. L., Ferguson, A. D., Li, T., Schmidt, D. R., Mangelsdorf, D. J., Covey, D. F. Synthesis, characterization and receptor interaction profiles of enantiomeric bile acids. *J. Med. Chem.* 50, 6048-6058 (2007).
156. Thomas, C., Pellicciari, R., Pruzanski, M., Auwerx, J., Shoonjans, K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 7, 678-693 (2008).
157. Reddy, B. S., Martin, C. W., Wynder, E. L. Fecal bile acids and cholesterol metabolites of patients with ulcerative colitis, a high-risk group for development of colon cancer. *Cancer Res.* 37, 1697-1701 (1997).