

**DOTTORATO DI RICERCA
IN
SCIENZE CLINICHE E FARMACO-
TOSSICOLOGICHE VETERINARIE
XX° CICLO**

**IDENTIFICAZIONE DI NUOVI POSSIBILI
TARGET FARMACOLOGICI NEL CARCINOMA
URINARIO IN *Bos taurus*.**

Docente Guida

Ch.ma Prof. ssa Antonia Lucisano

Candidata

Dott.ssa Cinzia Raso

Coordinatore

Ch.mo Prof. Angelo Persechino

triennio 2004-2007

INDICE

1- INTRODUZIONE

1.1 Lesioni della Vescica: patologia	pag.2
1.2 <i>Pteridium aquilinum</i>	5
1.3 Ematuria Enzootica Bovina	7
1.4 Papillomavirus Bovino	8
1.5 Platenet-derived Growth Factor Receptor β	10
1.6 Interazione PDGF β R-E5	14
1.7 Scopo del Lavoro	19

2- PROCEDURE SPERIMENTALI

2.1 Preparazione dei campioni di tessuto	19
2.2 Immunoprecipitazione di proteine	20
2.3 Elettroforesi e Western Blotting	21
2.4 Spettrometria di Massa	22
2.5 Preparazione di linee cellulari	23

3 - RISULTATI

3.1 Immunoprecipitazione	25
3.2 Analisi Pathways Molecolari	26
3.3 Spettrometria di Massa	26
3.4 Isolamento Cellule.....	26

4 – CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

36

5 – BIBLIOGRAFIA

44

INTRODUZIONE

Il carcinoma alla vescica viene considerato una patologia comune principalmente in animali domestici come il cane; nel quale, come risulta da recenti statistiche, rappresenta l'1% di tutti i tumori ²³. Negli altri animali domestici, tranne che nei bovini o negli animali di laboratorio, il carcinoma alla vescica viene considerato un evento raro. Diversi lavori dimostrano come, in alcune zone del mondo, sussista un'alta incidenza di tumore alla vescica, che deriva, in buona parte dei casi, dall'ingestione cronica di un particolare tipo di felce, lo *Pteridium aquilinum* ⁶.

1. 1 Lesioni alla Vescica: patologia

Le lesioni della vescica sono di vario tipo e gravità. In generale esse vengono suddivise in tre grandi categorie: lesioni infiammatorie, anomalie epiteliali non-neoplastiche, neoplasie.

Le vesciche vengono considerate sane quando la mucosa presenta da 3 a 7 strati di cellule uroteliali di transizione, incluse le cellule superficiali, intermedie e basali. Sotto lo strato epiteliale troviamo la lamina propria, con uno strato interrotto muscolare, costituito dalla mucosa muscolare che sovrasta uno strato muscolare proprio, la muscolatura del muro vescicale.

Lesioni Vescicali: le più frequenti sono le cistiti polipoidi e follicolari; entrambe deformano il profilo della parete vescicale. In particolare, le cistiti polipoidi vengono diagnosticate quando la lamina propria infiammata crea degli strati mucosali allungati ricoperti da normale urotelio; le cistiti follicolari invece, vengono diagnosticate quando follicoli linfoidi si intravedono nella lamina propria.

Le anomalie epiteliali non neoplastiche vengono divise in iperplasia, nidi di von Brunn, cistite cistica, metaplasia ghiandolare e adenoma nefrogenico. L'iperplasia è contraddistinta da un aumento degli strati cellulari di transizione, sia pavimentati che ondulati. I cosiddetti nidi di Von Brunn sono costituiti da aggregati compatti, circolari, di cellule di transizione nella lamina propria, non necessariamente connessi alla superficie dell'epitelio. Se questi aggregati presentano un lume centrale vengono classificati come cistite cistica.

La metaplasia ghiandolare è caratterizzata da colonie di cellule epiteliali contenenti muco, allineate sulla superficie della vescica oppure formanti aggregati nella lamina propria. L'adenoma nefrogenico è costituito da una proliferazione nella lamina propria dalla struttura simile ad un tubulo renale, associata a colonne di cellule epiteliali.

Neoplasie: le formazioni neoplastiche possono, in alcuni casi, essere localizzate nel sito di insorgenza, nella maggioranza dei casi però presentano la tendenza a diffondersi all'interno della vescica stessa. La morfologia delle formazioni neoplastiche può variare molto. Si riconoscono delle crescite che si estendono sulla superficie epiteliale, di forma vescicolare con diametro variabile da pochi millimetri a diversi centimetri, peduncolate o meno, emorragiche o meno direttamente dipendenti dalla vascolarizzazione.

Le neoplasie epiteliali o papillomi sono le formazioni neoplastiche benigne più comuni, con uno stroma fibrovascolare formante delle papille, ricoperte di epitelio di transizione indistinguibile dal normale urotelio sia negli strati di cellule che nella loro polarità. Le neoplasie benigne vengono divise in adenomi, papillomi e neoplasie papillari con apparente basso potenziale di malignità (PNALMP).

Tra le neoplasie epiteliali maligne si considera il carcinoma a cellule transienti, l'adenocarcinoma ed il carcinoma a cellule squamose.

Il carcinoma a cellule transienti (TCC) è costituito da epitelio transizionale anaplastico con diverso grado di trasformazione. TCCs possono essere classificati in base a due diversi criteri: il tasso di crescita ci permette di distinguere i carcinomi in papillari, invasivi o non papillari e non infiltranti. Il grado di invasività invece permette di valutare la presenza di cellule neoplastiche o meno nella lamina propria, submucosa o muscolare propria. In base a ciò esiste un secondo tipo di classificazione: Ta dove non si trova infiltrazione; T1 con infiltrazioni nella lamina propria e nella muscosa muscolare; T2 con infiltrazioni nella muscolare propria. Da un punto di vista istologico vengono distinti in formazioni micropapillari, vasali e microcistici. Micropapillare si riferisce alla formazione di branche ramificate distribuite nello stroma tumorale. Formazioni vasali consistono in profonde infiltrazioni nella lamina propria degli aggregati circolari. Il pattern microcistico corrisponde alla crescita transizionale che forma cisti con diversa forma, mentre, l'epitelio che lo circonda presenta diversi strati cellulari.

Il carcinoma a cellule squamose è caratterizzato da aree di formazione squamosa con formazione di perle di cheratina. Molti tumori presentano grandi dimensioni, occupando la maggior parte della superficie della vescica.

Neoplasie mesenchimali sono di natura prevalentemente vascolare. Le neoplasie cavernose o capillari, constano di una moltitudine di vasi ben differenziati con un endotelio molto simile a capillari, che circonda l'area della lamina propria.

Gli emangiosarcomi vengono diagnosticati quando la massa tumorale è composta da vasi sanguigni, altamente infiltranti con aree solide e cistiche e con la costante presenza di atipia cellulare. Gli emangioendoteliomi sono stati intermedi tra emangiomi ed emangiosarcomi. Sono costituiti sia da aree di crescita solida che da aree con forte infiltrazione di vasi; l'atipia cellulare è rara e la capacità infiltrante è presente in foci discreti.

I fibromi, gli unici tumori mesenchimali non vascolari, sono caratterizzati da proliferazione di fibroblasti ben circoscritti e non incapsulati ²⁶. Classificazione simile si riscontra anche nei tumori del cane ²⁵.

In ultima analisi, Roperto et al dimostrarono che i tumori metastatici presentano un marker specifico di tumorigenesi, chiamato Uroplakina IIIb, appartenente ad una famiglia di proteine integrali di membrana, altamente conservate nella filogenesi. Queste proteine si ritrovano organizzate in complessi cristallini chiamate placche uroteliali, tipiche delle cellule uroteliali dei mammiferi. In particolare si pensa che queste uroplakine possano essere utilizzate per identificare i vari stadi di crescita tumorale ²⁴.

1.2 Pteridium aquilinum

Lo *pteridium aquilinum* o felce aquilina è considerato come una delle piante più comuni del pianeta, viene infatti ritrovata endemica in tutti i continenti eccettuato l'Antartide. Risale al 1967 uno dei primi lavori riguardante la tossicità di questa pianta, Pamukcu e colleghi dimostrarono in bovini alimentati volontariamente con *Pteridium aquilinum* l'insorgenza di neoplasie in diverse distretti corporei ¹⁴. Essi correlarono la stretta dipendenza dell'insorgenza della malattia con la continua ingestione della felce e l'insorgenza dell'ematuria con forte diminuzione dei globuli bianchi e delle piastrine. Introdussero anche l'idea che l'emorragia è uno dei primi sintomi dell'avvelenamento severo da *Pteridium aquilinum*.

Intossicazioni subletali possono causare immunosoppressione, rendendo sia uomini che animali particolarmente suscettibili all'azione di patogeni come il papillomavirus bovino BPV4-2 ⁷. Normalmente gli animali non assumono grandi quantità di felce; ma tale eventualità può comunque verificarsi quando le felci sono nello stadio di germoglio, tenere e facilmente commestibili, oppure

quando gli animali necessitano di fibra. L'ematuria che ne deriva, riscontrata in tutte le regioni del mondo, dove ovini e bovini si alimentano con *Pteridium aquilinum*, viene chiamata Bovine Enzootic Haematuria.

La sindrome emorragica viene indotta da un glucoside, lo ptaquiloside, presente nello *pteridium aquilinum* fortemente tossico, clastogenico, mutagenico citotossico e carcinogenico, che causa i danni peggiori in associazione ad altre sostanze con effetti immunosoppressivi ⁹.

Chimicamente può essere definito come uno Spiro[cyclopropane-1,5'-[5H]inden]-3'(2'H)-one,7'a-(β-D-glucopyranosyloxy)-1',3'a,4',7'a-tetrahydro-4'-hydroxy-2',4',6'-trimethyl-, (2'R,3'aR,4'S,7'aR) (Fig. 1.2).

Esso è una molecola fortemente instabile in soluzione acquosa, la cui attività viene fortemente influenzata dal pH. Risulta stabile a pH neutro, mentre a pH acido reagisce formando un prodotto chiamato Pterosina B, e a pH basico forma un dienone instabile, dopo la liberazione di una molecola di glucosio. La formazione del dienone in condizioni basiche spiega la localizzazione dei tumori ¹⁰.

L'azione del dienone si manifesta sul Dna ¹⁷, poiché esso è capace di formare addotti con N7 in guanina e N3 in adenina ^{11, 59}. La presenza dei differenti metaboliti è stata rilevata recentemente utilizzando la spettrometria di massa ¹³.

Da recenti studi sembra inoltre che bovini alimentati con *Pteridium aquilinum* sviluppino nell'ileo delle mutazioni precoci nel codone 61 di H-ras, mediata dall'alchilazione di una adenina. In esperimenti condotti su topi sembra che si sviluppino, nel 60% degli animali trattati, due tipi di mutazioni, a carico dei codoni 58 e 59 dell'esone 2 di H-ras ¹⁵. Però mentre la mutazione nel codone 58 è in terza base, per cui non causa alterazioni nell'aminoacido Thr, nel codone 59 si verifica una transizione da G ad A, oppure una trasversione da G a T che corrisponde ad un cambio da Ala a Thr oppure da Ala a Ser. La proteina risultante dal gene Ras, p21, è una GTP binding protein con attività

intrinseca GTPasica, strettamente connessa alla regolazione della proliferazione cellulare. Gli stessi autori riscontrarono mutazioni nel codone 58-61 del Dna di origine bovina, tale differenza può essere spiegata col fatto che la sequenza del gene di H-ras in quella regione risulta profondamente differente rispetto a quella del topo. L'interpretazione più accettabile rispetto a questo dato riguardante le due mutazioni riguarda la capacità dello ptaquiloside di alchilare l'adenina N3 nel solco minore, causando una depurinazione. L'autore quindi suggerisce che la A nell'ultima posizione del codone 58 venga sottoposta ad alchilazione da parte dello ptaquiloside, che provoca la depurinazione che si verifica o nell'ultima posizione del codone 58 o nella prima del codone 59⁶⁷.

Recentemente, essendo stato rilevato un alto tasso di tumori gastrici in uomini che avevano trascorso la loro infanzia in luoghi infestati da felci, è stato ipotizzato che il latte possa rappresentare un veicolo di contaminazione¹² in quanto il principio attivo risulta escreto nel latte in grande quantità. Acque che attraversano suoli infestati da ampie popolazioni di felce⁶⁴ risultano contaminate dallo ptaquiloside.

1.3 Ematuria Enzootica Bovina

La Bovine Enzootic Haematuria o ematuria enzootica bovina è una malattia che si presenta in aree ben distinte in tutti i continenti. L'incidenza mondiale non è enorme, ma la malattia può causare perdite di molti capi in aree dove la felce è presente, con conseguente forte danno economico. Tale malattia, ha un decorso usualmente fatale. Possono essere colpiti non solo i bovini maggiori di 1 anno ma anche pecore e bufali esposti a pasture infestate per periodi superiori a 2 anni. La malattia è caratterizzata dalla presenza di tumori nella vescica urinaria e causa forte ematuria, assottigliamento delle pareti della vescica⁸ e indebolimento dell'animale. L'assunzione continua di circa 1 kg di felce al

giorno causa l'assottigliamento dell'epitelio gutturale in ovini e bovini, emorragie diffuse negli organi interni, ed anemia aplastica negli organi. I primi segnali della patologia sono disidratazione e secchezza della pelle; febbre compresa tra 40,5 e 43°C; stomatite, diarrea severa; epistassi ed emorragie enteriche e delle vie genitali. Frequente è anche la comparsa di edema nella regione della gola con frequenti fenomeni di compressione laringea e dispnea evidente.

