

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**FACOLTÀ DI FARMACIA**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA  
IN SCIENZA DEL FARMACO**

**IL RECETTORE DELL'UROTENSINA-II:  
UN NUOVO MARKER DIAGNOSTICO E  
TARGET TERAPEUTICO  
NELL'ADENOCARCINOMA PROSTATICO.**

**Tutor  
Ch.mo Prof.  
PAOLO GRIECO**

**Candidato  
SANTOLO ROSARIO ADDEO**

**XXII CICLO**

# INDICE

## CAPITOLO I

<b>INTRODUZIONE</b> .....	da pag. 5 a pag. 28
I.I Urotensina-II: struttura e funzione.....	5
I.II Relazione struttura attività (SAR) dell'U-II e suo sito di legame nel recettore.....	7
I.III Effetti proliferativi dell'U-II su cellule di carcinoma della corticale del surrene.....	13
I.IV Urantide: un efficace antagonista dell'U-II nell'aorta toracica di ratto, mima il rilascio del calcio indotto dalla U-II.....	15
I.V Il carcinoma prostatico.....	18
I.VI Modello cellulare impiegato.....	25
I.VII Ruolo svolto dal network integrine-proteine Rho nella motilità e invasione delle cellule di carcinoma prostatico....	26
I.VIII Obiettivi del lavoro.....	28

## CAPITOLO II

<b>MATERIALI E METODI</b> .....	da pag. 30 a pag. 40
II.I Materiali.....	30
II.II Colture cellulari e saggi di proliferazione cellulare.....	30

II.III Preparazione dei lisati cellulari e dosaggio delle proteine.....	31
II.IV Immunoblotting.....	32
II.V Saggi di proliferazione cellulare.....	33
II.VI Valutazione di p-FAK.....	34
II.VII L'analisi RT-PCR.....	35
II.VIII Caratteristiche dei pazienti e dei campioni di tessuto.....	36
II.IX Immunoistochimica e istologia.....	37
II.X Saggi di motilità ed invasione.....	38
II.XI Spettroscopia elettronica a scansione (SEM).....	39
II.XII Rilevazione di CD11 e CD61 sulla superficie della membrana cellulare.....	40

## **CAPITOLO III**

**RISULTATI**.....da pag.42 a pag. 60

III.I Espressione del recettore dell'U-II e del recettore androgenico in cellule di carcinoma prostatico umano.....42

III.II Effetto dell'U-II e dell'Urantide (UPG43) sulla proliferazione delle cellule di carcinoma prostatico.....44

III.III L'espressione dell'UTR è ridotta nei tumori prostatici umani primari e correla con la prognosi dei pazienti.....46

III.IV Effetti dell'U-II e dell'Urantide sulla motilità e invasione delle cellule di carcinoma prostatico LNCaP.....	51
III.V Effetti dell'U-II e dell'Urantide sui fattori di adesione...	55
III.VI Effetti dell'Urantide e dell'assenza dell'UTR sulla motilità ed invasione delle cellule LNCaP.....	57
III.VII Effetto della down-regolazione dell'UTR sul pathway di trasduzione del segnale Ras-mediato.....	59

## **CAPITOLO IV**

<b>DISCUSSIONE</b> .....	da pag. 62 a pag. 65
--------------------------	----------------------

<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	da pag. 66 a pag. 69
---------------------------	----------------------

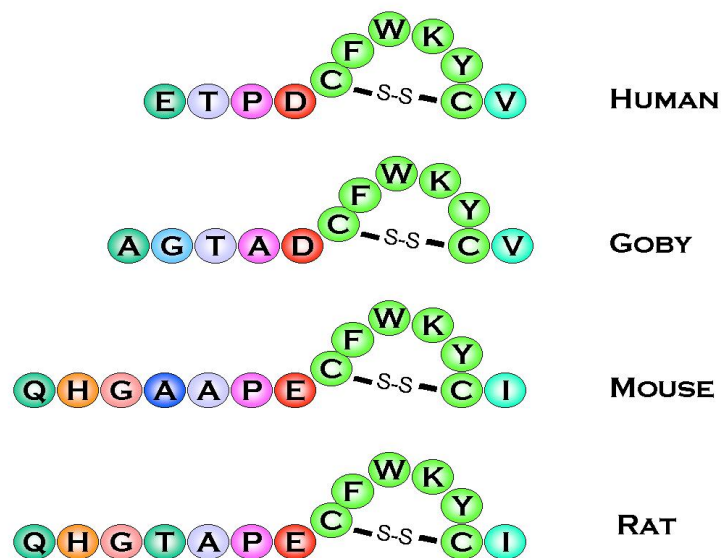
# **CAPITOLO I**

# INTRODUZIONE

## I.I Urotensina-II: struttura e funzione.

L'Urotensina-II (U-II) è un peptide ciclico isolato per la prima volta dall'urofisi, l'organo di deposito e di secrezione dell'ormone del sistema neurosecretorio caudale dei pesci teleostei, sequenziato più di venti anni fa.

In diverse specie di pesci e anfibi sono state identificate differenti forme strutturali dell'U-II, nelle quali variano cinque dei sette residui amminoterminali seguiti da un esapeptide ciclico carbossiterminale conservato contenente un ponte disolfuro (1), (Fig. 1).

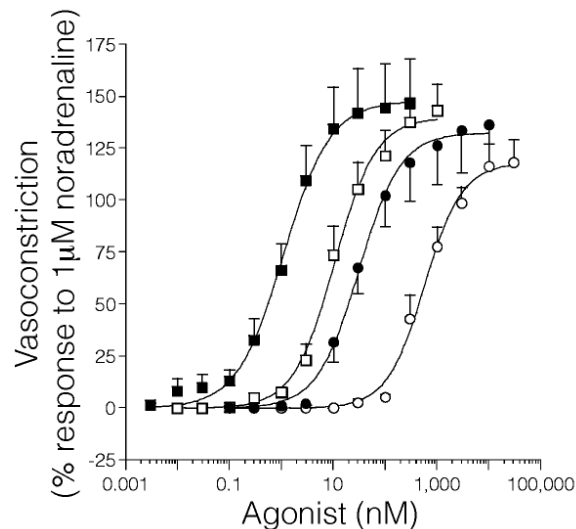


**Figura 1:** esempi di sequenze amminoacidiche di U-II derivate da mammiferi, anfibi e pesci. I residui in verde sono conservati attraverso le varie specie (P. Grieco et al. 2003).

L'U-II umana è un peptide di undici aminoacidi che conserva la porzione ciclica dell'U-II dei pesci ed è sintetizzata come pre-pro-proteina con il peptide segnale amminoterminali. La pre-pro-U-II è poi clivata da

un'ipotetica endopeptidasi polibasica per formare la proteina matura. Uno degli aspetti interessanti degli isopeptidi della pre-pro-U-II è la differente struttura primaria riscontrata tra le diverse specie animali. Il dominio che mostra una maggiore conservazione nella sequenza amminoacidica del precursore, tra le diverse specie, è l'estremità carbossiterminale che codifica la sequenza peptidica matura dell'U-II. Questa sequenza consta in un octapeptide ciclico carbossiterminale che risulta altamente conservato in tutti gli isopeptidi animali e rappresenta il minimo frammento attivo dell'U-II in tutte le specie (1).

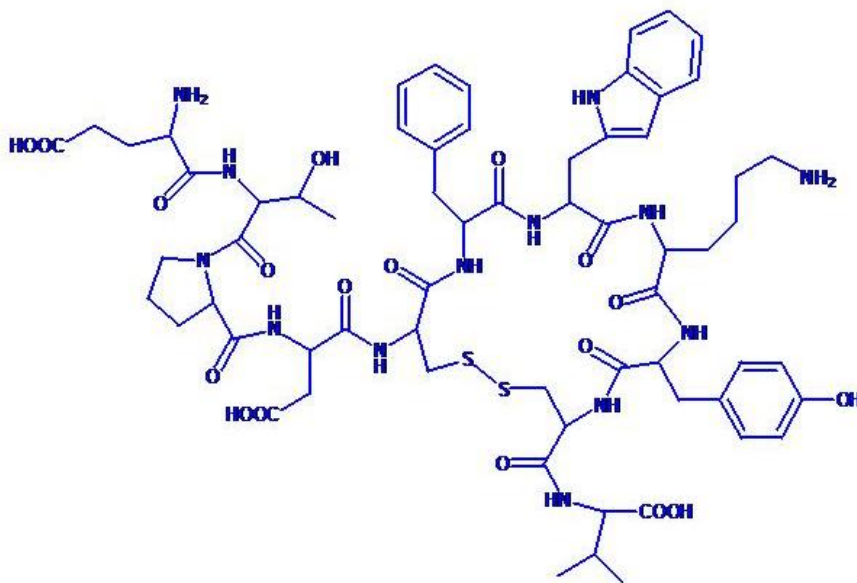
L'U-II umana (hU-II) e quella del teleosteo *Gillichthys mirabilis* inducono potenti ed efficaci contrazioni nell'aorta toracica isolata di ratto ( $-\log[EC_{50}] = 9.09 \pm 0.19$  ;  $-\log[EC_{50}] = 9.22 \pm 0.18$ , rispettivamente), inoltre, l'hU-II è significativamente più forte ( $P < 0.001$ ) dell'endotelina-1 (ET-1), noradrenalina e serotonina ( $-\log[EC_{50}] = 7.90 \pm 0.11$ ,  $7.58 \pm 0.11$  e  $6.27 \pm 0.12$ , rispettivamente) (Fig. 2). Questo rende, di conseguenza, l'U-II il più potente peptide vasoconstrictore identificato fino ad oggi (2).



**Figura 2:** contrazione concentrazione dipendente dell'aorta isolata di ratto da parte dell'hU-II ■, ET-1 □, noradrenalina ● e serotonina ○ (R.S. Ames, H.M. Sarau, et al. 1999).

## I.II Relazione struttura attività (SAR) dell'U-II e suo sito di legame nel recettore.

Il primo e più importante studio sulla struttura dell'U-II (Fig. 3) è stato riportato da Yu nel 1994 che ha impiegato la spettroscopia NMR e ha dimostrato come i residui nella regione centrale dell'U-II, in soluzione di DMSO, adottano una conformazione compatta ed altamente ordinata con la formazione di una tasca idrofobica su di un lato della molecola. In questa tasca idrofobica i residui Ala<sup>4</sup>, Phe<sup>7</sup>, Trp<sup>8</sup> e Val<sup>12</sup> sono proiettati sullo stesso lato della molecola e l'esatto orientamento della molecola nel suo sito di legame potrebbe essere determinata, in parte, dalla disposizione spaziale di questi residui (1).