Infezioni secondarie della vescica possono portare allo sviluppo di cistiti o pielonefriti. In assenza di grosse ematurie, un campione di urine può essere centrifugato ed il deposito esaminato per valutare la presenza di eritrociti. L'anemia può essere diagnosticata anche con l'esame emocromocitometrico. All'esame post mortem i tessuti della carcassa appaiono chiari, pallidi. Le urine contengono normalmente sangue, ma, ad un esame più attento si possono evidenziare emangiomi nella sub mucosa del tratto urinario. Sono presenti neoplasie di diversa natura e grado, inclusi i carcinomi a cellule di transizione, emangiosarcomi, adenomi, fibromi e papillomi. Tale malattia non prevede trattamento, se non trasfusioni di sangue nei casi più gravi (Fig.1.1).

1.4 Papillomavirus

I componenti della famiglia dei papillomavirus sono omogeneamente distribuiti in natura, e possono essere distinti in base alla natura dell'organismo target. Sono una famiglia di virus costituiti da Dna a doppio filamento e possono causare, nell'organismo ospite, infezioni di diversa natura. In molti casi tali infezioni sono self-limiting, ma occasionalmente possono progredire fino ad indurre la creazione di formazioni neoplastiche. Alcuni papillomavirus, inclusi i papillomavirus specifici per i bovini (BPV) sono capaci di trasformare

in vitro cellule di roditori, ma la produzione del virus avviene solo successivamente in colture di tipo tissutale.

Tra tutti gli appartenenti alla famiglia dei papillomavirus, BPV-1 è forse quello più studiato, gli altri appartenenti allo stesso gruppo si avvicinano fortemente alla sua organizzazione. Il papillomavirus bovino BPV-1 presenta un Dna a doppio filamento, contenuto in un capsidico costituito da proteine di forma sferica, composto da 72 capsomeri. Il capsidico è costituito da due proteine strutturali L1 e L2. Il genoma virale è associato ad istoni, derivanti dall'ospite, a formare una struttura simile alla cromatina e può essere diviso in due domini: il primo dominio è costituito dalla regione E (early) contenente 8 ORFs o open reading frames, codificanti per proteine coinvolte nella replicazione del Dna, nella regolazione della trascrizione e nella trasformazione cellulare. Il secondo dominio è chiamato L (late) e contiene 2 ORFs codificanti per i polipeptidi strutturali del virione, L1 e L2. Tutte le ORFs sono localizzate sullo stesso filamento del Dna virale. Nelle cellule trasformate, la replicazione del Dna può essere divisa in due grandi fasi: inizio e mantenimento. Nella fase di inizio il genoma virale viene amplificato da un basso numero di copie ad un numero moderato: 20-300 copie per cellula ^{3,4}. Tali frammenti vengono quindi mantenuti nella fase successiva, il loro numero finale viene determinato da un fattore essenziale, che si ipotizza sia la proteina E2, uno dei maggiori regolatori della replicazione e trascrizione virale. La replicazione di BPV-1 richiede che le sequenze iniziatrici o ORI lavorino in cis, mentre le proteine E1 ed E2 agiscano in trans ².

Mentre E1 sembra sia il fattore direttamente implicato nella replicazione del Dna, un ruolo ausiliario viene attribuito ad E2 per alterare la capacità di legare il Dna di E1. In particolare, E1 mostra una specificità di sequenza bassa, ma la interazione con E2, a livello dell'estremità N-ter del dominio di transattivazione ¹⁶ durante l'inizio della replicazione causa un effetto

cooperativo risultante in un riconoscimento ancora più esatto della sequenza ORI da parte di E1. L'assemblaggio di E1 ad ORI è seguito dalla distorsione del Dna in corrispondenza delle sequenze ricche in A/T. L'attività di elicasi di E1 che inizia il processo di replicazione srotolando il Dna, favorisce il legame con il complesso RPA, e termina con l'interazione con il complesso Dna-polimerasi-primasi. L'azione di E2 si esplica eliminando la repressione indotta dal nucleosoma mediante il reclutamento delle proteine leganti il singolo filamento dell'ospite o RPA¹. Per il mantenimento nella cellula ospite dei minicromosomi è richiesto anche una regione regolatrice, tale funzione viene mediata attraverso legami non covalenti tra il genoma virale ed i cromosomi cellulari dell'ospite durante la mitosi. E2 presenta infine anche un ruolo di segregazione regolato mediante fosforilazione ben separato da quello di amplificatore della replicazione⁵.

1.5 Platenet-derived Growth Factor Receptor β

Il fattore di crescita delle piastrine o PDGF, è stato identificato nel 1974, come un fattore di crescita nelle piastrine umane per fibroblasti, cellule muscolari e cellule gliali. Esistono tre diverse isoforme di PDGF, chiamate AA, AB, BB, si differenziano unicamente per la localizzazione sulla catena polipeptidica coinvolta nella dimerizzazione. I due recettori che legano le varie forme di PDGF vengono distinti nelle forme α e β ed appartengono alla grande famiglia dei recettori tirosin chinasi. La struttura della porzione extracellulare può essere divisa in 5 domini Ig-like di cui solo gli ultimi tre in posizione N-terminale si trovano legati mediante ponti disolfuro. Altri tre sono coinvolti nel legame con il substrato specifico. Una caratteristica di questi recettori consiste nella divisione dei domini tirosin chinasi, cioè ogni dominio risulta costituito da due porzioni chinasiche separate da almeno 100 amminoacidi non catalitici.

I recettori PDGFR α e β presentano rispettivamente un peso molecolare pari a 170 e 180 kDa e sono caratterizzati da 1063 aa e 1067 aa, in entrambi i casi dopo l'escissione della sequenza segnale. Entrambi i recettori subiscono modificazioni post-traduzionali come glicosilazione N-linked ed in alcuni casi anche O-linked ¹⁸.

Nell'uomo il gene per il recettore α è localizzato sul cromosoma 4q12, mentre il gene per il recettore β è localizzato sul cromosoma 5.

Il meccanismo di azione classico si basa sull'interazione specifica con PDGF, che induce dimerizzazione, giustapposizione delle regioni intracellulari del recettore con conseguente autofosforilazione e attivazione della cascata del segnale a valle. Poiché PDGF è una molecola dimerica essa può legare due recettori simultaneamente, formando così un ponte tra i recettori. La regione di legame è quindi localizzata nei tre domini Ig-like esterni, mentre il secondo dominio sembra quello interessato alla stabilità del legame ¹⁹. La autofosforilazione in trans indotta crea due effetti fondamentali: il primo riguarda la tirosina 857 nel recettore β , che porta ad un significativo aumento dell'efficienza catalitica del dominio specifico ²⁰; in secondo luogo l'autofosforilazione dei residui di tirosina localizzati al di fuori del dominio chinasi crea delle tasche di interazione per molecole di trasduzione del segnale contenenti domini di tipo SH2. Tali domini SH2 sono sequenze di circa 100 aminoacidi che possono legare tirosine fosforilate in uno specifico ambiente²⁰. Molte proteine contenenti domini SH2 legano PDGF β R, come fosfatidil inositolo 3 chinasi (PKC), c-Src, STAT ecc.²¹. (Fig. 1.3)

1.6 Interazione PDGF β R – E5

I virus sono attualmente oggetto di studi, sia per la loro importanza in campo strettamente medico, sia perché forniscono la possibilità di studiare le tappe

fondamentali di processi fisiologici e patologici cellulari. Poiché i virus si sono evoluti utilizzando importanti processi cellulari, essi possono fornire esempi di come manipolare tali processi. Diversi oncovirus trasformano le cellule codificando per delle piccole proteine virali che attivano pathway stimolatori di crescita cellulare, un meccanismo chiamato “trasformazione virocrina”³⁰.

In particolare la piccola proteina E5 del papillomavirus bovino è capace di trasformare le cellule mediante un unico meccanismo che coinvolge l’attivazione ligando indipendente stabile del PDGF β R²⁷.

La proteina E5 del papillomavirus bovino è una proteina transmembrana di 44 aminoacidi molto idrofobica che può indurre cambiamenti morfologici e tumorigenici in fibroblasti di roditori ed umani. Essa si trova localizzata principalmente nelle membrane del Reticolo Endoplasmatico e dell’Apparato di Golgi delle cellule trasformate. Esiste sotto forma di dimero di due identiche subunità associate da ponti disolfuro che coinvolgono residui di cisteine dell’estremità carbossi-terminale della proteina. Tale proteina non sembra avere attività enzimatica intrinseca, ma permette la trasformazione delle cellule alterando la normale funzionalità di proteine di membrana che regolano la crescita cellulare. L’espressione della proteina E5 induce attivazione costitutiva esclusivamente di PDGF β R, ma non di recettori correlati come EGFR o la stessa forma α del recettore. Tale legame comporta la formazione di alti livelli di fosfotirosine e attività di tirosin chinasi in vitro, sottintendendo che E5 possa indurre dimerizzazione e trans-fosforilazione del recettore^{31,28}.

Nelle cellule trasformate E5 esiste come un omodimero transmembrana di tipo II associato da ponti disolfuro; la capacità di trasformazione viene data da Gln17, Asp33 e da due cisteine conservate all’estremità carbossi-terminale che mediano la formazione dei ponti disolfuro. Mutazioni nelle cisteine di E5 nelle posizioni 37,39, nella glutammina 17, nell’acido aspartico 33, inibiscono la formazione del complesso con PDGF β R, l’attivazione del complesso e la

trasformazione cellulare. In maniera simile, mutazioni a carico di PDGF β R sulla treonina 513 transmembrana e la lisina 499 iuxtamembrana prevengono la formazione del complesso²⁹.

Ogni dimero di E5 lega due molecole di PDGF β R, causando dimerizzazione del recettore e fosforilazione delle tirosine in ogni monomero del recettore. In realtà, da recenti studi risulta che E5 non attiva tutte le molecole di PDGF β R presenti nella cellula in quel momento, ma solo una porzione, o indurre una emifosforilazione che comunque causa un'attivazione delle proteina SH2 binding domain interagenti con il recettore emifosforilato²⁹. La formazione di tale complesso è altamente specifica e dipende esclusivamente dall'interazione di sequenza a carico del tratto transmembrana (Fig.1.4).

Si ha quindi la formazione di un'interazione stabile⁶⁰; in particolare da studi di struttura sembra che E5 e PDGF β R si orientino nella membrana in maniera antiparallela, cosicché E5 lega due molecole di PDGF β R sui due lati dell'omodimero²⁷ (Fig.1.5).

Quando la sequenza iuxtamembrana/transmembrana di E5 e PDGF β R si trovano allineate in maniera antiparallela si crea un appaiamento di lisina/acido aspartico e di glutammina/treonina. Questo suggerisce che il complesso viene stabilizzato principalmente da legami elettrostatici tra la lisina e l'acido glutammico giustapposti nel tratto iuxtamembrana; e da legami idrogeno o interazioni da packaging tra la treonina e la glutammina transmembrana²⁹.

Borzacchiello e colleghi nel 2006 hanno dimostrato non solo la presenza di tale interazione in tessuti di carcinoma urinario nel bovino, ma anche che la proteina E5 si ritrova solo nei tessuti trasformati e anche nei diversi stadi di evoluzione tumorale, lasciando ipotizzare una sua forte implicazione nella tumorigenesi⁶¹.

1.7 Scopo del Lavoro

Allo scopo di contribuire al chiarimento dei processi alla base dell'insorgenza del carcinoma della vescica in *Bos taurus*, in questa ricerca sono stati utilizzati campioni di tessuto del suddetto carcinoma a diversi stadi di tumorigenesi, prelevati al mattatoio da bovini che presentavano i sintomi classici dell'ematuria cronica bovina.

I lisati proteici ottenuti sono stati sottoposti ad immunoprecipitazione per valutare la presenza della proteina E5 del papillomavirus bovino di tipo II, una proteina capace di indurre cambiamenti morfologici e tumorigenici nei fibroblasti di roditori ed umani, nonché la presenza del recettore PDGF β , appartenente alla famiglia dei recettori tirosin chinatici e mediante opportuni anticorpi il suo grado di fosforilazione.

Con l'impiego del western blot e, ove necessario, con l'impiego di anticorpi, abbiamo poi valutato se esiste interazione tra E5 e PDGF β R, la natura di essa oltre che la possibile attivazione della cascata del segnale a valle del PDGF β R.

Sono state anche impiegate tecniche di spettrometria di massa per l'identificazione di proteine che possano interagire con l'E5 e il PDGF β R e che potranno, in un futuro, costituire fattori prognostici o target per nuove molecole farmacologicamente attive.

Infine sono state allestite colture di cellule da tessuti neoplastici da impiegare per testare l'effetto antineoplastico di nuove molecole farmacologicamente attive.

I risultati di questo studio possono essere ritenuti utili in quanto contribuiscono a dare chiarimenti sui meccanismi di azione delle molecole implicate nel processo di carcinogenesi e ad individuare nuove sostanze farmacologicamente attive da usare nella prognosi e nella cura del carcinoma urinario bovino.