**Figura 3:** struttura dell'Urotensina-II umana (P. Grieco et al.2003).

L'U-II è il ligando endogeno di un recettore accoppiato ad una proteina G (GPCR), isolata da una libreria genomica umana, che possiede un'alta omologia di sequenza con GPR14, un recettore orfano identificato nel ratto e ad oggi conosciuto come recettore dell'urotensina (3). Il



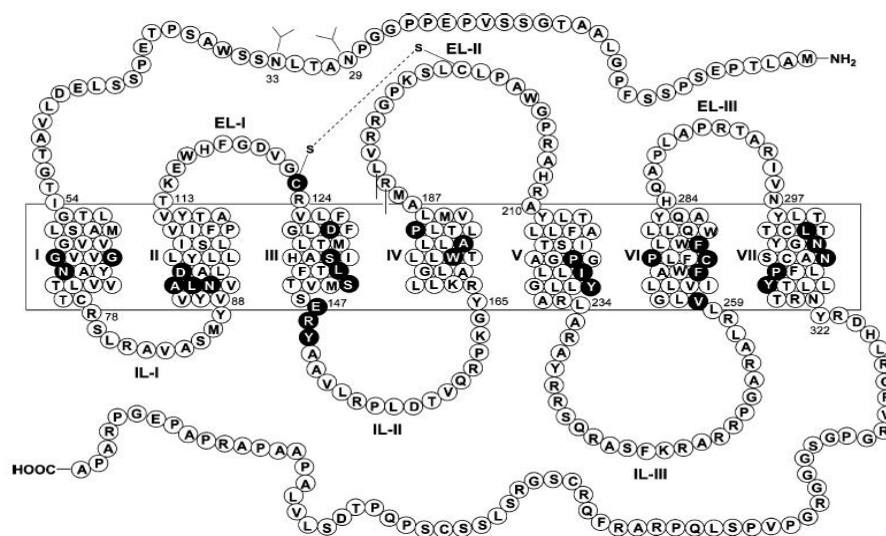
recettore dell'U-II ha una forte omologia di sequenza con i membri della famiglia del recettore della somatostatina e potrebbe essere attivato da quest'ultima a dosi micromolari. I recettori della somatostatina mediano vie multiple di traduzione del segnale tra cui l'induzione della mobilitazione del calcio e della produzione di inositolo fosfato, l'attivazione della proteina tirosina fosfatasi e la mobilitazione dell'acido arachidonico mediata da sst2 e sst3. Sulla base di questa evidenza è stato fatto uno screening di alcuni peptidi, simili alla somatostatina e contenenti un ponte disolfuro, sul recettore dell'urotensina. In particolare, sono stati utilizzati l'ormone umano concentrante la melanina (MCH), la somatostatina 14 (SST-14), la corticostatina 14, gli analoghi della somatostatina RC-160 e octreotide e l'U-II. Dai risultati di questo studio è risultato che mentre l'MCH è inattivo, la SST-14 e il peptide correlato corticostatina-14 sono capaci di attivare il recettore dell'urotensina, sebbene a concentrazioni molto alte e di conseguenza non rilevanti dal punto di vista fisiologico (Tab. 1). Inoltre, è stato possibile stabilire che l'U-II rappresenta l'unico ligando endogeno con alta affinità per il recettore GPR14 poi chiamato UTR (1).

**Tabella 1.** Proprietà farmacologiche del recettore GPR14.

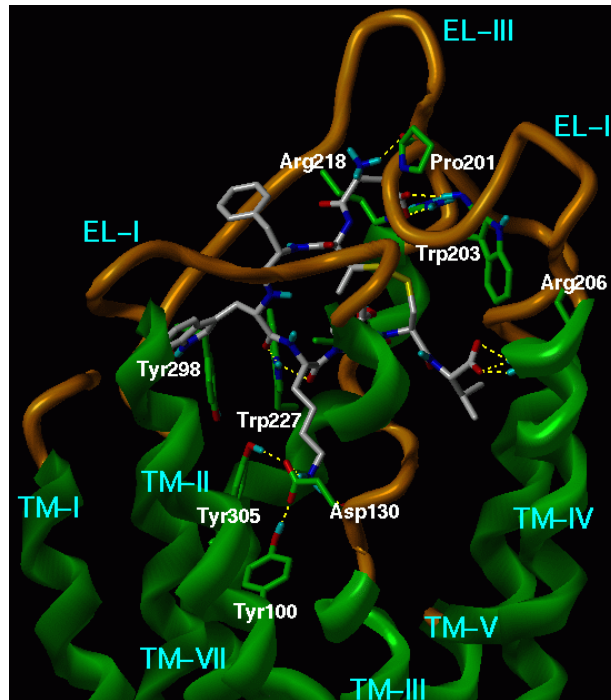
<b>Peptide</b>	<b>Squenza</b>	<b>GPR14 (EC<sub>50</sub>nM)</b>
hU-II	ETPDCFWKYCV	0,10±0,07
U-II ( <i>G. mirabilis</i> )	AGTADCFWKYCV	0,14±0,02
Somatostatina-14	AGCKNFFWKTFSTC	3,670±460
Corticostatina-14	PCKNFFWKTFSSCK	>10000
Octreotide	FC <u>W</u> KTCT <sup>b</sup>	4,270±460
RC-160	FCY <u>W</u> KVCW <sup>a</sup>	338±53,6

I residui di cisteina formano ponti disolfuro intramolecolari; <sup>a</sup> C-terminale è un'amide; le lettere sottolineate indicano residui D-aminoacidici; <sup>b</sup> riduzione del gruppo carbossilico ad alcool.

Una rappresentazione schematica del recettore è mostrata nella figura 4. Il recettore possiede due potenziali siti di N-glicosilazione nel dominio N-terminale (Asn29 e Asn33) e due residui di cisteina nel primo e nel secondo loop extracellulare, che sono capaci di formare ponti disolfuro. Le porzioni intracellulari contengono il motivo Glu/Asp-Arg-Tyr che è tipico di diversi recettori accoppiati a proteine G. Inoltre, i potenziali siti di fosforilazione sono localizzati nella coda citoplasmatica (3). In figura 5 è riportata la struttura secondaria del recettore UT e l'ipotetico sito di legame dell'U-II.



**Figura 4:** modello a serpentina della sequenza dell'h-UTR. Le linee nere rappresentano la membrana. I cerchi scuri indicano i residui altamente conservati nella superfamiglia delle proteine G a sette eliche transmembrana (TM). Le eliche TM sono contrassegnate da numeri romani. I numeri arabi indicano la posizione dei residui nel dominio TM. Sono mostrati anche i siti di glicosilazione sul loop extracellulare EL-II; IL= loop intracellulare; EL= loop extracellulare (P. Grieco et al. 2009).



**Figura 5:** modello tridimensionale del recettore dell'Urotensina-II umano e sito di binding del ligando (P.Grieco).

Per comprendere il ruolo svolto dagli aminoacidi esociclici nell'interazione con il recettore sono stati utilizzati alcuni peptidi tronchi derivati dall'U-II riportati nella tabella 2. Tali analoghi con la sequenza ciclica conservata sono potenti ed efficaci al pari dell'U-II umana. La porzione carbossi-terminale, altamente conservata, è la sequenza minima richiesta per mantenere la piena attività con il recettore dell'U-II di *G. mirabilis*. Con il recettore umano, invece, l'U-II conserva l'attività anche rimuovendo oltre gli aminoacidi esociclici dalla parte amino-terminale anche la valina C-terminale, come mostrato dal peptide hU-II (1-10) e dal peptide hU-II (5-10). Quest'ultimo è equipotente all'U-II umana. Quindi sebbene la Val C-terminale è stata altamente conservata durante l'evoluzione, non è indispensabile per l'attivazione del recettore dell'U-II umano (1).

**Tabella 2.** Attività biologica dei peptidi tronchi relativi all'hU-II.

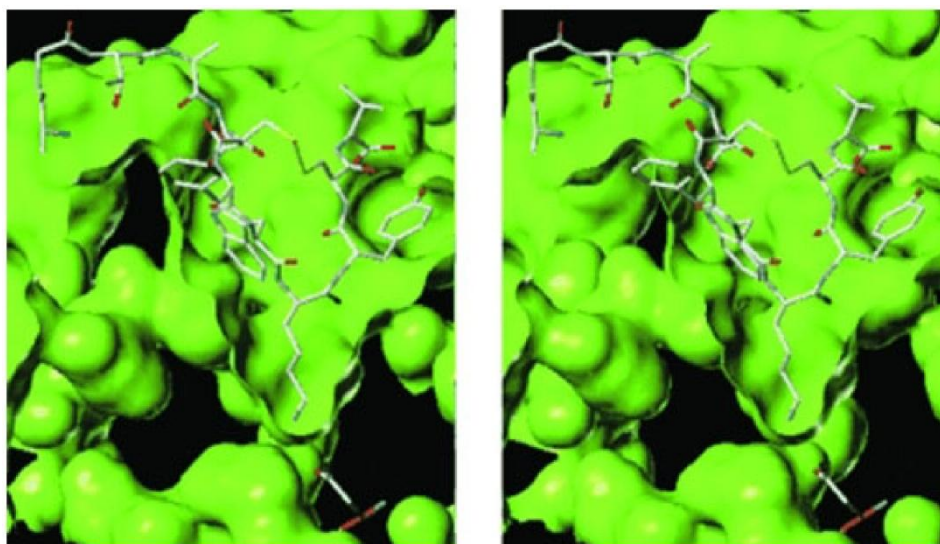
Peptide	Sequenza	GPR14 (EC <sub>50</sub> nM)
1	ETPDCFWKYCV	2,5±0,2
2	TPDCFWKYCV	2,4±0,1
3	PDCFWKYCV	3,6±0,6
4	DCFWKYCV	3,0±0,9
5	CFWKYCV	1,8±0,3
6	ETPDCFWKYC	1,8±0,1
7	CFWKYC	2,3±1,1

Per meglio delineare i requisiti strutturali dell'U-II necessari per l'attivazione recettoriale è stato effettuato uno studio di 'Ala-Scan', dove ogni residuo aminoacidico è sistematicamente rimpiazzato da un'alanina. I risultati confermano il ruolo fondamentale svolto dai residui endociclici, con la rilevante eccezione del residuo di Phe, la cui sostituzione è tollerata. Quindi la sequenza Trp-Lys-Tyr, all'interno del sistema ciclico con il ponte disolfuro, sembra essere la chiave determinante per l'attivazione del recettore dell'U-II da parte del suo ligando (1).

Anche la topologia di questo messaggio è importante, come mostrato dall'inversione di configurazione dei residui endociclici utilizzando lo studio 'D-residuo scan', in cui è tollerata solo la sostituzione del L-Trp con il D-Trp (4).

Risultati di SAR sono stati ricavati anche dalle modifiche nella sequenza dell'hU-II (5-10). Questi studi dimostrano che è determinate la presenza di un gruppo aromatico nella posizione della Tyr del ligando.

Infatti, l'introduzione della (2-naftil)-L-alanina (2-Nal) al posto della tirosina incrementa leggermente l'attività agonista, presumibilmente per le maggiori interazioni idrofobiche. Questa maggiore attività del derivato 2-Nal è in accordo con la presenza nel recettore UT di un'ampia tasca legante la tirosina (4), (Fig. 6).



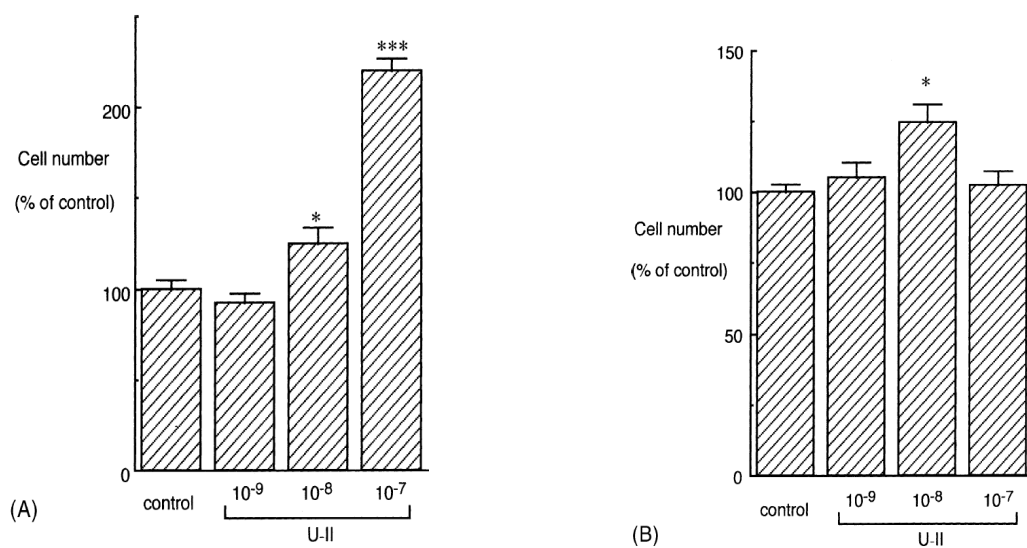
**Figura 6:** tasche di legame ipotizzate per l'U-II nel suo recettore (P. Grieco et al. 2003).

Sono stati effettuati anche studi di SAR sulle modificazioni della funzione ammino- e carbossi-terminale dell'U-II: l'octapeptide hU-II non richiede una funzione carbossilica libera all'estremità C-terminale, infatti, il derivato ammidico dell'hU-II(5-11)-NH<sub>2</sub> mantiene un'affinità a dosi nanomolari per il recettore hUTR, e un'efficacia a dosi subnanomolari nel saggio dell'aorta isolata di ratto; il residuo di Asp N-terminale dell'hU-II(4-11)-NH<sub>2</sub> è stato rimpiazzato da diversi amminoacidi e da building blocks. I risultati farmacologici indicano che per il legame e l'attivazione recettoriale non è richiesto un amminogruppo N-terminale né una catena laterale carica negativamente. Apparentemente, il gruppo amminoterminale dovrebbe contenere un gruppo CO accettore di legami idrogeno, che potrebbe essere collocato in varie posizioni della catena laterale (4).

### I.III Effetti proliferativi dell'U-II su cellule di carcinoma della corticale del surrene.

L'U-II è espressa in vari tessuti umani incluse le ghiandole surrenali. È noto che i tumori derivati dalla cresta neurale, come il feocromocitoma, il neuroblastoma e il ganglioneuroblastoma esprimono una varietà di neuropeptidi, di peptidi vasoattivi e di loro recettori. Inoltre, i tumori della corticale del surrene esprimono alcuni peptidi tra cui endotelina-1 e adrenomedullina (5).

Gli mRNA dell'U-II e del suo recettore sono espressi in linee cellulari tumorali umane di varie origini, incluse le cellule di carcinoma della corticale del surrene SW-13. Tuttavia, non è stata riportata l'espressione dell'U-II e del suo recettore nei tessuti derivati da tumori surrenali, da neuroblastoma e da ganglioneuroblastoma. Il trattamento delle SW-13 con U-II per 24h, alla concentrazione di  $10^{-8}$  e  $10^{-7}$  mol/l, aumenta significativamente il numero di cellule rispetto al controllo del 125% e del 220% rispettivamente. L'U-II stimola anche la proliferazione delle cellule di carcinoma renale VMRC-RCW ad una concentrazione di  $10^{-8}$  mol/l, ma non a  $10^{-7}$  mol/l (5), (Fig. 7).

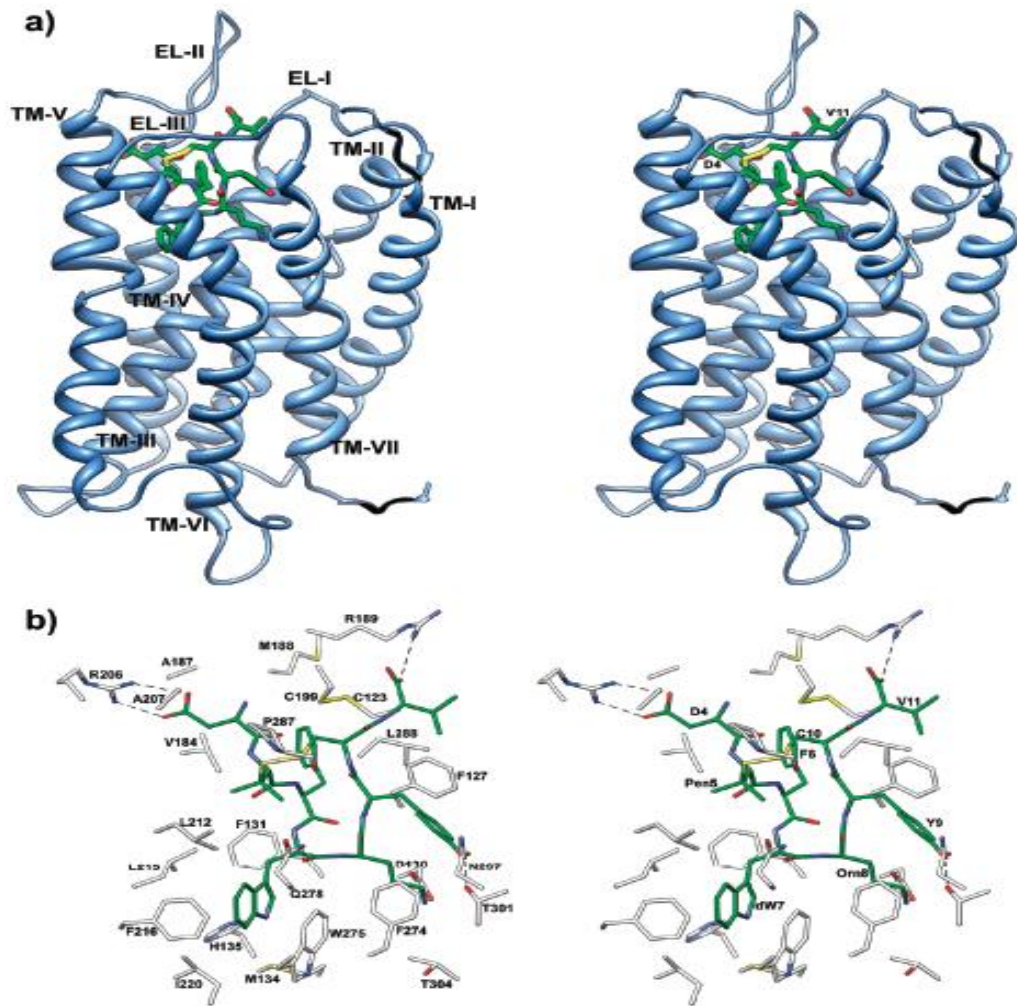


**Figura 7:** effetti proliferativi dell'U-II su cellule SW13 (A) e VMRC-RCW (B).  
\*  $P < 0.02$ , \*\*\*  $P < 0.0001$  (K.Takahashi et al., 2003).

#### **I.IV Urantide: un efficace antagonista dell'U-II nell'aorta toracica di ratto, mima il rilascio del calcio indotto dalla U-II.**

Gli studi di SAR rivelano che la porzione ciclica (Cys<sup>5</sup>- Cys<sup>10</sup>) del peptide U-II è cruciale per le attività biologiche, e la sequenza Trp<sup>7</sup>- Lys<sup>8</sup> - Tyr<sup>9</sup> è la più importante per l'occupazione e l'attivazione del recettore. La sostituzione della Lys con Orn ha portato all'identificazione dell'agonista parziale, di scarsa potenza, del recettore dell'U-II: [Orn<sup>8</sup>]Urotensina II. Grieco et al. hanno sostituito la Cys<sup>5</sup> con la penicillamina nell'octapeptide U-II(4-11), generando la [Pen<sup>5</sup>]Urotensina II, un potente agonista del recettore dell'U-II. Di recente, queste modifiche strutturali sono state combinate con la sostituzione Trp<sup>7</sup>→D-Trp<sup>7</sup>, portando all'identificazione dell'[Pen<sup>5</sup>,D-Trp<sup>7</sup>,Orn<sup>8</sup>]U-II o urantide (UPG43). Questo peptide si lega con la stessa alta affinità (pKi 7,9-9,0) al recettore dell'U-II di topo, di ratto e umano (6).

Come mostrato in figura 8, l'ipotetico sito di legame dell'Urantide è localizzato su TM-III-TM-VII ed EL-II. La  $\beta$ -hairpin è orientata lungo l'asse dell'elica del recettore, con i residui N- e C-terminali che puntano verso il lato extracellulare. Il modo in cui si lega il peptide è stato determinato principalmente grazie alle interazioni mostrate in figura 8 b ed in Tabella 3 (7).



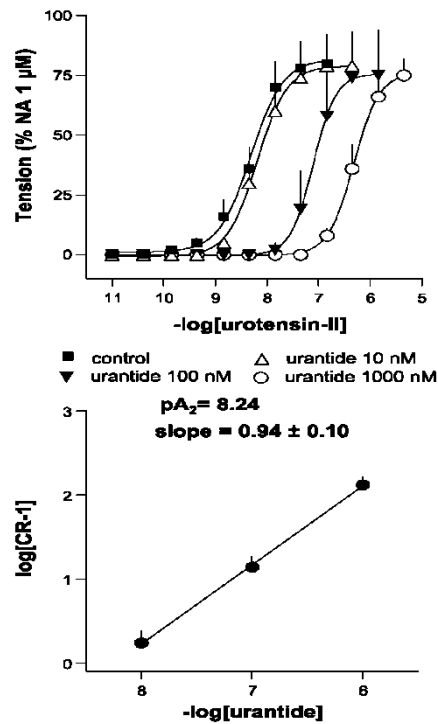
**Figura 8:** (a) modello dell'h-UTR quando interagisce con l'Urantide; (b) modello dell'Urantide all'interno della tasca di legame.

**Tabella 3.** Interazioni dell'Urantide con l'hUTR.

residue <sup>a</sup>	surrounding residue
Asp <sup>4</sup>	Ala187 (EL-II), Met188 (EL-II), Cys199 (EL-II), Arg206 (EL-II), Ala207 (EL-II)
Pen <sup>5</sup>	Gln278 (TM-VI), Pro287 (EL-III)
Phe <sup>6</sup>	Cys123 (EL-I), Val184 (TM-IV), Met188 (EL-II)
D-Trp <sup>7</sup>	Phe131 (TM-III), Met134 (TM-III), His135 (TM-III), Leu212 (TM-V), Leu215 (TM-V), Phe216 (TM-V), Ile220 (TM-V), Trp275 (TM-VI), Gln278 (TM-VI)
Orn <sup>8</sup>	Asp130 (TM-III), Thr301 (TM-VII), Thr304 (TM-VII)
Tyr <sup>9</sup>	Phe127 (TM-III), Phe274 (TM-VI), Asn297 (TM-VII), Thr301 (TM-VII)
Cys <sup>10</sup>	Cys199 (EL-II), Pro287 ((EL-III)
Val <sup>11</sup>	Cys123 (EL-I), Arg189 (EL-II), Cys199 (EL-II), Leu288 (EL-III).



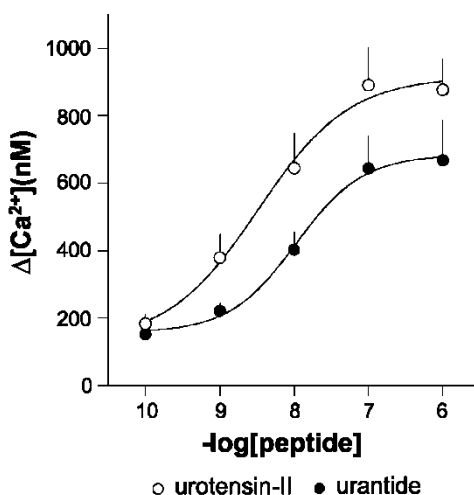
L'Urantide è un puro, potente e competitivo antagonista del recettore dell'U-II nel saggio della contrazione dell'aorta di ratto. L'urantide a concentrazioni di 10, 100, 1000 nM produce uno spostamento verso destra, concentrazione dipendente, della curva dose risposta dell' U-II, senza modificare i suoi effetti massimi. L'analisi di Schild dei dati è compatibile con un antagonismo di tipo competitivo,  $pA_2$  8,24 (6), (Fig. 8).