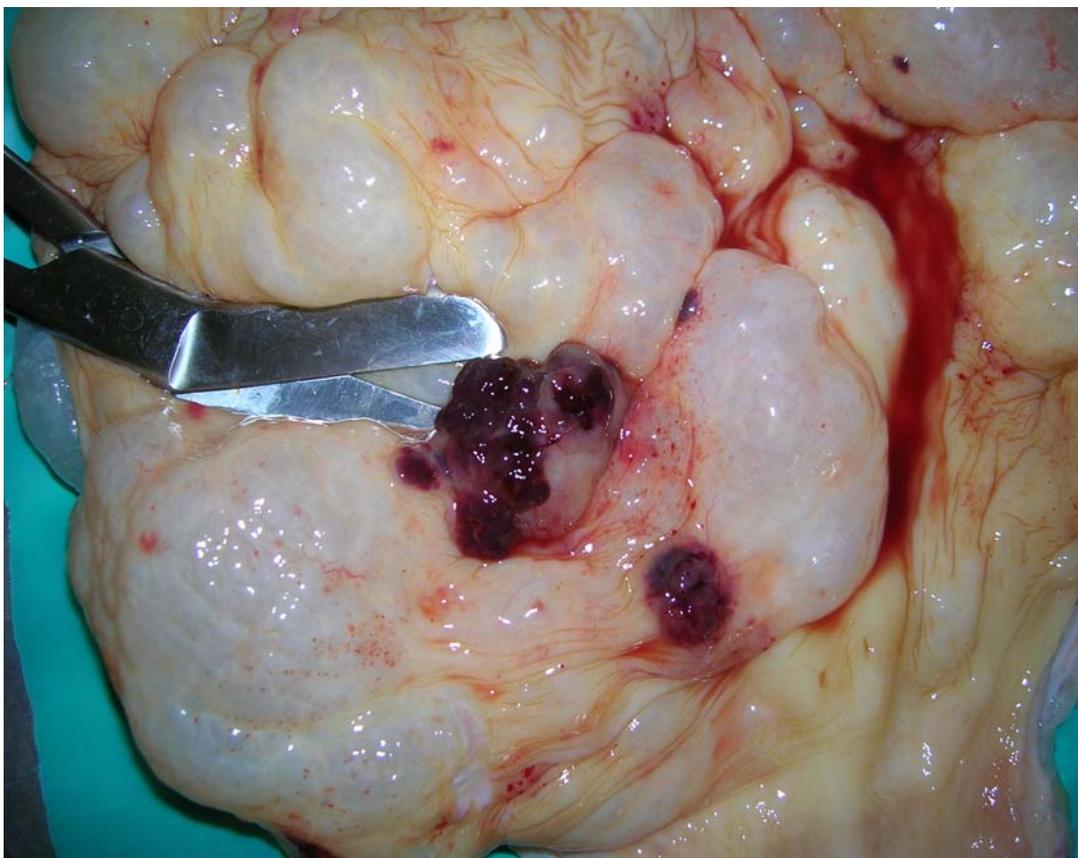


Fig. 1.1 Foto di emangiosarcomi in una vescica estratta da *Bos taurus*.

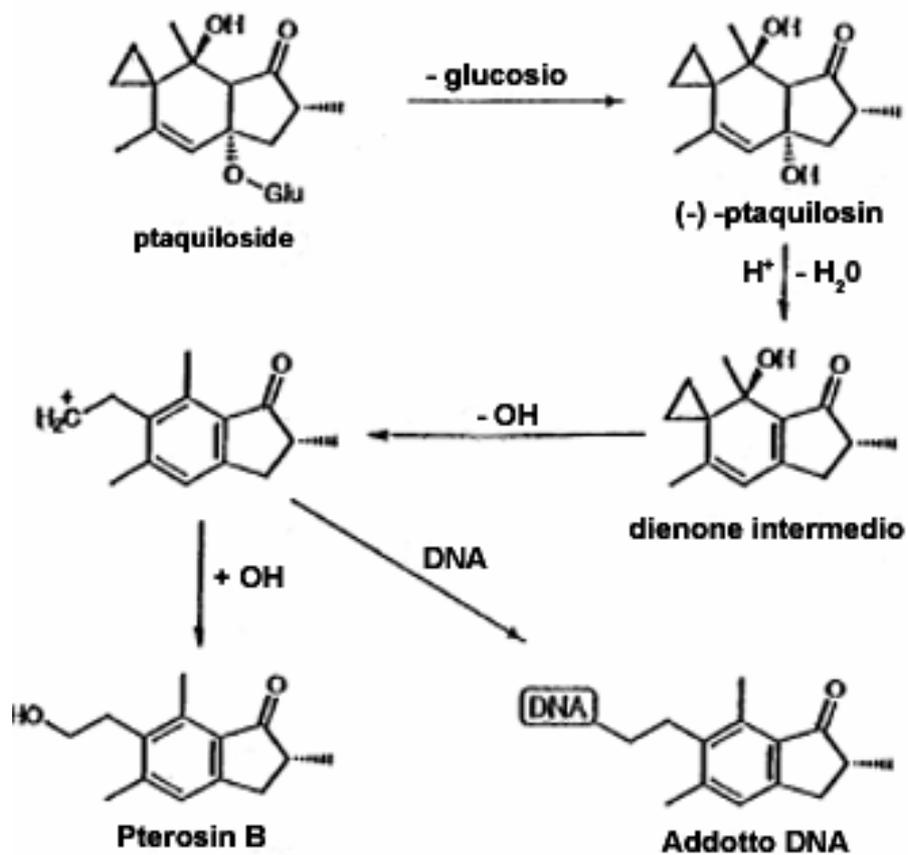


Fig. 1.2 Via metabolica seguita dallo ptaquiloside dopo ingestione.



Fig.1.3 Allineamento tra la sequenza della proteina E5 di BPV2 e della regione transmembrana di PDGFβR.(Ripresa da Di Maio et al., 2000).

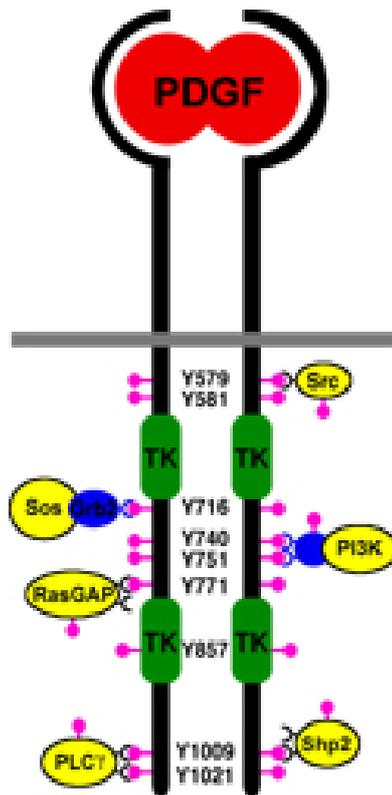


Fig. 1.4 Rappresentazione delle regioni di interazioni con proteine aventi domini SH2.

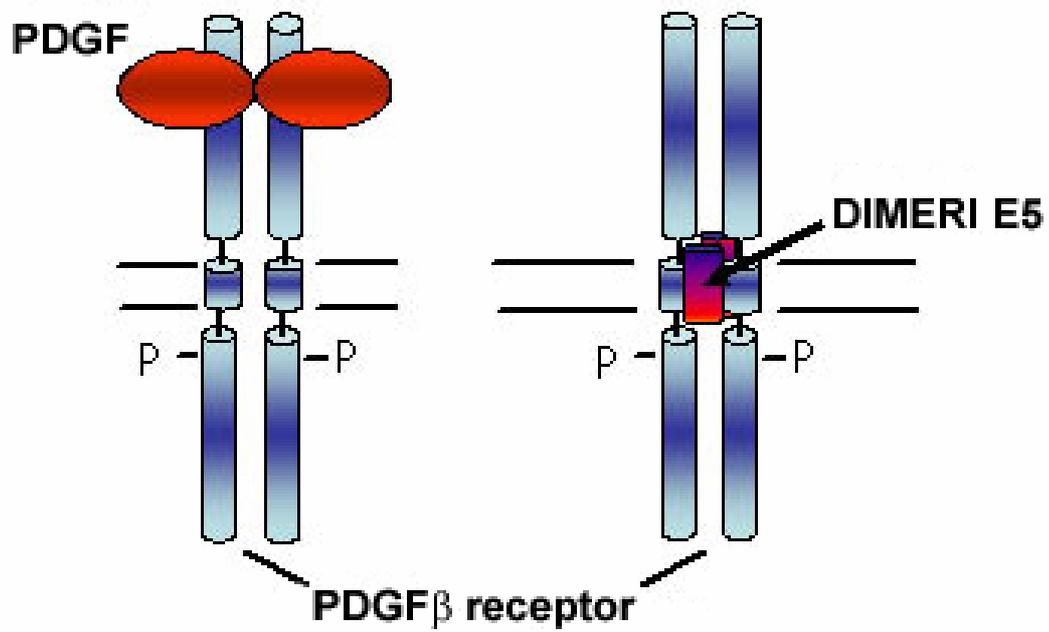


Fig. 1.5 Rappresentazione schematica della regione transmembrana responsabile della interazione tra la proteina E5 di BPV2 e PDGFβR.

PROCEDURE SPERIMENTALI

2.1 Preparazione dei campioni di tessuto

Campioni di tessuto sono stati prelevati da animali di 4-24 mesi di età che presentavano i sintomi classici dell'ematuria cronica bovina e da animali sani (da usare come controllo). I prelievi fatti al locale mattatoio sono stati realizzati con la massima cura onde evitare contaminazioni.

Dopo il prelievo i tessuti sono stati immersi in formalina 10% tamponata, e successivamente in paraffina per approntare le sezioni da sottoporre all'esame isto-patologico.

I tessuti destinati all'analisi molecolare, immediatamente dopo il prelievo, sono stati immersi in azoto liquido; e successivamente conservati a -80°C . Questa procedura è stata effettuata nel minor tempo possibile in modo da evitare che subentrasse la degradazione proteica.

Ogni campione è stato pesato, tagliando frammenti di circa 5 mg, ed immerso nel lysis buffer apposito, quindi sottoposto ad omogeneizzazione con Ultra-Turrax T8 Ika-Werke, mantenendo il materiale in ghiaccio. Il lysis buffer è composto da DTT 1mM, PMSF 2mM, Aprotinin 1,7 mg/ml, NaF 25mM, Na_3VO_4 1mM, NaCl 150 mM, Tris-HCl 50mM pH 7,5, Triton X-100 1,5%. I lisati sono stati mantenuti in ghiaccio per 30' ed infine chiarificati mediante centrifugazione a 13.000 rpm per 30'. La concentrazione proteica dei singoli campioni è stata determinata mediante l'uso del saggio modificato Bradford.

Il saggio Bradford è un metodo colorimetrico utilizzato per la quantificazione delle proteine. Esso si basa sull'uso di un colorante, il Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) (Bio-Rad), capace di legarsi alle proteine a carico dei residui di arginina, triptofano, tirosina, istidina e fenilalanina. Tale legame è possibile solo per amminoacidi in forma anionica, con un'assorbanza massima registrabile a 595 nm (blu). Per la determinazione

della concentrazione proteica è stato necessario realizzare una retta standard utilizzando delle quantità note di una proteina purificata ed a concentrazione nota, creando infine una retta concentrazione/assorbanza. E' stata usata la BSA (albumina di siero bovino) a concentrazione nota di 10 mg/ml con le opportune diluizioni. I valori di concentrazione per singolo campione incognito sono stati ottenuti per interpolazione.

I campioni di lisato, dopo essere stati prepurificati, sono stati sottoposti a tre procedure diverse: immunoprecipitazione, western blot e spettrometria di massa.

2.2 Immunoprecipitazione di proteine

Ogni campione costituito da 1 mg di lisato proteico, è stato sottoposto a prepurificazione per eliminare quanti più composti aspecifici possibile in modo da ridurre il rumore di fondo.

A tal fine sono stati utilizzati 30 μ l di resina agarosio associata alla proteina G (Sigma), incubati con 1 μ g normal Ig (Santa Cruz) corrispondente alle specifiche caratteristiche dell'anticorpo utilizzato per l' immunoprecipitazione. Il lisato è stato esposto overnight a 4°C in rotazione dapprima alla resina preventivamente legata alle normal Ig, e poi, per un ugual periodo di tempo, ad 1 μ g di anticorpo specifico, anti PDGF β R o anti E5. Sono stati fatti quindi tre lavaggi con il lysis buffer, non addizionato di DTT in modo da mantenere un ambiente non denaturante; ed infine è stato addizionato Loading Buffer (Invitrogen) ed un agente riducente specifico, come indicato dal produttore e riscaldato a 70°C per 10' in modo da favorire la scissione del complesso dalla resina. Una piccola quantità del campione è stata caricata su gel precast di poliacrilammide 4-20% (Invitrogen), mantenuto in condizioni non riducenti, e

colorato con Silver Staining, in modo da valutare il corretto andamento dell'esperimento.

Il campione ottenuto è stato poi sottoposto a western blot al fine di individuare le interazioni tra E5 e PDGF β R e ad analisi di spettrometria di massa per identificare nuovi partner di E5.

Per l'analisi dell'interazione E5-PDGF β R gli immunoprecipitati effettuati con l'anticorpo PDGF β R sono stati sottoposti immediatamente a western blot con gli anticorpi anti E5; Anti PDGF β R e anti-tyr (zymed).

2.3 Elettroforesi e Western Blotting

I campioni contenenti proteine sono stati separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE) in base al loro peso molecolare, impiegando il Laemmli buffer costituito da glicerolo 40% (Sigma), β -mercaptoetanolo 0,35M (Sigma), SDS 5% (Sigma), e Blu di Bromofenolo (Roche). Dopo l'elettroforesi sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa a 25 mA per 16h in 192mM glicina-25mM Tris-Metanolo 10%.

I filtri sono stati preincubati con una soluzione di 5% non fat dry milk (Biorad) in TTBS, (1% BSA per l'individuazione delle fosfoproteine).

Sia i diversi gel che i filtri di nitrocellulosa sono stati sottoposti a colorazione: la colorazione Comassie, caratterizzata da una soglia di sensibilità pari a 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ di proteina in gel e la colorazione con rosso ponceau (Sigma) sui filtri di nitrocellulosa per verificare il corretto trasferimento delle bande proteiche.

Dopo la colorazione le membrane sono state ibridate con l'anticorpo appropriato, sottoposte a tre lavaggi rispettivamente di 5-10-15' con TTBS, re-ibridate con il relativo anticorpo secondario, ed infine sottoposte ad ulteriori tre lavaggi di uguale tempo. Sono stati usati i seguenti anticorpi: anti-erk (cell

signaling), anti-c myc (santa cruz); antic-src (santa cruz); antip-src (santa cruz); antip-stat3 (cell signaling); anti γ -tubulina (santa cruz), anti p-tyr (zymed); anti E5, anti PDGF β R, anti decorin (santa cruz).

Gli anticorpi secondari sono antimouse e antirabbit (Amersham Biosciences).

Le proteine specifiche sono state visualizzate con un sistema di chemiluminescenza (ECL) (Enhanced Chemiluminescence) (Amersham Biosciences).

I livelli di intensità delle singole bande, sono stati misurati mediante il misuratore di intensità Scion Image che permette di visualizzare e contemporaneamente analizzare le immagini.

I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il T di Student, la significatività è stata valutata per $p < 0,001$ e $p < 0,05$.

3.6 Spettrometria di Massa

I campioni destinati alla spettrometria di massa sono stati caricati su gel precast 4-20% e sottoposti a colorazione coomassie. Si è proceduto al taglio delle bande presenti nei campioni patologici e nella corrispondente regione dei controlli per eliminare l'ipotesi che la banda non fosse presente nel controllo solo perché in quantità inferiore alla soglia di sensibilità del coomassie.

La digestione è stata effettuata seguendo il protocollo di Shevchenko et al ³². I frammenti di gel sono stati lavati con 100mM NH_4HCO_3 e acetonitrile (1:1, v/v) (buffer A). Le proteine sono state trattate in gel con 10mM DTT e successivamente alchilate con 20mM di iodoacetammide. Dopo lavaggio con buffer A, il frammento di gel è stato disidratato tramite centrifugazione sotto vuoto e quindi reidratato a 4°C in digestion buffer (50mM NH_4HCO_3 , 5mM CaCl_2) contenente 25 ng/ μl di tripsina. Dopo incubazione overnight i peptidi

sono stati estratti dal gel mediante tre lavaggi effettuati con una miscela di acetonitrile/acqua/acido formico 70/25/25 (v/v/v). Gli estratti sono stati quindi riuniti e nuovamente disidratati nella centrifuga a vuoto. Il liofilizzato ottenuto è stato ricostituito in 30µl di solvente specifico e 10 µl della soluzione iniettati nella nanoscale LC-MS/MS.

La detection MS è stata effettuata su QSTAR XL hybrid LC-MS/MS (Applied Biosystems). L'acquisizione dell'informazione è stata effettuata selezionando i due picchi più abbondanti dell'analisi MS/MS dopo aver effettuato un TOF-MS scan da 400 a 1600 m/z durato 4 secondi. Il valore soglia considerato per la selezione è stato 20 counts.

I dati sono stati confrontati con quelli della banca dati Mascot (www.matrixscience.com), (database MSDB) (updated Febbraio 2007), usando i seguenti parametri: tolleranza MS 20 ppm; tolleranza MS/MS 0,3 Da; modificazione stabilita cisteina carbamidometile; modificazione variabile metionina ossidata; enzima tripsina; tagli persi massimo 1; tassonomia other mammalia⁵⁸.

Sono state considerate valide le serie di proteine che consentivano di identificare almeno due peptidi con valore superiore a 22; quelle con un solo peptide con punteggio Mascot più alto della soglia di significatività (> 22) sono stati validati manualmente.

3.4 Preparazione Di Linee Cellulari

Al fine di poter testare molecole farmacologicamente attive per verificare l'effetto antineoplastico sono allestite colture di cellule da tessuti neoplastici. Un frammento di tessuto patologico di dimensioni variabili è stato prelevato al mattatoio e trasportato al laboratorio, in condizioni quanto più sterili possibile, il frammento è stato immerso in una falcon da 50 ml riempita con DMEM

(Dulbecco's Modified Eagle Medium), preaddizionato con 10% FBS (fetal bovine serum) (Invitrogen) e Gentamicin 1% (Sigma). Il trasporto è stato effettuato in ghiaccio e non in CO₂ o azoto per evitare di compromettere la vitalità cellulare e per minimizzare la possibilità di stress meccanici. Si è proceduto, quindi, al lavaggio del pezzo con PBS o soluzione fisiologica, lo si è sminuzzato in frammenti di circa 1mm per lato, prendendo le adeguate precauzioni onde ottenere la sterilità necessaria alla crescita cellulare.

I singoli frammenti di campione sono stati immessi in una piastra petri da 100mm di diametro, con circa 1ml di DMEM addizionato e incubati con il 5% CO₂ e 37°C. Ogni giorno è stato controllato se le cellule rilasciate dai singoli frammenti fossero adese al supporto della piastra e se la loro crescita arrivasse ad un 80% di confluenza della piastra. A questo punto le cellule sono state separate e successivamente congelate con una soluzione 1: 1 di DMSO ed FBS in azoto liquido. Questo processo ha richiesto grandissima attenzione sia perché le cellule primarie sono molto sensibili agli stress meccanici e sia perché la frequenza di contaminazione è purtroppo altissima.

RISULTATI

3.1 Immunoprecipitazione

I risultati ottenuti dalle analisi in triplicato presentano risultati completamente sovrapponibili come si evidenzia in fig 3.1. I dati sono stati conseguiti mediante analisi di immunoprecipitazione in condizioni non riducenti e successivo western blot.

Sia nei gruppi dei campioni patologici che in quelli controllo analizzati è riscontrabile un'espressione completamente sovrapponibile di PDGF β R.

Esclusivamente nei campioni patologici, si evidenzia la presenza della proteina E5 del papillomavirus bovino BPV2.

Per valutare la possibile attivazione di PDGF β R è stato utilizzato un anticorpo che evidenziasse tutte le proteine con siti di fosforilazione in tirosina. In corrispondenza della banda propria di PDGF β R, nel campione patologico, è riscontrabile la presenza di una banda di western molto intensa, che si contrappone ad una molto meno intensa nel campione controllo.

Questo dato indica chiaramente come il campione patologico sia caratterizzato da una profonda attivazione del recettore di PDGF β R, mentre nei campioni controllo la bassa intensità di fosforilazione fa pensare ad un'attivazione fisiologica del recettore al momento del prelievo, come dimostrato da vari autori ²⁹. Tale attivazione ragionevolmente potrebbe essere dovuta al ligando fisiologico PDGF, mentre nei campioni patologici può essere dovuta alla presenza esclusiva di E5.

3.2 Analisi Pathways Molecolari

I risultati ottenuti mediante analisi di western blot indicano chiaramente una forte attivazione delle seguenti vie: p-erk, p-src, p-stat3, c-src, c-myc (Fig. 3.2).

Tale attivazione si delinea mediante due diversi eventi: aumento della quantità della proteina come in c-src³⁴ e c-myc⁴⁶; aumento del tasso di fosforilazione come in p-erk³⁹, p-src³³, p-stat3⁵³.

Abbiamo focalizzato l'attenzione su tali molecole poiché esse rappresentano le vie attivate dall'interazione di PDGFβR con il suo naturale ligando.

I dati quantitativi relativi a tale attivazione sono riportati nel grafico (Fig. 3.3) e sottoposti a verifica statistica mediante Test T Student.

3.3 Spettrometria Di Massa

Gli esperimenti sono stati condotti in condizioni non riducenti, in modo da permettere la persistenza dei complessi proteici nella cellula. Le proteine descritte nelle tabelle 3.1 e 3.2 rappresentano dei potenziali interattori rispettivamente di E5 e PDGFβR⁵⁵.

I dati relativi all'analisi di spettrometria di massa sono riassunti nelle tabelle 3.1 e 3.2. Tali dati sono stati verificati mediante western blot.

Gli spettri delle singole proteine identificate sono presentati in fig 3.4, 3.5, 3.6, 3.7.

Dagli ultimi esperimenti si può evidenziare come il dato di spettrometria di massa relativo alla possibile interazione fisica tra E5 e decorina possa ritenersi confermato. Ciononostante sono in corso ulteriori conferme (Fig. 3.8).

3.4 Isolamento Cellule

L'isolamento delle cellule richiede lunghi tempi e grande manualità nel trattamento di tessuti neoplastici. Sono state ottenute delle colture di cellule tumorali da tessuti di carcinoma alla vescica, che utilizzeremo per testare delle

molecole farmacologicamente attive. Le immagini delle colture cellulari sono riportate in Fig. 3.9.

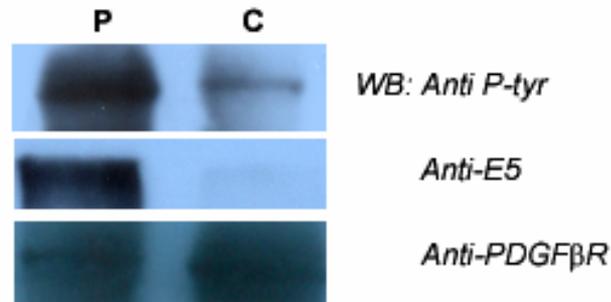


FIG 3.1. Western Blot di 1 mg di estratti totali di proteine rispettivamente di tre campioni sani e tre patologici. Gli estratti sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo anti PDGFR 1 μ g.

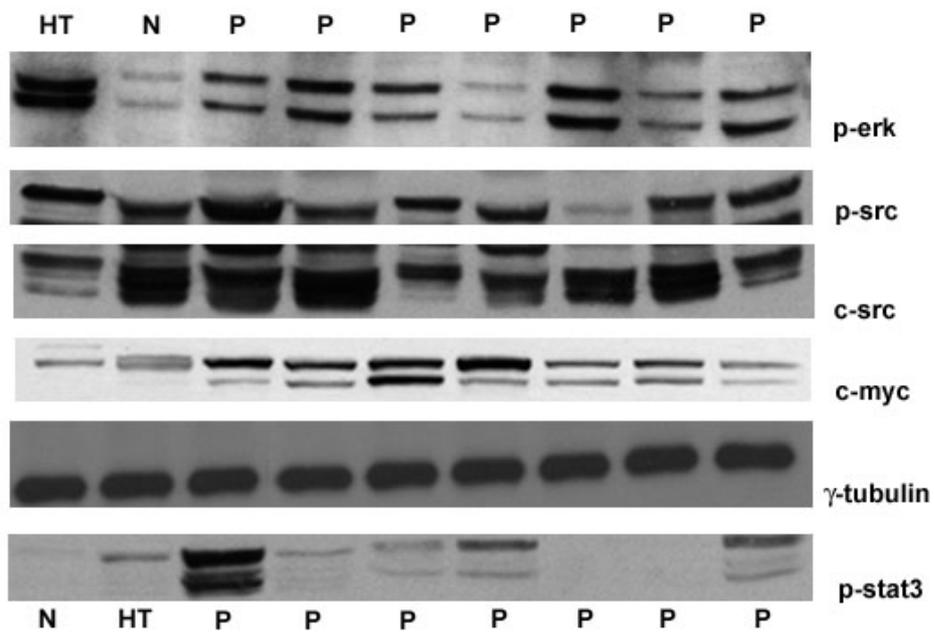


Fig. 3.2. Analisi di western blot effettuata su diversi campioni di estratti proteici tissutali di *Bos taurus*. HT indica i campioni di cellule HT1376 di carcinoma alla vescica umano. N sono campioni sani. P sono i campioni patologici.