**Figura 9:** curva dose risposta dell'U-II ottenuta in assenza (controllo) e in presenza di concentrazioni crescenti di urantide (10,100, 1000 nM) nell'aorta toracica di ratto. La regressione di Schild è mostrata nel pannello inferiore (V. Carmada et al., 2004).

In cellule CHO transfettate con il recettore dell'U-II umano, l'U-II produce un incremento della concentrazione di  $\text{Ca}^{++}$  intracellulare in maniera dose dipendente con un'elevata potenza ( $\text{pEC}_{50} = 8,57 \pm 0,57$ ). Quest'azione stimolante dell'U-II è mimata dall'urantide, di poco meno potente ( $\text{pEC}_{50} = 8,21 \pm 0,15$ ). La differenza negli effetti massimi mostrata da queste molecole non ha significatività statistica (6), (Fig. 9).

Il differente comportamento farmacologico mostrato dall'urantide, ossia puro antagonista nell'aorta di ratto ed efficace agonista parziale nelle cellule che esprimono il recettore UT, potrebbe essere attribuito alle differenze, specie specifiche, tra recettore umano e di ratto. Per questo motivo l'urantide rappresenta un interessante ligando dell'UTR che potrebbe essere usato per indagare il ruolo biologico svolto dall'U-II e dal suo recettore (6).



**Figura 10:** curva dose-risposta dell'U-II e dell'urantide, in cellule CHO che esprimono il recettore dell'U-II umano. Gli effetti sono misurati come un cambio ( $\Delta$ ) nella concentrazione intracellulare di calcio (V. Carmada et al. 2004).

## **I.V Il carcinoma prostatico.**

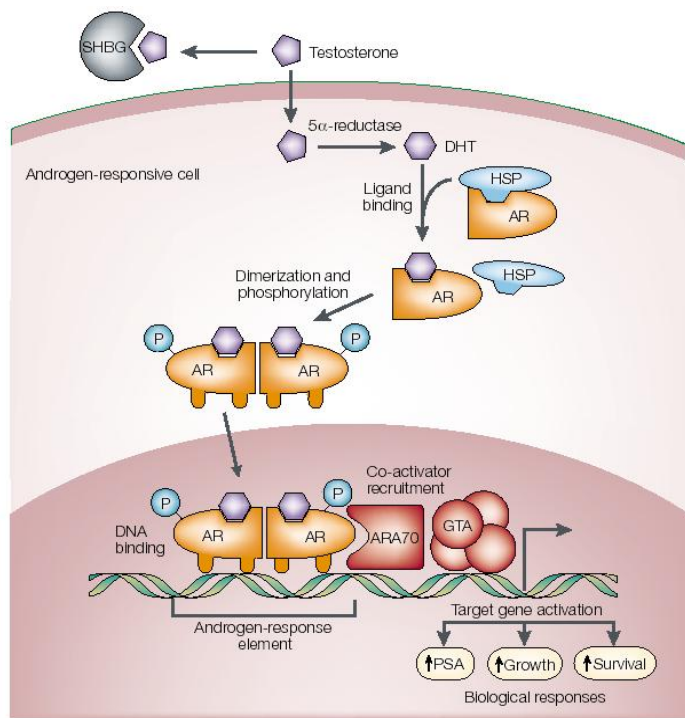
La prostata è una ghiandola maschile che si trova al di sotto della vescica, davanti al retto e circonda l'uretra, la sua funzione principale è la produzione del fluido seminale. La prostata è stata suddivisa da McNeal et al. in quattro zone: a) zona di transizione; b) zona centrale; c) zona periferica; d) stroma fibromuscolare. Dai 40-45 anni di età in poi, per azione dell'ormone diidrotestosterone (DHT), la prostata tende ad aumentare progressivamente di volume per l'incremento nel numero delle cellule prostatiche. Questo fenomeno è definito iperplasia prostatica benigna o IPB (8).

Il carcinoma della prostata è una delle neoplasie più frequenti nel sesso maschile. In Italia sono annualmente diagnosticati circa 11000 nuovi casi di cancro della prostata, pari al 9% di tutti i casi di tumore nel sesso maschile (8). Rispetto ad altri tumori, questa neoplasia aumenta più rapidamente con l'età e tuttora non è ancora chiaro il perché. Il cancro della prostata è essenzialmente una malattia dei paesi occidentali, le percentuali più elevate di incidenza e di mortalità sono riportate per i maschi afro-americani negli Stati Uniti, mentre quelle più basse si riferiscono a Giappone, Cina ed altri paesi asiatici (9).

Il cancro della prostata esiste sia in forma sporadica che ereditaria. I parenti di primo grado di pazienti affetti da cancro della prostata hanno un rischio 2-3-volte maggiore di sviluppare tale malattia rispetto alla popolazione normale. Sono state descritte numerose alterazioni cromosomiche coinvolte nel processo di cancerogenesi. Nella fase iniziale un ruolo importante è svolto da alterazioni della metilazione del DNA interessanti il gene della glutatione-S-transferasi- $\pi$  (GST- $\pi$ ) che comporta l'inattivazione dei processi di detossificazione con aumentata suscettibilità del tessuto prostatico all'induzione ed alla progressione della

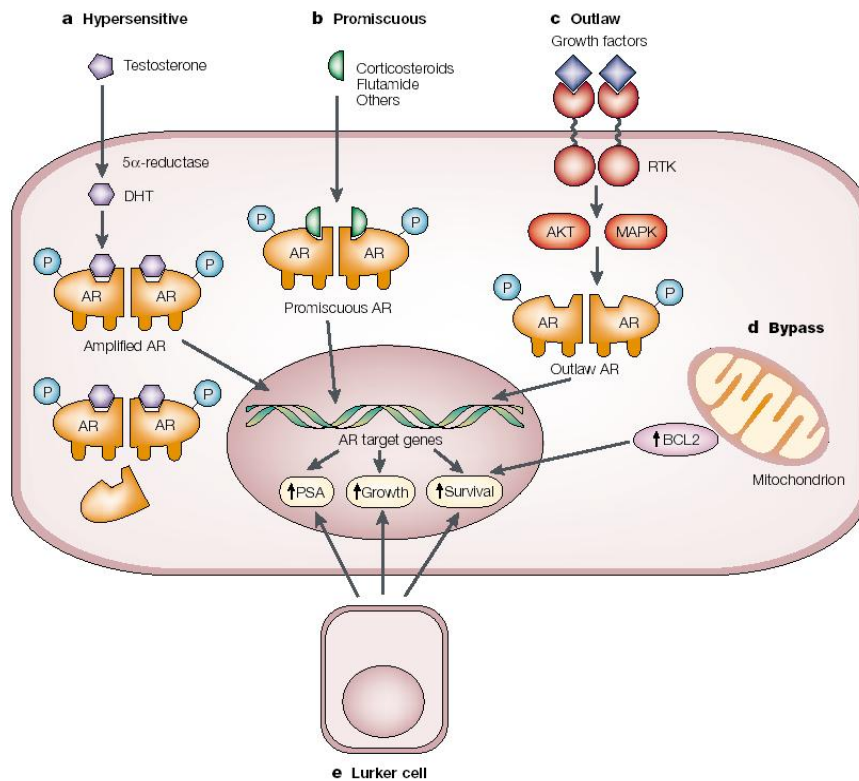
trasformazione neoplastica. Altre alterazioni sono la mutazione di geni oncosoppressori, l'amplificazione del gene AR (androgen receptor) e un'aumentata espressione dell'oncogene bcl-2 (8).

La crescita del cancro della prostata dipende dalla quota di cellule proliferanti rispetto alle cellule morte. Gli androgeni sono i principali regolatori della quota delle cellule proliferanti. Essi agiscono attraverso la stimolazione della proliferazione e l'inibizione contemporanea dell'apoptosi. Pertanto il tumore della prostata dipende per la crescita e la sopravvivenza dal livello critico della stimolazione androgenica. Il testosterone è il principale androgeno circolante, può essere legato all'albumina e alla globulina legante l'ormone sessuale (SHBG), inoltre una piccola quota è libera nel siero. Quando il testosterone libero penetra nella prostata il 90% è convertito in diidrotestosterone (DHT) dall'azione della  $5\alpha$ -reduttasi. Il DHT è l'ormone più attivo avendo un'affinità cinque volte maggiore per il recettore androgenico (AR) rispetto al testosterone. Come altri recettori nucleari il recettore androgenico nello stato basale è legato alle proteine HSP (Heat Shock Protein) e ad altre proteine, in una conformazione tale da prevenire il legame al DNA. Il legame con gli androgeni induce un cambio conformazionale nell'AR che porta alla dissociazione delle HSP ed alla fosforilazione del recettore. Ciò induce la formazione di complessi omodimerici di AR, i quali possono migrare nel nucleo e legarsi agli elementi responsivi agli androgeni nella regione promotrice del gene bersaglio. Il complesso così formato recluta proteine coregolatorie, coattivatorie e corepressorie. I coattivatori permettono l'interazione del complesso di AR con l'apparato basale della trascrizione, per stimolare o inibire la trascrizione del gene bersaglio (10), (fig. 11) .



**Figura 11:** effetti della stimolazione androgenica (B.J. Feldman et al. 2001).

La modificazione genetica è un fattore cruciale per la progressione del tumore e non fa eccezione a questa regola lo sviluppo del cancro della prostata androgeno-indipendente. Come altri tumori, i tumori della prostata si selezionano sulla base di variazioni genetiche che incrementano la probabilità di successive mutazioni. Un aumento generale nella quantità delle mutazioni potrebbe incrementare la probabilità di uno sviluppo di cellule con mutazioni tali da permettere la crescita indipendentemente dall'androgeno. Ci sono cinque possibili pathway (Fig. 11):



**Figura 12:** possibili meccanismi di androgeno indipendenza (B.J. Feldman et al. 2001).

- Ipersensibilità: l'espressione di recettori per androgeni (AR) è incrementata usualmente per amplificazione genica; l'AR presenta un aumento della sensibilità (non mostrata in figura) attraverso mutazioni che ne cambiano la configurazione tridimensionale per compensare i bassi livelli di androgeno; più testosterone è convertito nel più potente androgeno diidrotestosterone dall'azione della 5 $\alpha$ -reduttasi (la cui attività incrementa in seguito ad un aumento di espressione).
- Promiscuo: la specificità dell'AR è ridotta così da poter essere attivato da molecole non androgeniche normalmente presenti nell'organismo (ormoni corticosteroidi o altre molecole similari).