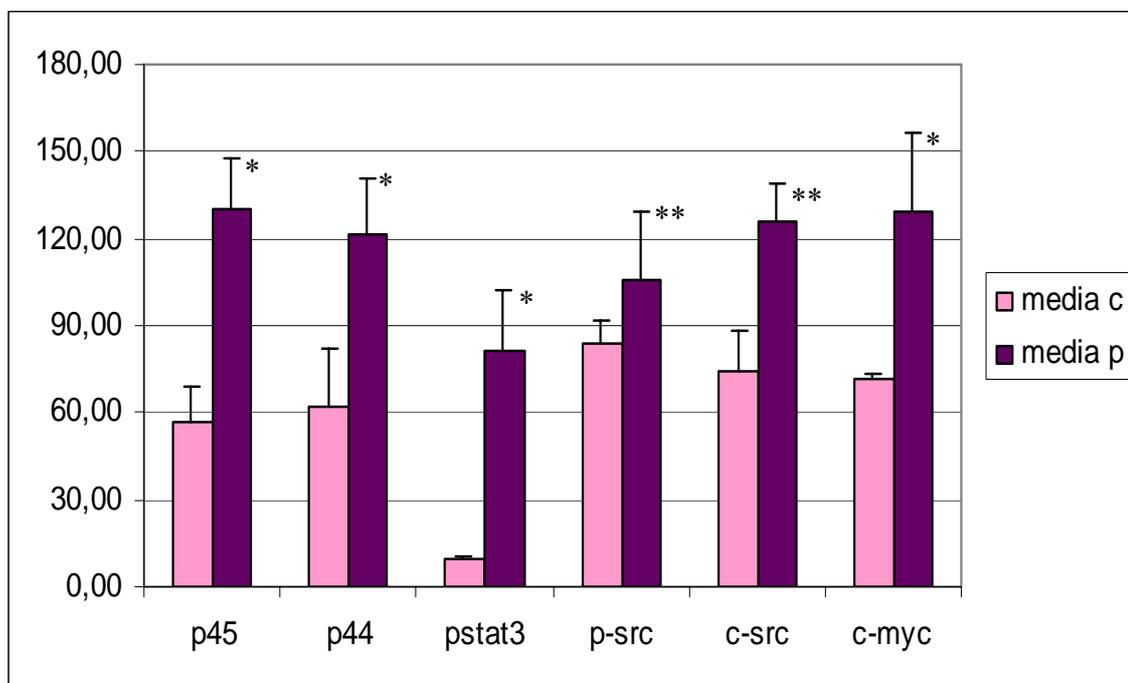


Fig. 3.3 Analisi mediante il programma Scion Image dell'intensità ottica delle bande western su lastra fotografica. Test T Student: * $p < 0,001$; ** $p < 0,05$

LC-MS/MS PER E5

<i>Accession Number</i>	<i>Protein description</i>	<i>MW (Da)</i>	<i>Mascott Score</i>	<i>N. of identified peptides</i>
A46743	Lumican	39074	34	1
Q5MIB5 sheep	Liver Glicogen Phosphorylase	97805	32	2
Q5U7W0	Decorin precursor	40154	31	2

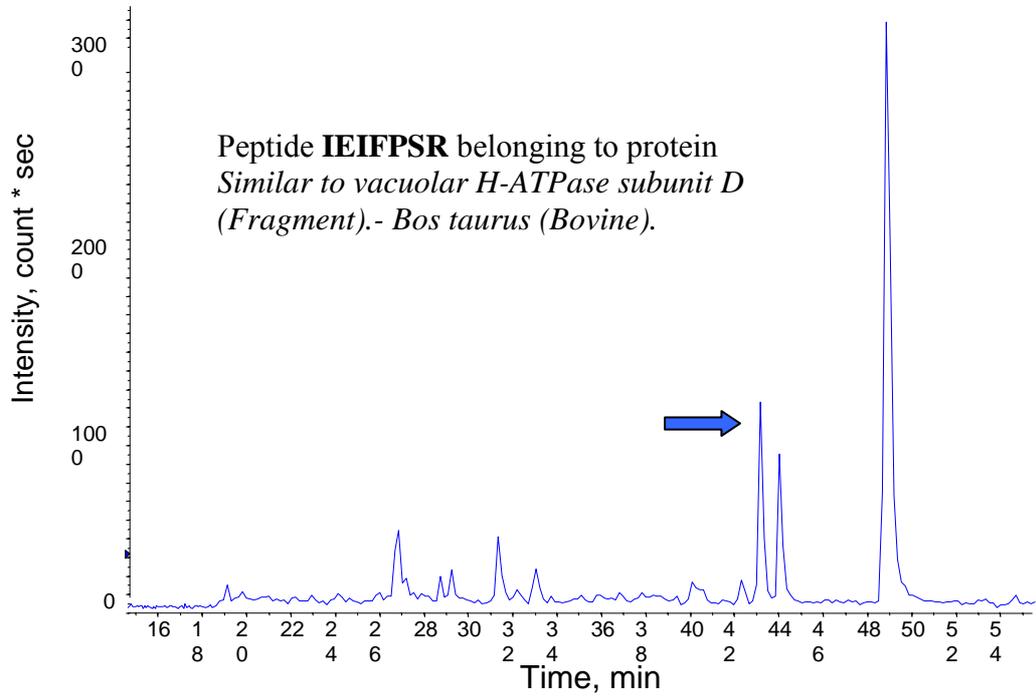
Tab. 3.1 Peptidi identificati mediante LC-MS/MS. Tali peptidi corrispondono all'immunoprecipitazione rispetto ad E5 di 1mg di estratti totali in condizioni non riducenti di campioni carcinoma della vescica in *Bos taurus*.

LC-MS/MS PER E5

<i>Accession Number</i>	<i>Protein description</i>	<i>MW (Da)</i>	<i>Mascott Score</i>	<i>N. of identified peptides</i>
Q862J3	Vacuolar H ⁺ -ATPasi Subunit D	18379	14	1

Tab. 3.2 Peptidi identificati mediante LC-MS/MS. Tali peptidi corrispondono all'immunoprecipitazione rispetto ad PDGF β R di 1mg di estratti totali in condizioni non riducenti di campioni carcinoma della vescica in *Bos taurus*.

IP:
PDGFβR
Pathological
sample



Control

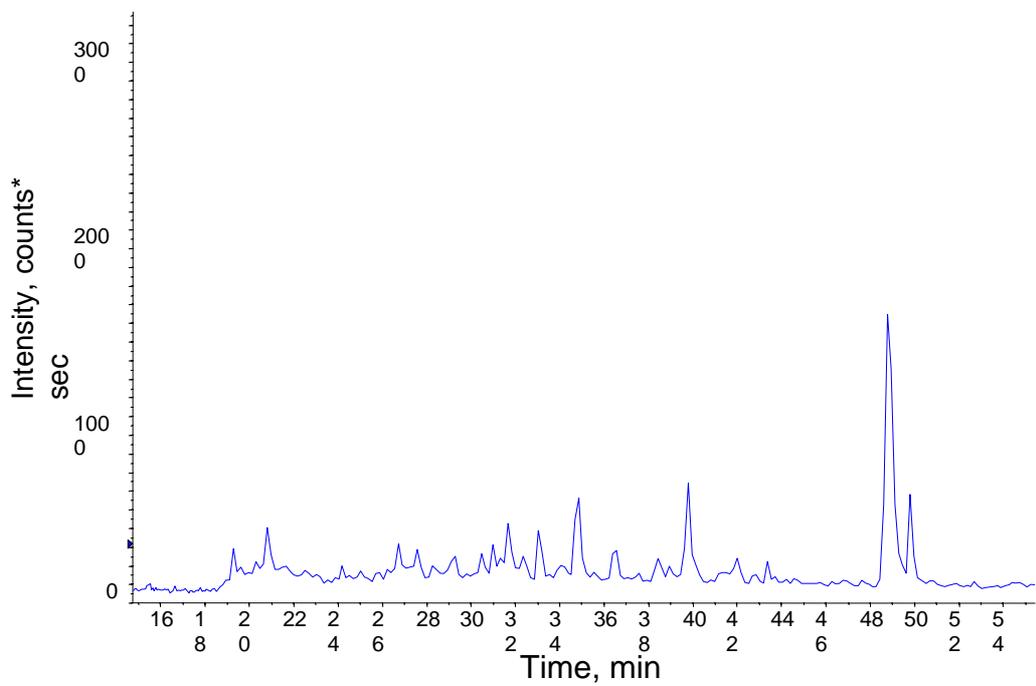
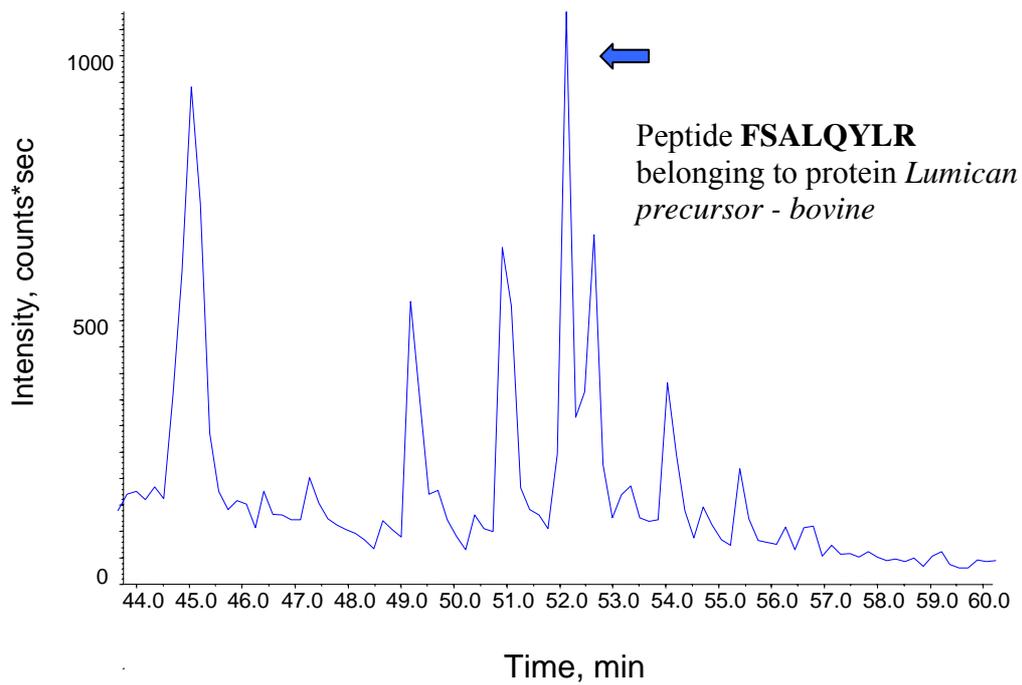


Fig.3.4

*IP: E5
Pathological
sample*



Control

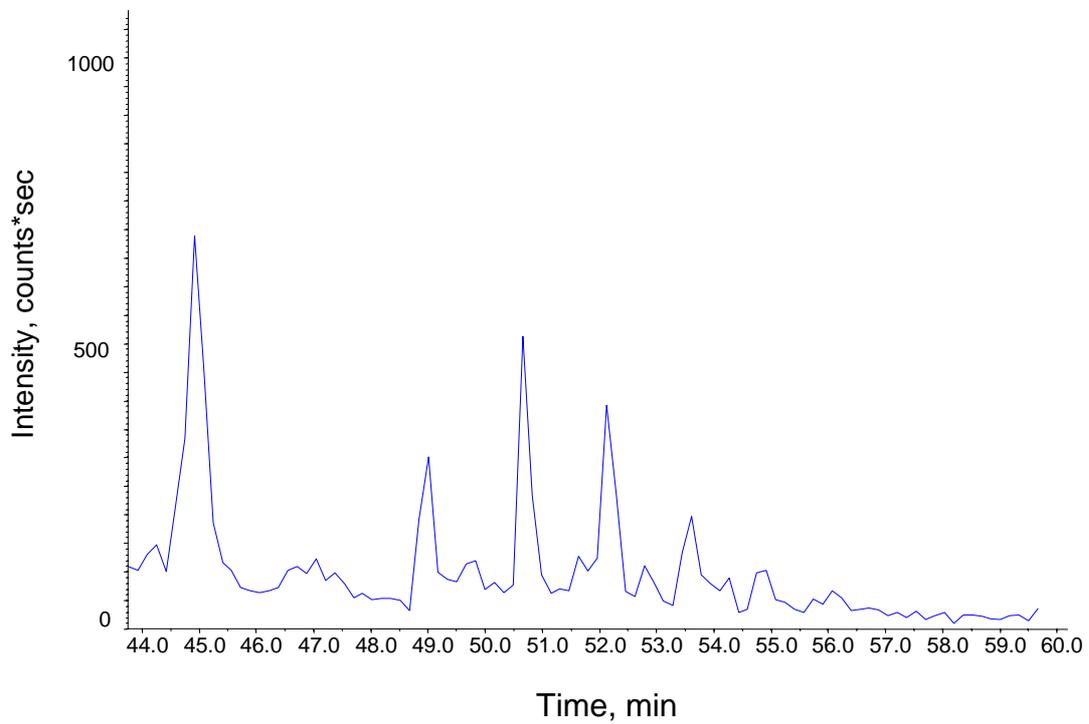
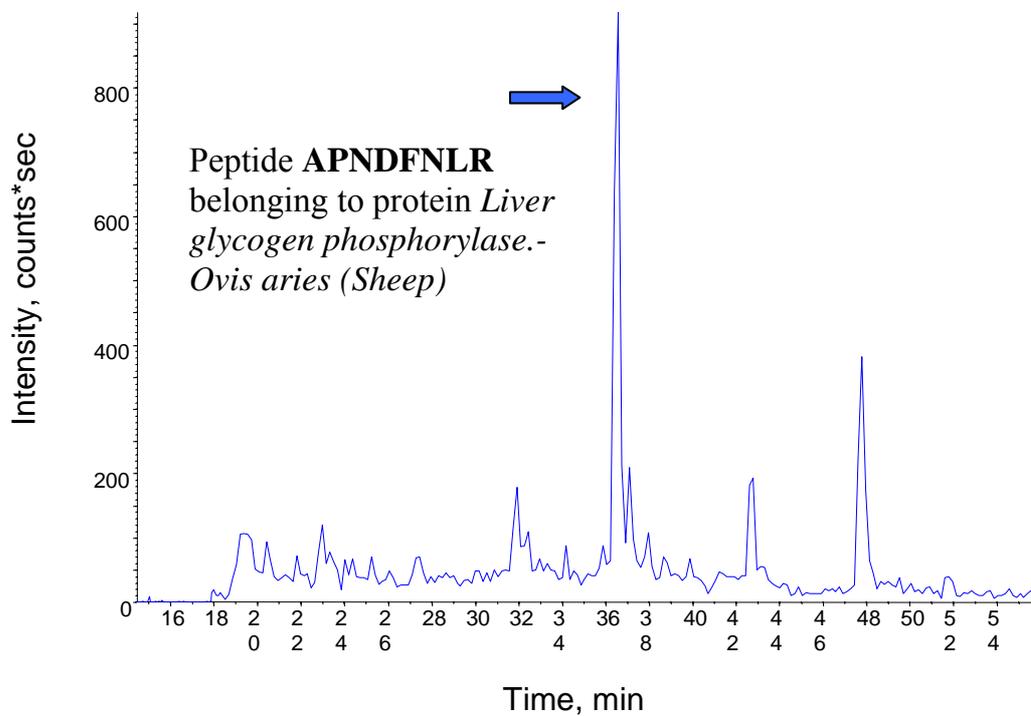