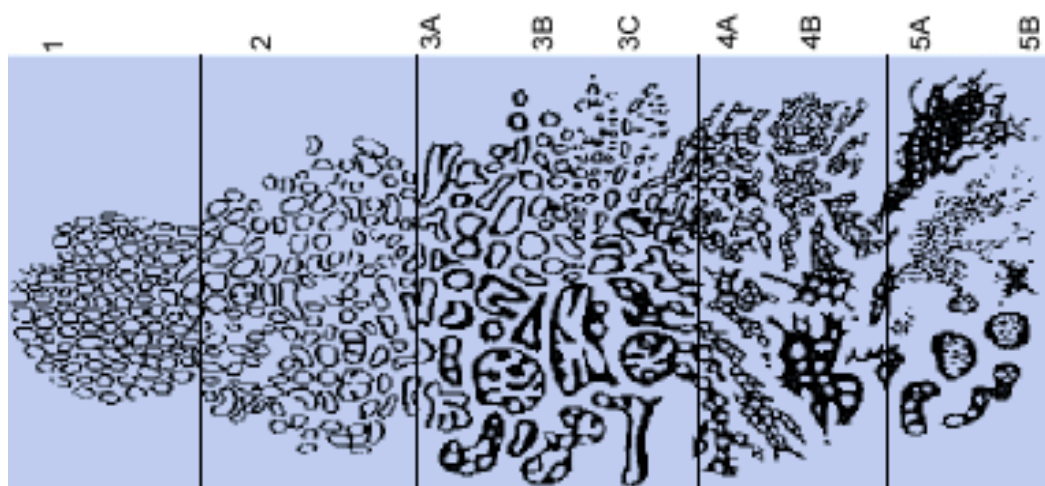
- c) Fuorilegge: i recettori tirosin chinasi (RTKs) sono attivati e AR è fosforilato sia dalla cascata AKT (PKB) che da quella MAPK (mitogen-activated protein kinase)-dipendente, attivando così l'AR senza la presenza di ligandi naturali.
- d) Bypass: meccanismi di sopravvivenza alternativi, che coinvolgono ad esempio la proteina anti-apoptotica BCL2 fanno sì che non sia necessario AR o il suo ligando.
- e) Cellule nascoste: cellule cancerose androgeno-indipendenti che sono sempre presenti nella prostata, probabilmente cellule tumorali staminali presenti in maniera latente nel tumore e selezionate dalla terapia androgeno-soppressiva (10).

Lo spettro di gravità nel carcinoma prostatico è molto variabile, passando da indolente a aggressivo. Alcuni uomini con il carcinoma prostatico hanno una longevità pari a quella della popolazione generale, mentre altri pazienti che ne sono affetti possono sviluppare metastasi che li conducono alla morte in pochi mesi (11,12,13).

I clinici hanno una scarsa possibilità di valutare la sopravvivenza di pazienti con diagnosi di carcinoma prostatico come incerta è la strategia terapeutica ottimale da seguire soprattutto per pazienti con malattia localizzata (14).

Attuali strategie cliniche atte a valutare la prognosi e la diagnosi del carcinoma prostatico includono la determinazione dell'estensione anatomica, del grado istologico (Gleason score) ed i livelli sierici dell'antigene prostatico specifico (PSA) (15).

Il metodo largamente riconosciuto per quantificare l'aggressività del carcinoma prostatico è stato sviluppato da Donald F Gleason tra il 1969 ed il 1974. Il sistema Gleason era basato sui parametri istopatologici ottenuti da oltre 4000 biopsie e resezioni di carcinoma della prostata effettuate tra il 1960 ed il 1975, fig. 12 (16).



**Figura 13:** schema di classificazione del grado istologico secondo Gleason.

In anni recenti sono state apportate modifiche al metodo Gleason. Nel 2005 è stata organizzata dalla Società Internazionale di Patologia Urologica una conferenza consenso con il proposito di standardizzare sia la raccolta dei patterns istologici sia come riportare e compilare le informazioni sul grado (17). Infatti, l'interpretazione del Gleason score è una analisi soggettiva e riservata all'esperienza e al background dei patologi. Perciò è di fondamentale importanza cercare criteri omogenei di valutazione. Un altro limite legato alla valutazione Gleason score è lo scarso potere predittivo nel sottogruppo di pazienti con Gleason score maggiore o minore di 7, che ha spinto la ricerca di markers molecolari predittivi di risposta. Come nuovo approccio molecole quali markers di regolazione del ciclo cellulare, regolazione dei vasi, risultano fattori prognostici potenzialmente rilevanti. Una recente review riporta che l'espressione aberrante di vari markers molecolari è correlata all'aumento dello stadio e del grado del cancro della prostata ma non è sempre predittivo per la sopravvivenza a lungo termine. Comunque markers molecolari definiti in grado di predire la prognosi al momento non sono noti. Le alternative terapeutiche per il cancro alla prostata refrattario alla terapia ormonale sono limitate dal momento che il cancro alla prostata avanzato e/o metastatico, nella sua fase



ormono refrattario, è scarsamente responsiva agli approcci convenzionali o alternativi. Perciò, una migliore conoscenza dei meccanismi con cui il cancro alla prostata diventa ormono-indipendente e delle vie di trasduzione del segnale coinvolte nel processo è un punto importante della ricerca sul cancro che potrebbe permettere l'identificazione di nuovi markers prognostici così come di bersagli terapeutici per questa malattia (18).

## **I.VI Modello cellulare impiegato.**

Nello studio sono state utilizzate le tre linee cellulari “classiche” di carcinoma prostatico: DU145 e PC3, derivate da metastasi encefaliche e da ossee rispettivamente, LNCaP derivate da metastasi linfonodali.

Dall’analisi immunohistochimica e dal sequenziamento genico effettuato per identificare mutazioni dall’esone 2 all’esone 11 del locus TP53, risulta che le cellule LNCaP presentano p53 wild type mostrando una positività immunohistochimica per p53 nel 10% delle cellule, le cellule DU145 hanno p53 mutato e il 90-100% delle cellule risultano positive alla colorazione. Le cellule PC3 posseggono mutazioni del gene che danno prodotti di traduzione tronchi che non vengono rilevati in immunohistochimica (19).

Solo le LNCaP mostrano l’espressione del recettore androgenico sia nei livelli di mRNA che di proteine. Le cellule LNCaP sono un modello sperimentale usato frequentemente *in vitro* per lo studio dei tumori della prostata androgeno-dipendenti. Infatti queste cellule hanno caratteristiche biologiche molto vicine a quelle dei carcinomi della prostata ormono-sensibili in quanto esse non crescono negli animali castrati (infatti i pazienti sottoposti a terapia androgeno-soppressiva subiscono una vera e propria castrazione chimica, in queste condizioni il tumore della prostata nella fase ormono-responsiva non prolifera). Inoltre in queste cellule sono state riportate mutazioni per il gene dell’AR. Queste mutazioni, che interessano il dominio di legame con il ligando, creano un AR promiscuo che può legare anche altri steroidi. Le cellule DU145 e PC3, invece, non esprimono AR (19).

L’espressione dei marcatori tumorali PSA e DD3 è ristretta alle cellule LNCaP (19) .

## **I.VII Ruolo svolto dal network integrine-proteine Rho nella motilità e invasione delle cellule di carcinoma prostatico.**

Le integrine costituiscono una famiglia di recettori transmembranari composti da complessi eterodimeri di catene  $\alpha$  e  $\beta$  unite da legami non covalenti. Le integrine sono coinvolte nei meccanismi di adesione tra cellula e cellula e cellula con matrice extracellulare (ECM), inoltre trasducono i segnali dall'ECM e viceversa. Per di più le integrine sono coinvolte sia nella crescita che nell'adesione cellulare mediata dall'ECM. Per cui è implicito il ruolo delle integrine sia nella crescita tumorale che nella formazione di metastasi (20).

Le cellule del carcinoma prostatico esprimono un diverso pattern di integrine. Questa differenza di espressione provoca profonde conseguenze dando la possibilità ad ogni integrina di regolare specifiche funzioni cellulari. Ad oggi sono state descritte 24 famiglie di integrine, di cui 18  $\alpha$  e 8  $\beta$  (21).

Sono state effettuate poche ricerche mirate ad accertare l'espressione del pattern di integrine nelle cellule del carcinoma prostatico. Un report descrive l'espressione delle integrine  $\alpha2\beta1$  e  $\alpha6$  sia nel tumore primario che nelle metastasi. Alcune integrine che sono implicate nel melanoma e nel carcinoma della mammella sono responsabili anche nello sviluppo del carcinoma prostatico. Un esempio è il recettore  $\alpha V\beta3$ , non espresso nel tessuto prostatico normale ma up-regolato nell'adenocarcinoma prostatico che è stato correlato con l'invasività. Dal punto di vista del signaling una volta che il ligando si associa con l'integrina  $\alpha V\beta3$  si ha la fosforilazione della chinasi di adesione focale (FAK).

FAK è una tirosino chinasi non recettoriale che promuove sia invasività che motilità cellulare, attraverso l'attivazione di diverse vie di

trasduzione del segnale. FAK non fosforila altri substrati ma una volta attivato si autofosforila e lega la chinasi Src che a sua volta fosforila sia altri siti su FAK che proteine leganti FAK, innescando così il pathway PI3-kinase/Akt, con la conseguente inibizione di p27 e la progressione del ciclo cellulare (22).

Altre integrine che partecipano all'interazione delle cellule tumorali con la matrice extracellulari sono le integrine  $\beta 3$  che permettono a singole cellule o piccoli gruppi di cellule di stabilire metastasi e dopo un periodo di tempo di evolvere da invasive a proliferanti.

Associate alle adesioni focali vi sono altre proteine, come le chinasi e le GTPasi che mediano il signaling attraverso la loro intrinseca attività enzimatica. Attraverso il clustering delle proteine strutturali e del signaling, le integrine trasducono i segnali per mediare alcuni aspetti della fisiologia e della morfologia cellulare. Questi segnali possono includere la fosforilazione delle tirosina delle proteine, l'attivazione delle proteine tirosino chinasiche come FAK, e l'attivazione di serina\tirosina chinasi come la chinasi extra cellulare regolata dal segnale (Erk o Akt). La famiglia delle Rho GTPasi contribuisce ai segnali mediati dalle integrine come ad esempio in segnali che controllano l'organizzazione del citoscheletro, volti a cambiare la morfologia cellulare. Alcuni membri della famiglia delle proteine Rho come Cdc42, Rac1 e RhoA fanno parte della superfamiglia delle proteine Ras che possono essere attive legate a GTP, inattive o legate a GDP. L'attivazione di RhoA porta alla stimolazione della costruzione di microfilamenti, ed è necessaria per la formazione dei complessi focali (23).

## **I.VIII Obiettivi del lavoro.**

Lo scopo della mia tesi è stato indagare sugli effetti biologici derivati dal network tra UTR, Urotensina-II e Urotensin II Receptor (UR), che sono quasi sconosciuti e potrebbero rappresentare una nuova strategia nella terapia del cancro.

Ad oggi non vi sono riferimenti in letteratura circa il ruolo e gli effetti dell'Urotensina-II, quindi valuterò, innanzitutto, l'espressione del recettore dell'Urotensina-II nelle tre linee "classiche" derivate da tumori della prostata.

Il potenziale coinvolgimento dell'Urotensina-II e dell'UR nella tumorigenesi della prostata saranno valutati sia *in vivo* che *in vitro*. Studieremo l'espressione dell'UR *in vivo* su campioni di tessuto prostatico e valuteremo gli effetti di Urotensina-II e dell'UR sulla proliferazione, migrazione ed invasione delle cellule tumorali androgeno dipendenti.

## **CAPITOLO II**

# **MATERIALI E METODI**

## **II.I Materiali.**

I mezzi di coltura cellulare RPMI 1640, DMEM, BSA, e FBS sono stati ottenuti dai Laboratori Flow (Milano, Italia). I materiali in plastica per le colture cellulari sono stati ottenuti da Becton Dickinson (Lincoln Park, NJ). Gli anticorpi per  $\gamma$ -tubulina, il recettore androgenico (AR) e il GPR-14 sono stati ottenuti dalla Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). hUT-II e l'Urantide, il composto agonista-antagonista dell'U-II sono stati sintetizzati dal professore Paolo Grieco (Dipartimento di Chimica Farmaceutica dell'Università Federico II di Napoli).

## **II.II Colture cellulari e saggi di proliferazione cellulare.**

Le seguenti linee cellulari tumorali di prostata PC3, DU145 e LNCaP; di pancreas PANC-1 e MIAPACA; di rinofaringe umana KB; dell'epidermide del polmone H1355; della mammella MCF7 e MDA-MB 468; di linfoma DAUDI, AKATA, RAJI e MUTU-1; di mieloma RPMI; di melanoma M14 e M14+, sono state coltivate in un incubatore umidificato contenente il 5% di CO<sub>2</sub> e a 37°C. Il mezzo di coltura utilizzato è stato il DMEM (Euroclone, Europe) per PC3, DU145, KB, MDA-MB 468 mentre l'RPMI 1640 Medium (Euroclone, Europe); per le altre linee cellulari. Entrambi i mezzi di coltura sono stati integrati con il 10% di FBS, penicillina (1 x 10<sup>5</sup> unità per litro), e L-glutamina (2 mmol\litro). Per i saggi di proliferazione cellulare dopo aver staccato le cellule con tripsina le cellule di carcinoma prostatico umano sono state poste in piastre da 96 pozzetti alla densità di 2 x 10<sup>3</sup> per pozzetto. Il giorno successivo le cellule

sono state trattate con U-II o Urantide alle concentrazioni indicate e la proliferazione cellulare è stata valutata dopo 72 h con il saggio MTT.

### **II.III Preparazione dei lisati cellulari e dosaggio delle proteine.**

Le cellule sono state piastrate in dischi da 100 mm; lavate e raccolte in ghiaccio con PBS 1x quando hanno raggiunto l'80% della confluenza. I pellets, ottenuti dopo una centrifugazione a 1300 rpm a 4 °C, sono stati lisati per un'ora in ghiaccio in un buffer contenente J.S. (HEPES 50 mM (pH 7), NaCl 150 mM, EGTA 5mM, glicerolo 1% 2ml, triton 1% 2ml, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, H<sub>2</sub>O 165,7 ml; da aggiungere freschi: Na pirofosfato 20mM, Na ortovanadato 10 mM, NaF 25 mM, Aprotinina 2µl, PMSF (Fenilmetilsulfonyl fluoridato) 100µl, I campioni sono stati centrifugati a 4°C per 10 minuti e il surnatante è stato utilizzato per gli esperimenti. La concentrazione totale delle proteine è stata determinata mediante metodo Lowry. A 5 µl di campione sono stati aggiunti 1.5 ml di una soluzione costituita da Lowry A (190 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> , 100 mM NaOH, 0.7 mM NaK tartato) e Lowry B (20 mM CuSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O) in rapporto 49:1. Successivamente sono stati aggiunti 150 µl di una soluzione costituita da acqua e dal reagente folinico (Folin & Ciocalteu's Phenol reagent, Sigma), in rapporto 7:5. La reazione avviene per 20 minuti a temperatura ambiente. L'assorbanza dei campioni viene misurata con uno spettrofotometro settato alla lunghezza d'onda di 660 nm. Concentrazioni crescenti di albumina bovina sierica sono state usate come standard. I lisati proteici, prima di essere caricati su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti, sono stati denaturati per 5 minuti a 100°C in Sample Buffer 1X (Sample Buffer



5X: Tris 10 mg/ml, SDS 30 mg/ml,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.15 ml, glicerolo 0.3 ml, blue di bromofenolo).

## **II.IV Immunoblotting.**

Per l'analisi dell'espressione del recettore dell'U-II, le proteine totali sono state separate mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) al 10% di acrilammide. Dopo trasferimento su filtro di nitrocellulosa, i siti di interazione idrofobica presenti sul filtro sono stati bloccati, allo scopo di evitare interazioni aspecifiche, incubando i filtri in latte al 3% in TBS 1X (Tris buffered saline, 20mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl) per 1 ora. I filtri sono stati successivamente incubati in latte al 3% in TBS 1X, overnight, in presenza dell'anticorpo policlonale anti-GPR14 (Santa Cruz) diluito 1:1000. Sono stati eseguiti, quindi, 3 lavaggi in TTBS (TBS 1X contenente Tween 20 allo 0.1%) e poi i filtri sono stati incubati nuovamente in latte al 3% in TBS 1X per 1 ora in presenza di un anticorpo secondario anti-rabbit diluito 1:2000 per rivelare l'anticorpo anti-GPR14.

Per l'analisi dell'espressione del recettore AR, le proteine totali sono state separate mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) al 10% di acrilammide. Dopo trasferimento su filtro di nitrocellulosa, i siti di interazione idrofobica presenti sul filtro sono stati bloccati, allo scopo di evitare interazioni aspecifiche, incubando i filtri in latte al 3% in TBS 1X (Tris buffered saline, 20mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl) per 1 ora. I filtri sono stati successivamente incubati in latte al 3% in TBS 1X, overnight, in presenza dell'anticorpo monoclonale anti-AR (santa Cruz) diluito 1:1000. Sono stati eseguiti, quindi, 3 lavaggi in TTBS (TBS 1X contenente Tween 20 allo 0.1%) e poi i filtri sono stati incubati

nuovamente in latte al 3% in TBS 1X per 1 ora in presenza di un anticorpo secondario anti-mouse diluito 1:2000 per rivelare l'anticorpo anti-AR.

Per l'analisi dell'espressione della proteina  $\gamma$ -tubulina, le proteine totali sono state separate mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) al 10% di acrilammide. Dopo trasferimento su filtro di nitrocellulosa, i siti di interazione idrofobica presenti sul filtro sono stati bloccati, allo scopo di evitare interazioni aspecifiche, incubando i filtri in latte al 3% in TBS 1X (Tris buffered saline, 20mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl) per 1 ora. I filtri sono stati successivamente incubati in latte al 3% in TBS 1X, overnight, in presenza dell'anticorpo anti- $\gamma$ -tubulina (Santa Cruz) diluito 1:1000. Sono stati eseguiti, quindi, 3 lavaggi in TTBS (TBS 1X contenente Tween 20 allo 0.1%) e poi i filtri sono stati incubati nuovamente in latte al 3% in TBS 1X per 1 ora in presenza di un anticorpo secondario anti-goat diluito 1:2000 per rivelare l'anticorpo anti- $\gamma$ -tubulina.

Le proteine di interesse sono state visualizzate mediante una reazione di chemiluminescenza ECL (Amersham Biosciences, U.K.).

## **II.V Saggi di proliferazione cellulare.**

Le cellule sono state tenute in coltura in piastre da 96 pozzetti ad una densità di 1000 cellule per pozzetto, e poi esposte ai vari agenti.

Per le curve di crescita sono state utilizzate concentrazioni di U-II, UPG43 e UPG50 di 2000nM, 1000nM, 500nM, 250nM, 100nM, 50nM, 25nM, 10nM.

Dopo 72 ore sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 10  $\mu$ l della soluzione formata da bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio 5mg/ml in PBS 1 x, ed incubate per 4 ore a 37 °C. Dopo la rimozione del

surnatante sono stati aggiunti 100 µl di isopropanolo acidificato (96 ml di acido isopropilico e 4 ml HCl 1N); agitato per 10 minuti fino alla completa dissoluzione dei cristalli. I campioni sono stati letti allo spettrofotometro a 540 nm.

I risultati sono stati elaborati statisticamente mediante il software Sigmaplot 9.0.

I peptidi sono stati forniti dal prof. Paolo Grieco dell'Università Federico II.

## **II.VI Valutazione di p-FAK.**

Per l'analisi della forma attivata di FAK nelle cellule di carcinoma prostatico LNCaP il saggio di migrazione è stato effettuato in presenza o assenza di 1000 nM di Urantide nella parte superiore dell'inserito. Dopo 24 h le cellule sono state staccate dall'inserito con uno screaper e successivamente lavate con PBS freddo (TBS; 20 mM di Tris-HCl) e lisate a 4°C in 200 µl del buffer di lisi (10mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM NaCl, 30 mM sodio pirofosfato, 5 mM EDTA, 0,5% Nonidet P40, 1% Triton X-100, 50 mM NaF, 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, inibitori delle proteasi). I lisati cellulari sono stati ottenuti alla centrifugazione a 17.000 g a 4°C. I lisati cellulari totali (10-40 µg) sono stati poi separati sulla SDS-PAGE. Le proteine sono state trasferite su membrane di polivinildene difluoruro e bloccate per un ora a temperatura ambiente con il 5% di BSA in TTBS. L'incubazione con l'anticorpo primario p-FAK e con l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi è stata effettuata con la soluzione di blocking per tutta la notte a 4°C e successivamente a temperatura ambiente per un ora. Le bande immunoreattive sono state visualizzate con il kit per ECL, per il

controllo della corsa, le membrane sono state incubate con l'anticorpo monoclonale anti- $\gamma$ -tubulina.

## **II.VII L'analisi RT-PCR.**

L'mRNA è stato isolato dalle cellule, incubate con il mezzo di coltura standard per 24 e 48 h utilizzando il Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). La trascrizione inversa è stata effettuata usando il QUIAGEN RT kit (Valencia, CA) e il QuiaQuick PCR kit (Quiagen, Valencia, CA) secondo il protocollo riportato dal costruttore. Il cDNA contenuto in 2  $\mu$ l di questa soluzione di reazione è stato amplificato in un'altra soluzione di reazione contenente in un volume finale di 25  $\mu$ l, 10 mM di TRIS-HCl, pH 8,3, 1,5 mM di MgCl<sub>2</sub>, 50 mM di KCl, 10 ng sia del primers con sequenza senso che non senso per UTR (primer forward 5'-TAC GTC ACC AAG GAG TGG CA-3'; primer reverse, 5'-TCA TGA CGG TCA GCG TGA AG-3' ), 1 M di deossinucleosidi trifosfato e 1 unità della Taq DNA polimerasi (Roche Diagnostics s.p.a.). La reazione è stata poi condotta nel DNA thermal cycler (Promega). La PCR è stata ottenuta con 35 cicli nella fase esponenziale di amplificazione seguito dallo step di denaturazione a 95°C. Ogni ciclo includeva 1' a 95°C, 1' a 60°C e 2' a 72°C. La reazione finale è stata portata avanti per 7' a 72°C. I prodotti della PCR sono stati analizzati con elettroforesi su un gel all'1.2 % di agarosio in Tris borato EDTA. L'identità dei prodotti di amplificazione è stata confermata comparando la loro grandezza con quella attesa dalla sequenza del gene conosciuto. La co-amplificazione della sequenza di cDNA è stata ottenuta aggiungendo nella miscela di amplificazione i primers della gliceraldeide-3-fostato-deidrogenasi(GAPDH) alla quantità di 10 ng, (la cui sequenza è: primer

forward 5' – CCC CAC ACA CAT GCA CTT ACC – 3' ; primer reverse 5' – CCT ACT CCC AGG GTC TGG ATT – 3').