Fig. 3.5

IP: E5
Pathological
sample



Control

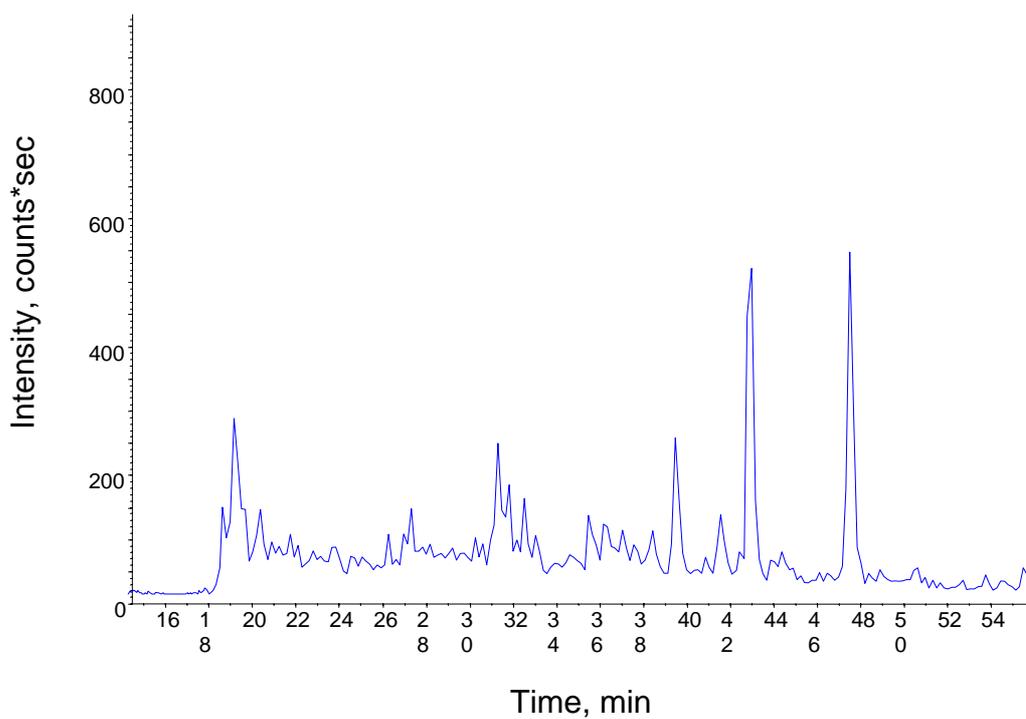
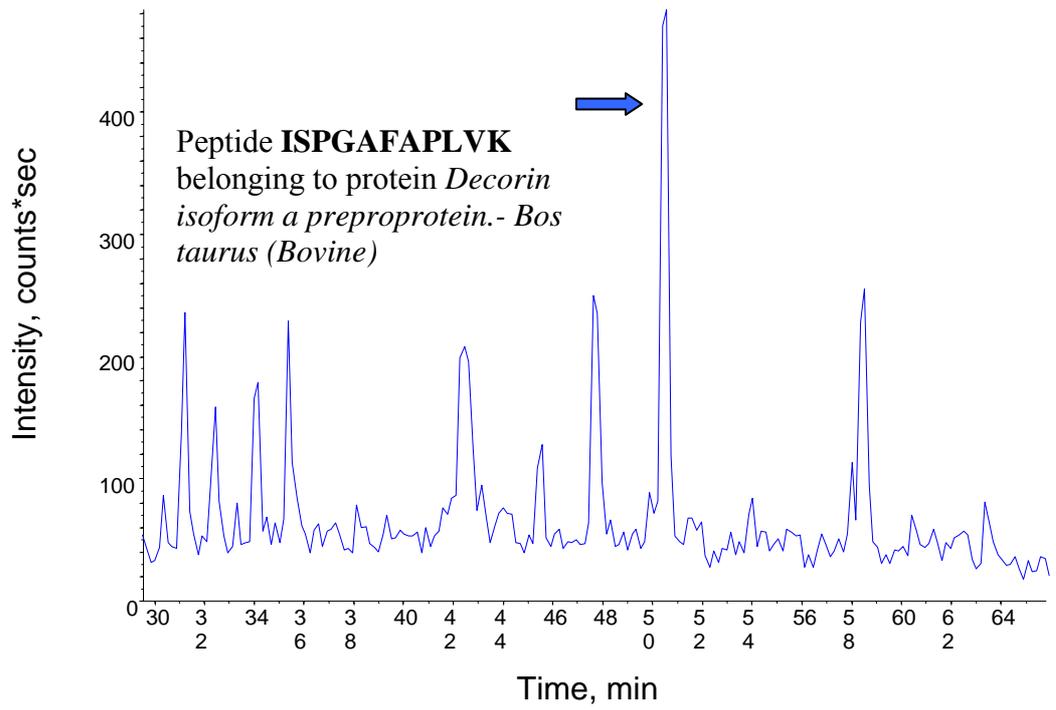


Fig. 3.6

IP: E5
Pathological
sample



Control

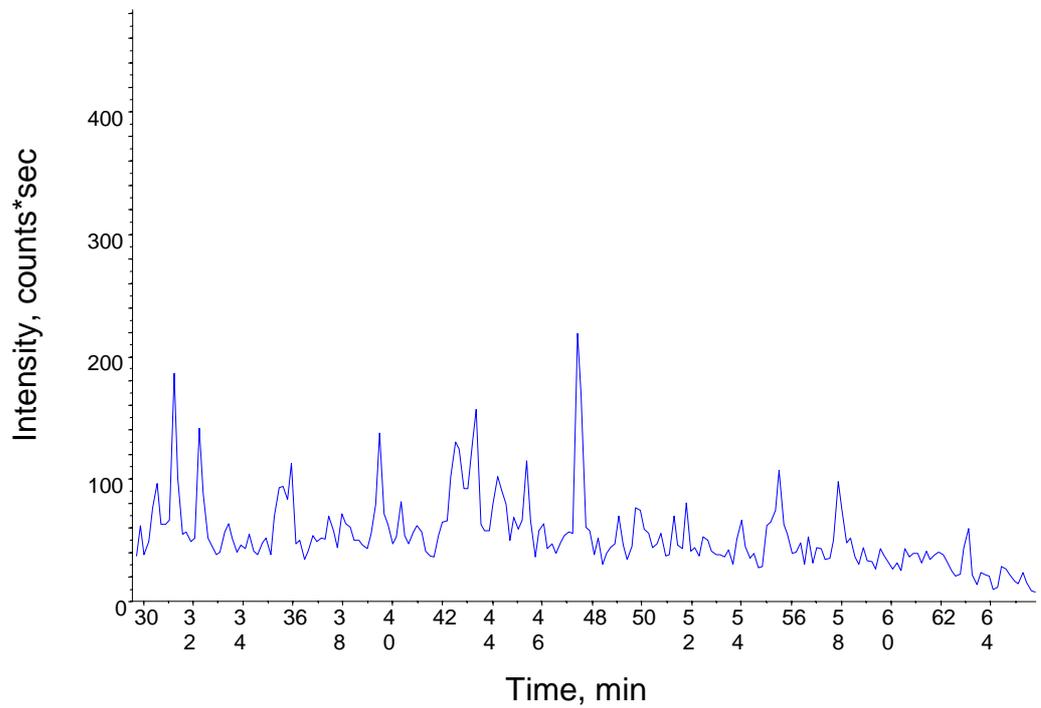


Fig.3.7

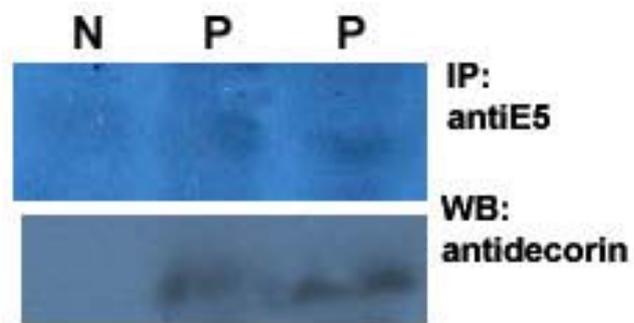


Fig. 3.8 Immunoprecipitato con anticorpo anti E5 1 μg . Western Blot con anticorpo anti decorina, anti E5 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

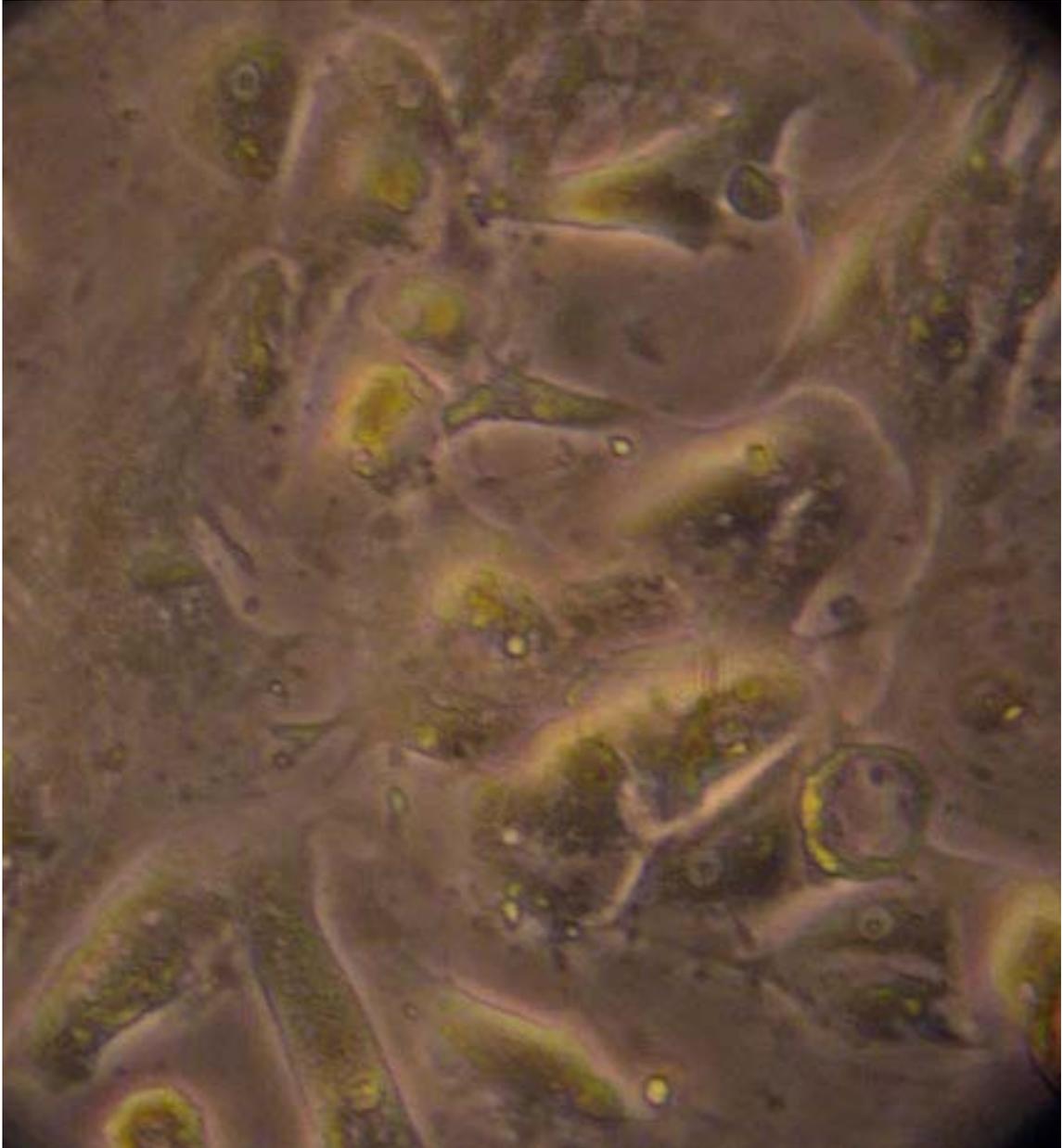


Fig.3.9 Foto di cellule primarie estratte da tessuto patologico di carcinoma alla vescica in *Bos taurus*. Le cellule sono cresciute in DMEM addizionato con 10% FBS e 1% gentamicina.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

In questo lavoro abbiamo studiato l'attività della proteina E5, proteina codificata dai geni appartenenti al papillomavirus bovino di tipo 2, ed in particolare la sua interazione con il recettore transmembrana tirosin chinasi PDGF β R. Nello studio abbiamo dimostrato che l'interazione non è solo di natura strutturale, ma anche funzionale come indica la conseguente attivazione di pathways a valle di PDGF β R. Inoltre, è stato possibile riscontrare la possibile interazione di E5 con molecole appartenenti alla classe dei proteoglicani.

Mediante immunoprecipitazione di estratti proteici relativi a tessuti patologici e tessuti controllo, abbiamo individuato e dimostrato, in carcinomi della vescica in *Bos taurus*, l'interazione di E5 con PDGF β R. I campioni sono stati immunoprecipitati rispetto alla proteina PDGF β R, in condizioni non riducenti, in modo da non alterare la formazione dei complessi proteici. I purificati sono stati quindi analizzati per western blot, con anticorpi rilevanti la presenza di PDGF β R, E5 e proteine fosforilate in tirosina.

Nei tessuti analizzati (Fig. 3.1) è presente una quantità costante del recettore nativo che presenta un'attività costitutiva attribuibile alla normale fisiologia del campione al momento del prelievo e rilevabile attraverso la fosforilazione. Nei campioni patologici, esso presenta un'intensità almeno 5 volte maggiore rispetto ai controlli nei campioni patologici positivi per la presenza di E5. Questo risultato suggerisce che si può creare una reale interazione di natura fisica tra E5 e PDGF β R, che, a sua volta causa una dimerizzazione del recettore con autofosforilazione in trans²⁹.

Le diverse molecole facenti parte della cascata a valle del recettore per il fattore di crescita PDGF sono state analizzate onde verificare una possibile attivazione

dei diversi pathways associati al recettore tirosin chinasi PDGFβR. Si è potuta riscontrare un'attivazione, di grado variabile, dei seguenti pathways: src family, erk family, myc family, stat family.

La proteina Src deriva da un gene codificante per una tirosin chinasi non recettoriale, prodotta in maniera ubiquitaria nei diversi tessuti, implicata fortemente nella proliferazione cellulare, nella crescita, nello sviluppo e nelle metastasi in molte linee tumorali umane³⁵. Esistono molte evidenze che sia la quantità della proteina Src che l'attività chinasi, risultano elevate nei tessuti neoplastici umani rispetto all'attività rilevata nei tessuti non tumorali adiacenti³⁴. La proteina Src può agire sia come proteina di membrana che come proteina citosolica ma, come risulta dal nostro studio ed in accordo con altri autori, ed in accordo con il nostro studio, l'attivazione della proteina Src può essere aumentata mediante interazione diretta o indiretta con recettori tirosin chinasi come PDGFβR³³.

La reazione catalizzata dalla proteina chinasi è la seguente:



In base alla natura del gruppo OH sottoposto a fosforilazione le proteine chinasi possono essere classificati come serina-treonina chinasi o tirosina chinasi.

La proteina Src è costituita da 536 amminoacidi, divisi in una serie di domini discreti. A partire dall'estremità N terminale e fino all'estremità C terminale, la Src mostra la presenza di 14 gruppi miristoilici agganciati al dominio SH4; in sequenza si trovano un dominio SH3, uno SH2, uno SH2 chinasi linker, caratteristico delle proteine tirosin chinasi ed, infine, un dominio regolativo C-terminale⁶². Durante la biosintesi della proteina la metionina iniziale viene rimossa, e la glicina ammino terminale reagisce con il myristoil-CoA. Tale

reazione facilita l'inserimento di Src nella membrana. Per quanto attiene la fosforilazione, uno dei più importanti siti regolativi della fosforilazione è la Tyr527, posta sei residui a monte dell'estremità C-terminale. In condizioni basali il 90-95% di Src è fosforilata in Tyr527, va però considerato che la Src va incontro anche ad una autofosforilazione in Tyr416, presente nel loop di attivazione, e la sua fosforilazione promuove l'attività chinasi.

L'autofosforilazione in Tyr857 indotta dalla dimerizzazione di PDGFβR è importante per due funzioni: un aumento dell'efficienza catalitica della chinasi che causa l'autofosforilazione del residuo di tirosina localizzata fuori dal dominio chinasi, e la creazione di una tasca per le molecole della trasduzione del segnale contenenti il dominio SH2²¹. Elevati livelli di Src si ritrovano in neoplasie umane come fegato, ovario, esofago. Nei tumori solidi è stato dimostrato che si ha un aumento della quantità di proteina e del suo tasso di fosforilazione che provoca un aumento della sua attività.

Questo causa numerose interazioni tra la Src ed il pathway di ras, o delle integrine provocando distruzione del complesso catenina/caderina e sviluppo delle metastasi ed aumento della crescita tumorale attraverso l'induzione dell'espressione di Bcl-x_L³³.

La Src, per queste caratteristiche, può quindi essere considerata un ottimo target per una terapia farmacologica basata sull'uso di inibitori della sua funzione. Un esempio è l'uso del pyrazolo [3,4-d] pirimidina in cellule di tumore alla prostata che provoca una riduzione della proliferazione, della motilità e cambiamento fenotipico³⁶.

Extracellular signal-regulated kinases 1-2 (Erk 1-2) sono componenti della famiglia delle serina-treonina chinasi, a loro volta appartenenti alla via di trasduzione del segnale delle protein chinasi attivate da mitogeni o MAPK. Queste proteine sono costituite da una regione, avente una funzione non ben

conosciuta, posta tra il subdominio X e XI del core catalitico. La regione può essere attivata dalla fosforilazione in residui di tirosina o serina-treonina. Generalmente le MAPK sono regolate da una cosiddetta cascata di fosforilazione³⁷. Due protein chinasi iniziali attivano normalmente la sequenza di proteine a valle. Normalmente Erk 1-2 vengono fosforilate in maniera sequenziale dapprima sulla tirosina, e, solo in un secondo momento, sulla treonina. In realtà, quando la fosforilazione avviene solo sulla tirosina queste molecole non divengono attive, ma si deve raggiungere un certo livello di fosforilazione sulla treonina affinché si attivi il segnale a valle³⁸.

Tutto ciò si determina per il coinvolgimento della membrana cellulare, che porta l'attivazione di Erk 1-2 attraverso recettori di membrana tirosin chinasi come PDGFβR. La stimolazione del recettore porta all'autofosforilazione nei residui di tirosina; questo evento causa a sua volta la formazione di un complesso multiproteico la cui organizzazione può influenzare la cascata a valle del segnale e interagire con la Src e, a valle, con l'Erk 1-2 i cui substrati cellulari sono fosfolipasi A2, proteine citoscheletriche e fattori nucleari, in particolare fattori di trascrizione come c-Jun⁴⁰, c-Fos⁴¹ e c-Myc⁴².

Il gene di c-Myc è costituito da tre esoni, il primo esone, molto lungo e non tradotto; ed altri due che contengono le sequenze codificanti. La trascrizione può iniziare da due promotori, chiamati P1 e P2, localizzati nell'esone 1 che permettono la trascrizione dei due prodotti principali del gene: Myc1 e Myc2. La sequenza aminoacidica della proteina comprende due regioni NLS di localizzazione nucleare di cui la seconda, localizzata tra gli aminoacidi 355-368, fortemente basici, sembra implicata nel riconoscimento e legame al DNA. Il protooncogene c-Myc nell'uomo, localizzato in 8q24, è espresso principalmente nelle cellule proliferanti embrionali. Normalmente la proteina Myc permette l'ingresso nel ciclo cellulare attivando geni come la proteina

fosfatasi cdc25A⁴³ e reprimendo altri geni come fattori di trascrizione tessuto specifici⁴⁴. In molte tipologie di tumore, il gene c-Myc risulta attivato, con un prodotto genico overespresso⁴⁵; infatti in molti tumori solidi umani il meccanismo più frequente di attivazione di c-Myc è proprio l'amplificazione genica e la mancata regolazione della sua espressione⁴⁶. Tale amplificazione genica si riscontra frequentemente nei carcinomi colon-rettali, epatocellulari, mammari e prostatici. Nei carcinomi alla vescica dell'uomo è stato dimostrato di recente, mediante studi di immunistochemica, un aumento della quantità di proteina, ma, ancora più di recente è stato dimostrato un aumento della quantità di trascritto maturo del gene, circa il 70% più abbondante rispetto a campioni sani⁴⁷. Tale aumento può essere considerato un evento precoce nello sviluppo del carcinoma alla vescica. La regolazione del gene c-Myc è critica per il controllo della proliferazione cellulare, tanto che una sua deregolazione viene considerata un aspetto chiave di molte forme tumorali, sia *in vivo* che *in vitro*. Ad esempio un'overespressione costitutiva di c-Myc può rendere immortali fibroblasti di topo cresciuti in coltura. c-Myc sembra direttamente responsabile dell'avanzamento del ciclo dalla fase M alla fase S, attraverso la moltitudine di geni da esso controllati⁴⁴.

E' stato dimostrato da recenti studi come l'attivazione della Src possa attivare il fattore di trascrizione Stat3⁴⁹ e come, in maniera inversa, bloccando l'espressione di Stat3, si ottenga una soppressione della trasformazione indotta della Src⁵⁰. STAT è l'acronimo di "trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione", nome che implica una duplice funzione, non solo di trasmissione del segnale dalla superficie cellulare al nucleo ma anche di fine regolazione genica. Le proteine Stat sono coinvolte nella cascata del segnale di numerose citochine e fattori di crescita, agiscono da fattori di trascrizione citosolici latenti

che, una volta attivati attraverso fosforilazione di tirosina, traslocano nel nucleo e legano elementi di regolazione genica ⁴⁸.

Recettori di membrana come PDGF β R, con intrinseca attività chinasi, possono fosforilare Stat3 direttamente oppure anche indirettamente attraverso la fosforilazione intermedia della Src.

L'attivazione del segnale delle tirosin chinasi può portare all'attivazione di serine/treonine chinasi come ERK, che fosforila Stat3 su residui di serine nel dominio carbossi terminale. Questo implica che Stat3 possa agire come punto di convergenza tra le vie di tirosina e serina chinasi ⁶³ come l'oncoproteina Src ed il segnale di Erk. In recenti studi è stato dimostrato come Stat3 possieda un'elevata fosforilazione in tirosina ed un'elevata attività di legame del Dna in fibroblasti stabilmente trasformati da Src. Questa attivazione può portare ad una regolazione specifica del gene di Stat3, ed implica che Stat3 è uno dei segnali critici per l'oncogenesi di Src e che fa parte del processo di trasformazione maligna ⁵¹.

Una volta che Stat3 viene attivato si sposta nel nucleo e può legare le sequenze del Dna target nei promotori, inducendone l'espressione attraverso interazioni con altri componenti regolatori della trascrizione. L'attivazione induce elevate espressioni di geni coinvolti in processi cellulari come la proliferazione, sopravvivenza e progressione maligna ⁵². Da recenti studi sembra che l'espressione di c-Myc sia a sua volta strettamente regolata anche da Stat3 in risposta a segnali indotti da PDGF β R e Src. Petterino et al, hanno evidenziato, attraverso studi di immunohistochimica, come Stat3 sia espresso in campioni di emangiomi ed emangiosarcomi nel cane, dimostrando in particolar modo che il tasso di Stat3 è differente tra le due classi tumorali ⁵⁴.

La overespressione o la fosforilazione di protein chinasi di diversa natura come Src o Erk o di fattori di trascrizione come Myc o Stat la cui attivazione risulta essere strettamente collegata alla tumorigenesi, evidenziata con i nostri

esperimenti, concordano con i dati della letteratura riferiti all'attivazione di pathways a valle di PDGF β R.

L'impiego della spettrometria di massa²² ha consentito di individuare alcuni peptidi appartenenti alla classe dei proteoglicani quali decorina e lumican. In particolare la decorina che si ritrova nella matrice extracellulare di differenti tessuti, dove presenta profonde e marcate differenze di espressione. Infatti, mentre risulta fortemente espressa nelle giunture e nell'epidermide, i suoi livelli decrescono notevolmente nel cuore e nella vescica urinaria⁶⁵. Sembra, da recenti studi, che la regolazione negativa della decorina in cellule come i fibroblasti possa essere collegata anche ad una attivazione del pathway di ERK1-2⁶⁶. La decorina può inibire la proliferazione di molte tipologie cellulari, incluse le cellule cancerose. Essa inoltre può legare il PDGF e il complesso formato è capace di interagire con PDGF β R inibendone l'attivazione⁵⁶.

Secondo quanto dimostrato mediante ibridazione *in situ* il lumican non è espresso in cellule squamose di tessuti non cancerosi, ma solo in cellule cancerose e nei fibroblasti stromali nei tessuti cancerosi della cervice uterina⁵⁷. L'espressione del lumican nella matrice extracellulare nel cancro alla mammella è associata ad un elevato differenziamento tumorale, basso livello di recettori per estrogeni e giovane età di insorgenza; il lumican è anche localizzato nel citoplasma delle cellule cancerose del colon-retto. L'espressione del lumican è correlata a metastasi ai linfonodi e ad elevata invasione tumorale. Risulta, inoltre, che il tasso di sopravvivenza al tumore sia molto basso in pazienti con un alto livello di espressione di lumican. Questi dati ci indicano come l'espressione del lumican possa essere considerata un potenziale fattore prognostico nei pazienti con metastasi nodale e nei pazienti con cancro al colon-retto. La spettrometria di massa ha consentito di riscontrare, anche se

sono ancora necessarie ulteriori validazioni, che il lumican può interagire con E5.

In conclusione, il quadro che porta alla carcinogenesi risulta piuttosto complesso ed evidenzia in ultima analisi che gli effetti della trasformazione indotta da E5 possono portare a forti squilibri metabolici nella cellula con conseguenti trasformazioni maligne.

La migliore comprensione dei meccanismi di azione delle molecole implicate in questo processo può contribuire ad individuare nuovi target farmacologici ed inoltre costituire la base per la progettazione di nuove potenziali molecole farmacologicamente attive da utilizzare nella diagnosi e nella cura del carcinoma urinario.