## **II.VIII Caratteristiche dei pazienti e dei campioni di tessuto.**

Per gli studi di immunohistochimica i campioni sono stati ottenuti da una serie di pazienti consecutivi, non selezionati i quali sono stati sottoposti a biopsia della prostata o a prostatectomia radicale in quanto affetti da adenocarcinoma prostatico, dei quali sono disponibili i dati clinico - patologici. I campioni sono stati ottenuti dal Policlinico di Modena e dall'Istituto Nazionale per la ricerca sul cancro "Fondazione G. Pascale" di Napoli. Dopo aver escluso casi dei quali era andata persa al follow-up la storia precedente del tumore personale e/o familiare, è stato selezionato un gruppo di 195 pazienti con diagnosi di adenocarcinoma prostatico con età media di 69 anni (range da 49 a 85; mediana=70) e follow-up medio di 67 mesi (range da 2 a 183; mediana=48). I campioni per questo studio fissati in formalina, inseriti in paraffina sono stati reperiti dagli archivi dei Dipartimenti di Patologia dei rispettivi istituti ed esaminati dai patologi dai quali è stata confermata la diagnosi istologica di ogni lesione. La selezione non ha richiesto approvazioni in quanto i campioni sono stati codificati ed il nome dei pazienti non è stato rivelato. Le informazioni circa il follow-up sono stati ottenuti dalle cartelle cliniche dei pazienti e dai registri di morte. I tessuti tumorali selezionati includono 3 Gleason score 4 (1,5%), 9 Gleason score 5 (4,6%), 38 Gleason score 6 (19,5%), 70 Gleason score 7 (38,9%), 40 Gleason score 8 (20,5%) e 35 Gleason score 9 (18%). Il Gleason score medio dei 195 tumori era 7,2 (mediana=7, range 4-9). Il grado del tumore è stato determinato in accordo con la classificazione

Cancer Staging del 2002 (AJCC,2002): 67 pazienti (34,3%) sono stati classificati pT2, 62 pazienti (31,8%) pT3 e 66 pazienti pT4 (33,9%). La terapia dei pazienti è rimasta inalterata durante il periodo dello studio.

## **II.IX Immunoistochimica e istologia.**

Per l'analisi immunoistochimica i campioni di biopsia prostatica o di prostatectomia radicale fissati in formalina e inclusi in paraffina sono stati ottenuti dal Policlinico di Modena e dall'Istituto Nazionale per la ricerca sul cancro "Fondazione G. Pascale" di Napoli. Solo i pazienti con follow-up noto sono stati inclusi nel nostro studio. Le slides di ogni caso colorate con ematossilina-eosina sono state analizzate da un patologo esperto per confermare la diagnosi del Gleason score e per selezionare aree rappresentative della somma del Gleason score. Tutte le tecniche di colorazione immunoistochimica sono state effettuate su sezioni di tessuto incluso in paraffina. Gli anticorpi usati per gli studi immunoistochimici sono stati l'anticorpo anti-UTR e anti-AR (Santa Cruz, Santa Cruz, Ca) ad una diluizione di 1:3000 per 1h a temperatura ambiente. Dopo un'ora di incubazione con l'anticorpo, le slides sono state riscaldate in un forno a microonde per 5' in una soluzione 0,01 mol/L di sodio citrato. Per rivelare l'anticorpo primario sono state utilizzate immunoglobuline anti-mouse biotinilate, incubate con streptavidina legata alla perossidasi (LSAB-DAKO, Danimarca) usando come substrato il cromogeno diaminobenzidina. Le slides sono state poi disidratate attraverso successivi passaggi in alcol a diversa gradazione, decolorate in xylene e montate per la visualizzazione su microscopio ottico (Zeiss). Per ciascun caso l'espressione dell'UTR è stata quantizzata in aree rappresentative, precedentemente selezionate, ed è stata registrata una percentuale di cellule

positive sia in area di tumore primaria che secondaria per valutare il Gleason score totale. Una percentuale di cellule esprimenti UTR >30% è stata classificata come alta espressione dell'UTR, mentre in cellule esprimenti <30% l'UTR è stata indicata come bassa espressione dell'UTR. L'espressione nucleare di AR è stata indicata come alta quando >50% delle cellule neoplastiche mostravano colorazione positiva. Come controllo positivo sono state utilizzate sezioni con presenza certa di carcinoma prostatico. Controlli negativi invece sono stati ottenuti non incubando con l'anticorpo primario.

L'associazione tra l'espressione dell'UTR e altri parametri molecolari e clinicopatologici sono stati calcolati utilizzando il metodo delle tabelle di contingenza e testati per la significatività con il test del  $\chi^2$  di Pearson. La sopravvivenza complessiva è stata definita come l'intervallo tra il ricovero e la morte per la malattia. Undici pazienti morti non a causa della malattia non sono stati inclusi nell'analisi della sopravvivenza. L'analisi univariata e multivariata è stata effettuata secondo il metodo di Cox. Tutti i calcoli sono stati effettuati usando il software statistico STATA (Stata corporation, College station, Texas) ed i risultati sono stati considerati statisticamente significativi quando  $p \leq 0,05$ .

## **II.X Saggi di motilità ed invasione.**

I saggi di invasione sono stati effettuati modificando il metodo descritto da Albini. Sono stati utilizzati inserti con pori da 8  $\mu\text{m}$  (Falcon) posizionati in piastre da 6 pozzetti (Costar). Il Matrigel<sup>TM</sup> è stato diluito fino a 1 mg/ml nel mezzo di coltura RPMI senza siero bovino. Successivamente 100  $\mu\text{l}$  dalla soluzione 1 mg/ml di Matrigel<sup>TM</sup> sono stati posti sul fondo di ogni pozzetto. Sia l'inserto che le piastre sono state poi

incubate overnight a 4°C. Il giorno successivo le cellule sono state staccate e sospese in RPMI alle concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/ml. Gli inserti sono stati lavati con RPMI senza siero bovino, poi  $1 \times 10^6$  cellule sono state aggiunte a ciascun inserto dove sono stati immessi 3 ml di RPMI con 10% di siero. Le cellule sono state incubate a 37°C per 24h. Dopo questo tempo dalla parte interna dell'inserto sono state rimosse le cellule mentre la parte esterna è stata sciacquata delicatamente con PBS ed incubata con crystal violet per 10 minuti, sciacquati di nuovo e poi messi ad asciugare. Gli inserti sono stati visualizzati con una CCD camera equipaggiata con microscopio Optiphot Nikon e la percentuale dell'area occupata dalle cellule migranti è stata è stata calcolata con il software Optilab (Graftek).

La procedura per valutare la motilità cellulare è la stessa a parte che negli inserti non è stato inserito il Matrigel<sup>TM</sup>. Gli inserti sono stati trattati e le cellule marcate sono state visualizzate tramite spettrofotometro: il colorante crystal violet è stato estrtto cpn 900 µl di soluzione 0,1 M di sodio citrato in 50% di etanolo. L'assorbanza è stata misurata a 585 nm.

## **II.XI Spettroscopia elettronica a scansione (SEM).**

Per effettuare l'analisi SEM, le membrane con pori da 8 µm sono stati rimossi dagli inserti utilizzati per il saggio di motilità ed invasione e ai tempi indicati fissate con 2% di glutaraldeide in buffer cacodylate 0,1 M a temperatura ambiente per 30 minuti, trattati con 1% di OsO<sub>4</sub> nello stesso buffer, disidratate attraverso lavaggi in etanolo a diversa concentrazione, essiccate con CO<sub>2</sub>. I campioni sono stati esaminati con un microscopio elettronico a scansione Cambridge Stereoscan 360 (Cambridge Instruments Ltd, Cambridge, UK).



## **II.XII Rilevazione di CD11 e CD61 sulla superficie della membrana cellulare.**

Per la valutare la presenza di CD11 e CD61 sulla superficie della cellulare è stata effettuata l'analisi al FACS utilizzando la colorazione indiretta di CD11 e CD61. Dopo lavaggio con PBS freddo 1X, il pellet di cellule è stato incubato con anticorpo anti-CD11 o anti-CD61 (10µg/campione) per 30' a 4°C al buio. Le cellule sono state successivamente lavate con PBS freddo e incubate con anticorpo Ig-G anti-mouse coniugato con la ficoeritrina (25µl/campione) per 30' a 4°C al buio. Dopo il successivo lavaggio, l'analisi al FACS è stata effettuata utilizzando un FACSscan (Becton Dickinson, Mountan View, CA), e l'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il software CellQuest 2.0 (Becton Dickinson, Mountan View, CA).

## **CAPITOLO III**

## RISULTATI

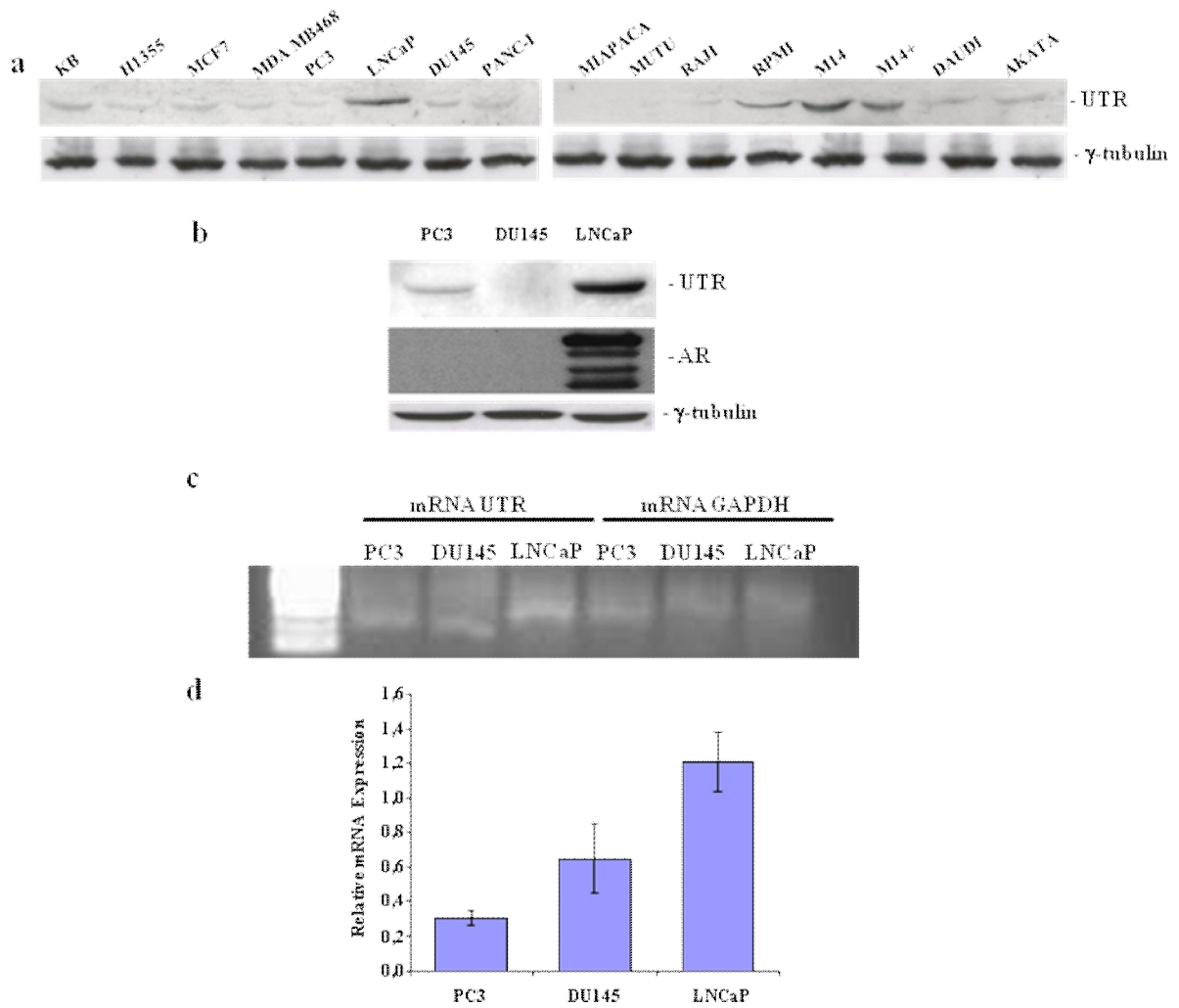
### **III.I Espressione del recettore dell'U-II e del recettore androgenico in cellule di carcinoma prostatico umano.**

L'espressione dell'UTR è stata valutata mediante metodica western blotting in una serie di linee cellulari di differente origine istogenetica (Fig. 1a), usando l'anticorpo specifico come descritto in Materiali e Metodi.