BIBLIOGRAFIA

1. Berg, M., Stenlund, A., (1997). Functional interactions between Papillomavirus E1 and E2 proteins. *J. Virol.* 71, 3853-3863.
2. Gillette, T.G., Lusky, M., Borowiec, J.A.,(1994). Induction of structural changes in the bovine papillomavirus type 1 origin of replication by the viral E1 and E2 proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 8846-8850.
3. Dasgupta, S., Zabielski, J., Simonsson, M., Burnett, S., (1992). Rolling-circle replication of a high-copy BPV-1 plasmid. *J. Mol. Biol.* 228, 1-6.
4. Piirsoo, M., Ustav, E., Mandel, T., Stenlund, A. and Ustav, M., (1996). Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. *EMBO J.* 15, 1-11.
5. Van Craenenbroeck K., Vanhoenacker P., Haegeman G., (2000). Episomal vectors for gene expression in mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 267, 5665-5678
6. Borzacchiello G., Ambrosio V., Galati P., Perillo A., Roperto F., (2003). Cyclooxygenase-1 and -2 in urothelial carcinomas of the urinary bladder in cows. *Veterinary Pathology*, 38, 113-116.
7. Saveria Campo, M., (2002). Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus research* 89, 249-261.
8. Hoque M., Somvanshi R., Singh G.R., Mogha I.V., (2002). Ultrasonographic evaluation of urinary bladder in normal, fern fed and enzootic bovine haematuria-affected cattle. *Journal Of Veterinary Medicine*, A 49, 403-407.
9. Castillo U.F., Ojika M., Alonso-Amelot M.E., and Sakagami Y., (1998). Ptaquiloside Z, a new toxic unstable sesquiterpene glucoside from the neotropical Bracken fern *Pteridium aquilinum* var. *caudatum*. *Bioorganic and Medical Chemistry* 6, 2229-2233.

10. Newman J.D., and Chappel J., (1999). Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. *Critical reviews in Biochemistry and Molecular biology* 34, 95-106
11. Prakash A.S., Pereira T.N., Smith B.L., Shaw G., and Seawright A.A., (1996). Mechanism of Bracken fern carcinogenesis: evidence for H-ras activation via initial adenine alkylation by ptaquiloside. *Natural Toxins* 4, 221-227.
12. Alonso-Amelot M.E., Castillo U.F., Smith B.L., and Lauren D.R., (1996). Bracken Ptaquiloside in milk. *Nature* 382, 587.
13. Bonadies F,m Borzacchiello G., Dezzi S., Nicoletti R., Roperto S., (2004). Mass spectrometric analysis of ptaquiloside, the toxic sesquiterpene from bracken fern. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004; 18: 825–828
14. Pamukcu A.M., Goksoy S.K., Price J.M., (1967). Urinary bladder neoplasms induced by feeding Bracken fern (*Pteris aquilina*) to cows. *Cancer Research* 27 Part1, 917-924, May 1967
15. Mahmood S., Moore M.R., worrall S., Smith B.L., Seawright A.A., Prakash A.S., (1998). H-ras activation is an early event in the ptaquiloside induced carcinogenesis: comparison of acute and chronic toxicity in rats. *Biochem and Biophys Comm.* 250, 491-497.
16. Baxter M.K., McBride A.A., (2005). An acidic amphipatic helix in the bovine papillomavirus E2 protein is critical for DNA replication and interaction with the E1 protein. *Virology* 332, 78-88
17. *Veterinary Medicine. A textbook of the disease of cattle, sheep, pigs, goats and horses* 9TH Edition. Radostitis A.M., Gay C.C., Blood D.C., Hinchcliff K.W. Ed. W.B. Saunders
18. Claesson-Welsh L., (1994). Platelet-derived growth factor receptor signals. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 269. No. 51, Issue of December 23, pp. 32023-32026.

19. Mahadevan D., Yu J.C., Saldanha J.W., Thanki N., McPhie P., Uren a., LaRochelle W.J., Heidarani M.A., (1995). Structural role of extracellular domain 1 of α -platelet-derived growth factor (PDGF) Receptor for PDGF-AA and PDGF-BB binding. *J. Biol. Chem.* 270: 27595-27600.
20. Pawson T., Scott J.D., (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278: 2075-2080.
21. Heldin C.H., Westermark B., (1999). Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. *Physiological Reviews* Vol. 79, No. 4, October.
22. Rappsilber J., Mann M., (2002). What does it mean to identify a protein in proteomics? *Trends Biochem Sci.* 27, 74-78
23. Meuten D.J., Everitt J., Inskoop W., Jacobs R., Peleteiro M., Thompson K.J., (2004). urinary bladder tumours. In: WHO Histological Classification of tumours of the urinary system of domestic animals, 2nd series, Vol. XI, F.Y. Schulman, Ed., Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C., PP. 26-37.
24. Roperto S., Ambrosio V., Borzacchiello G., Galati P., Paciello O., Russo V., Roperto F., (2005). Bovine papillomavirus type-2 (BPV-2) infection and expression of uroplakina IIIb, a novel urothelial cell marker, in urinary bladder tumors of cows. *Veterinary Pathology* 42; 812-818.
25. Patrick D.J., Fitzgerald S.D., Sesterhenn I.A., Davis C.J., Kiupel M., (2006). Classification of canine urinary bladder urothelial tumours based on the world health organization/international society of urological pathology consensus classification. *J. Comp. Pathol.* Vol. 135, 190-199.

26. Carvalho T., Pinto C., Peleteiro M.C., (2006). Urinary bladder lesions in bovine enzootic haematuria. *J Comp Pathol.* 2006 May;134(4):336-46.
27. Freeman-Cook L.L., DiMaio D., (2005). Modulation of cell function by small transmembrane proteins modelled on the bovine papillomavirus E5 protein. *Oncogene* 24, 7756-7762
28. DiMaio D., Mattoon D., (2001). Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* 20, 7866-7873
29. DiMaio D., Lai C-C., Mattoon D., (2000). The platelet-derived growth factor β as a target of the bovine papillomavirus E5 protein. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 11, 283-293
30. DiMaio D., Lai C-C., Klein O., (1998). Virocrine transformation: the intersection between viral transforming proteins and cellular signal transduction pathways. *Annu Rev Microbiol.* 52, 397-421
31. Lai C-C., Henningson C., DiMaio D., (2000). Bovine papillomavirus E5 protein induces the formation of signal transduction complexes containing dimeric activated platelet-derived growth factor β receptor and associated signalling proteins. *The Journal of Biological Chemistry* Vol.275, No. 13, Issue of March 31, pp. 9832-9840.
32. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M., (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, 68, 850-858.
33. Irby R.B., Yeatman T.J., (2000). Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 19, 5636-5642
34. Roskoski R. Jr., (2004). Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 324, 1155-1164.

35. Luttrell D., Lee A., Lansing T., Crosby R., Jung K., Willard D., Luther M., Rodriguez M., Berman J., Gilmer T., (1994). Involvement of pp60c-src with two major signaling pathways in human breast cancer. PNAS USA, 91, 83-87
36. Angelucci A., Schenone S., Gravina G.L., Muzi P., Festuccia C., Vicentini C., Botta M., Bologna M., (2006). Pyrazolo[3,4-d]pyrimidines c-Src inhibitors reduce epidermal growth factor-induced migration in prostate cancer cells. European Journal of Cancer 42, 2838-2845
37. Huang C-YF, Ferrell Jr JE., (1996). Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. PNAS USA 93: 10078-10083.
38. Ferrell JE., Bhatt RR., (1997). Mechanistic studies of the dual fosforylation of mitogen-activated protein kinase. J. Biol. Chem. 272: 19008-19016.
39. Payne DM., Rossomando AJ., Martino P., Erickson AK., Her J-H., Shananowitz J., Hunt DF., Weber MJ., Sturgill TW., (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen activated protein kinase (MAP kinase). EMBO J. 10:885-892
40. Hibi M., Lin A., Smeal T., Minden A., Karin M., (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. Genes Dev. 7: 2135-2148.
41. Chen RH., Juo PC., Curran T., Blenis J., (1996). Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances his transforming activity. Oncogene 12: 1493-1502.
42. Pearson G., Robinson F., Beers Gibson S., Xu B-E., Karandikar M., Berman K., Cobb M., (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocrine Review 22 (2) 153-183.
43. Wu S., Pena A., Korc A., Soprano D.R., Soprano K.J., (1996). Overexpression of Mx1 inhibits the induction of human ornithine decarboxylase gene by the mic/max complex. Oncogene 12: 621-629.

44. Facchini L.M., Penn L.Z., (1998). The molecular role of myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insight. *FASEB Journal* 12, 633-651.
45. Marcu K.B., Bossone S.A., Patel A.J., (1992). Myc function and regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 809-860
46. Koskinen P.J., Alitalo K., (1993). Role of myc amplification and overexpression in cell growth, differentiation and death. *Semin. Cancer Biol.* 4: 3-12
47. Cristoph F., Schmidt B., Schmitz-Drager B.J., Schulz W.A., (1999) Overexpression and amplification of c-myc gene in human urothelial carcinoma. *Int.J.Cancer. (Pred. Oncol.)* 84: 169-173.
48. Cirri P., Chiarugi P., Marra F., Raugei G., Camici G., Manao G., Ramponi G., (1997). c-Src activates both STAT1 and STAT3 in PDGF- stimulated NIH3T3 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 239:493-497.
49. Yu C.L., Meyer D.J., Campbell G.S., Larner A.C., Carter-Su, Scwartz J., Jove R., (1995). Enhanced DNA-binding activity of a STAT3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science (Wash. DC.)*, 269: 81-83, 1995.
50. Bromberg J.F., Horvath C.M., Besser D., Lathem W.W., Darnell J.E., Jr., (1998). Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol. Cell. Biol.* 18: 2553-2558.
51. Turkson J., Bowman T., Garcia R., Caldenhoven E., De Groot R.P., Jove R., (1998). Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol and Cell Biol.* May p. 2545-2552
52. Bowman T., Garcia R., Turkson J., Jove R., (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474-2488
53. Bowman T., Broome M.A., Sinibaldi D., Wharton W., Pledger W.J., Sedivy J.M., Irby R., Yeatman T., Courtneidge S.A., Jove R., (2001). Stat3-mediated myc expression is

required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. PNAS June 19. Vol. 98 No 13 pp. 7319-7324

54. Petterino C., Rossetti E., Drigo M., (2006). Immunodetection of the signal transducer and activator of transcription-3 in canine haemangioma and haemangiosarcoma. *Research in Veterinary Science* 80: 186-188

55. Goldstein D.J., Andresson T., Sparkowski J.J., Schlegel R., (1992). The BPV-1 E5 protein, the 16 kDa membrane pore-forming protein and the PDGF receptor exist in a complex that is dependent on hydrophobic transmembrane interactions. *The EMBO Journal* vol.11 no.13 pp. 4851 –4859.

56. Nili N., Cheema A.N., Giordano F.J., Barolet A.W., Babaei S., Hickey R., Eskandarian M.R., Smeets M., Butany J., Gerard Pasterkamp,‡ and Strass B.H., (2003). Decorin Inhibition of PDGF-Stimulated Vascular Smooth Muscle Cell Function *Potential Mechanism for Inhibition of Intimal Hyperplasia after Balloon Angioplast.* *American Journal of Pathology*, Vol. 163, No. 3, September 2003.

57. Naito Z., Ishiwata T., Kurban G., Teduka K., Kawamoto Y, Kawamura K., Sugisaki Y., (2002). Expression and accumulation of lumican protein in uterine cervical cancer cells at the periphery of cancer nests. *International Journal of Oncology* 20: 943-948, 2002

58. Gaspari M., PhD Thesis at: <https://openaccess.leidenuniv.nl/handle/1887/5431>

59. Ayala-Luis KB, Hansen PB, Rasmussen LH, Hansen HC., (2006). Kinetics of ptaquiloside hydrolysis in aqueous solution. *Environ Toxicol Chem.* 2006 Oct;25(10):2623-9.

60. Nappi VM, Schaefer JA, Petti LM., (2002). Molecular examination of the transmembrane requirements of the platelet-derived growth factor beta receptor for a productive interaction with the bovine papillomavirus E5 oncoprotein. *J Biol Chem.* Dec 6; 277(49):47149-59.

61. Borzacchiello G, Russo V, Gentile F, Roperto F, Venuti A, Nitsch L, Campo MS, Roperto S., (2006). Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet-derived growth factor beta receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumours. *Oncogene*. Feb 23; 25 (8):1251-60.
62. Saraste M, Walker JE., (1998). Membrane proteins. Channels, pumps and charge separators. *Curr Opin Struct Biol*. Aug; 8 (4):477-9.
63. Ng J, Cantrell D., (1997). STAT3 is a serine kinase target in T lymphocytes. Interleukin 2 and T cell antigen receptor signals converge upon serine 727. *J Biol Chem*. Sep 26; 272 (39): 24542-9.
64. Schmidt B, Rasmussen LH, Svendsen GW, Ingerslev F, Hansen HC., (2005). Genotoxic activity and inhibition of soil respiration by ptaquiloside, a bracken fern carcinogen. *Environ Toxicol Chem*. Nov; 24 (11):2751-6.
65. Lianq FT., Brown EL., Wang T., Iozzo RV., Fikriq E., (2004). Protective niche for *Borrelia burgdorferi* to evade humoral immunity. *Am J Pathol*. Sep; 165 (3):977-85.
66. Laine P., Reunanen N., Ravanti L., Foschi M., Santa M., Iozzo RV., Kähäri VM., (2000). Activation of extracellular signal-regulated protein kinase 1,2 results in down-regulation of decorin expression in fibroblasts. *Biochem J*. 2000 Jul 1;349 (Pt 1):19-25
67. Jaggar RT, Pennie WD, Smith KT, Jackson ME, Campo MS. (1990). Cooperation between bovine papillomavirus type 4 and ras in the morphological transformation of primary bovine fibroblasts. *J Gen Virol*. Dec;71 (Pt 12):3041-6.