Il recettore dell'Urotensina II è altamente espresso nelle cellule di carcinoma prostatico androgeno dipendenti LNCaP, mentre l'espressione risultava bassa nelle cellule di carcinoma prostatico androgeno indipendenti PC3 e DU145 (Fig. 1a, 1b). Il recettore risulta espresso ad elevati livelli anche nelle cellule di mieloma RPMI e nelle cellule di melanoma M14 le quali esprimono anche la proteina gp170 (Fig. 1a).

L'elevata espressione dell'UTR nelle cellule LNCaP va in parallelo con l'over-espressione del recettore androgenico (AR) non presente nelle cellule PC3 e DU145. In entrambi gli esperimenti è stata utilizzata come controllo la proteina costitutiva  $\gamma$ -tubulina (Fig. 1b).

Inoltre abbiamo valutato anche l'espressione dell'mRNA dell'UTR mediante metodica RT-PCR nelle stesse linee cellulari e il risultato conferma una espressione 2-3 volte maggiore nelle cellule LNCaP rispetto alle altre due linee cellulari (Fig. 1c). Questa valutazione è stata confermata dall'analisi densitometrica dell'intensità delle bande dell'UTR normalizzate con l'espressione della proteina gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH) utilizzata come controllo (Fig. 1d).



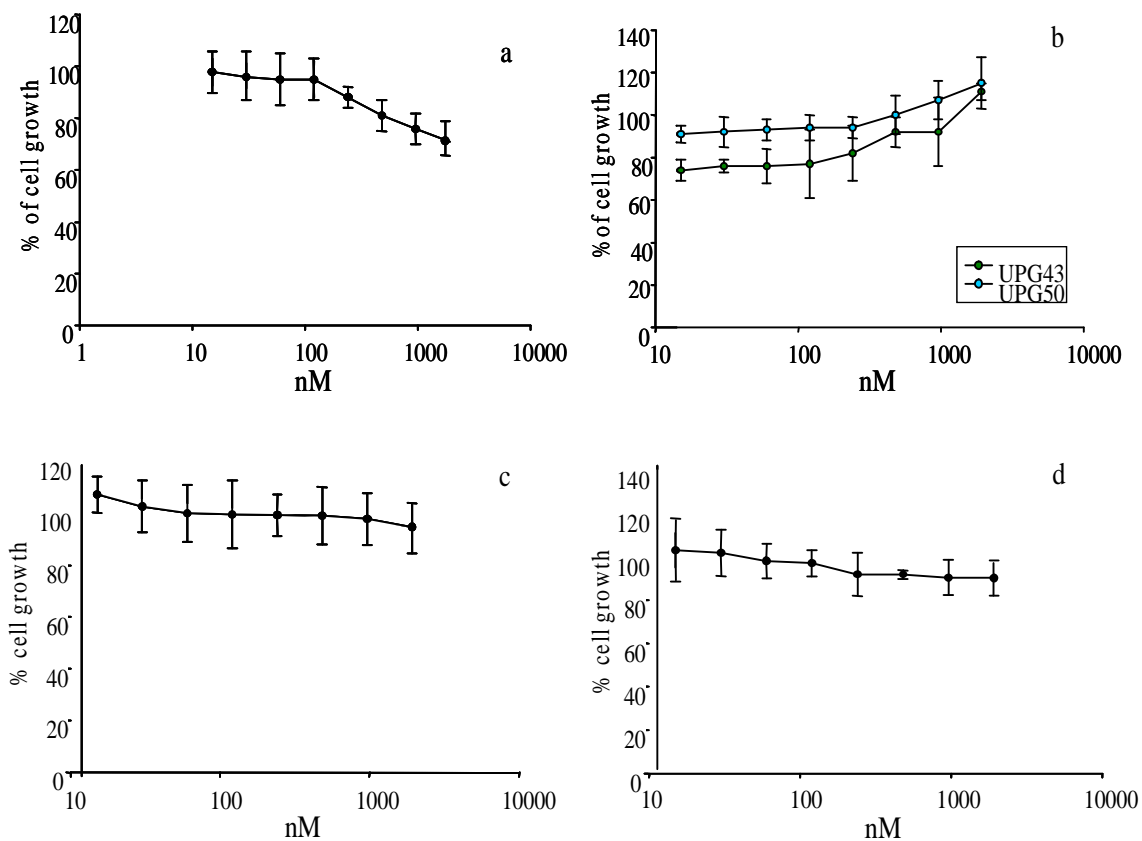
**Figura 1:** a) Espressione dell'UTR in linee cellulari tumorali di prostata, pancreas, linfoma, mammella mieloma e melanoma. b) Espressione dell'UTR e del recettore androgenico (AR) nelle tre linee "classiche" di carcinoma prostatico umano. c) Valutazione mediante RT-PCR dell'UTR e della proteina GAPDH in cellule PC3, DU145 ed LNCaP. d) Normalizzazione con l'espressione di GAPDH. L'intensità delle bande è stata espressa in % di unità arbitraria.

### **III.II Effetto dell'U-II e dell'Urantide (UPG43) sulla proliferazione delle cellule di carcinoma prostatico.**

Abbiamo valutato l'effetto dell'U-II sulla proliferazione delle cellule di carcinoma prostatico umano coltivate in presenza di siero al 10%.

L'U-II induce un'inibizione della crescita tempo- e dose-dipendente. Una inibizione proliferativa massima del 20% viene ottenuta in seguito al trattamento delle cellule LNCaP con 2  $\mu$ M di UII per 72 ore (Fig. 2a). Trattando le cellule con Urantide o UPG43, antagonista dell'UII, la stessa inibizione proliferativa del 20% si raggiunge invece alla dose di circa 10 nM (Fig. 2b). Nelle linee cellulari androgeno-indipendenti, PC3 (Fig. 2c) e DU145 (Fig. 2d), l'U-II non induceva alcun effetto significativo sulla inibizione proliferativa.

Nelle stesse condizioni sperimentali, un derivato dell'UII, UPG50 alla dose di 2 $\mu$ M per 72h produce un incremento della proliferazione delle cellule LNCaP di circa il 20% (Fig. 2b).



**Figura 2:** curve di crescita. a) cellule LNCaP trattate con U-II a concentrazioni crescenti; b) cellule LNCaP trattate con UPG43 e UPG50 a concentrazioni crescenti; c) cellule PC3 trattate con U-II a concentrazioni crescenti; d) cellule DU145 trattate con U-II a concentrazioni crescenti.

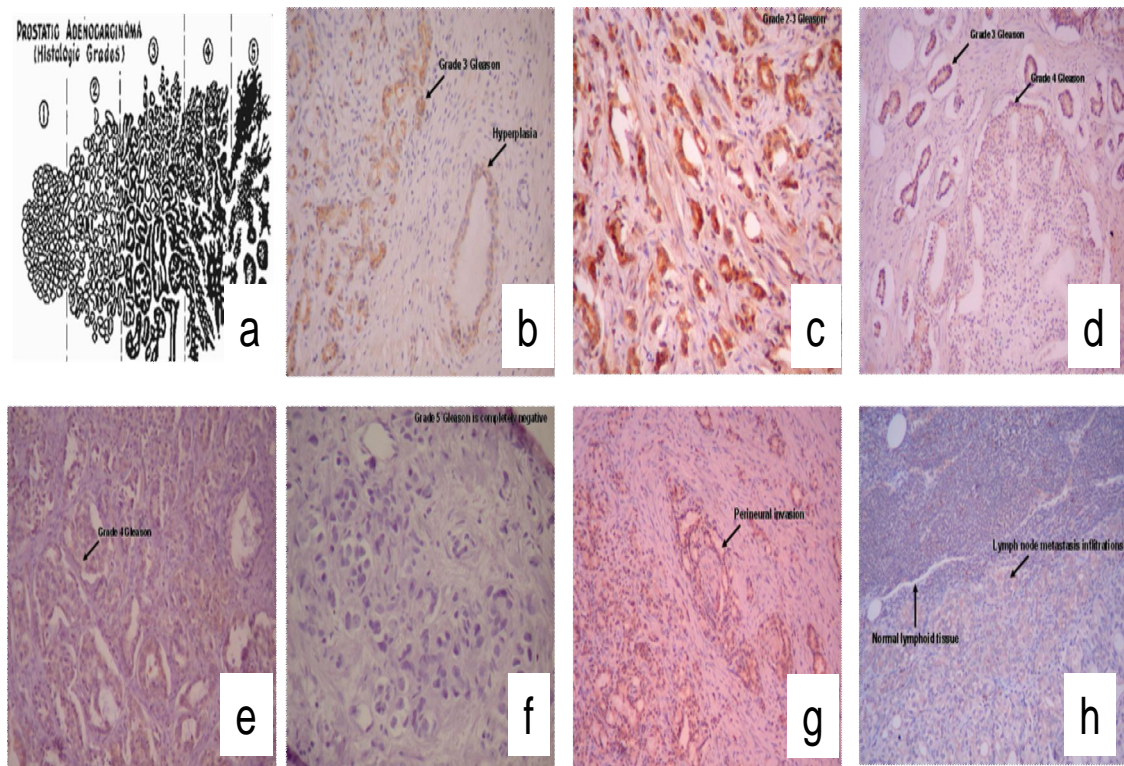
### **III.III L'espressione dell'UTR è ridotta nei tumori prostatici umani primari e correla con la prognosi dei pazienti.**

Per determinare la presenza nel carcinoma prostatico umano, l'espressione dell'UTR è stata valutata con metodica immunohistochimica in 195 campioni ottenuti da una serie di pazienti consecutivi, non selezionati i quali sono stati sottoposti a biopsia della prostata o a prostatectomia radicale in quanto affetti da adenocarcinoma prostatico, dei quali sono disponibili i dati clinico-patologici.

L'UTR risulta moderatamente espresso nel tessuto derivato da iperplasia prostatica benigna (IPB) mentre è espresso ad elevata intensità nell'adenocarcinoma prostatico ben differenziato (Gleason 2-3) (Fig. 3b). Nella Fig. 3c è riportato un esempio di tessuto con Gleason score 2 in cui è elevata l'espressione dell'UTR. In tessuti con Gleason score 4 l'espressione dell'UTR risulta di bassa intensità (Figura 3d,3e), mentre non è presente in tessuti con Gleason score 5 (Figura 3f). La figura 3g mostra tessuto di adenocarcinoma prostatico, infiltrante un nervo, che esprime moderati livelli di UTR. Nella figura 3h è riportato un esempio di metastasi linfonodale con moderati livelli di UTR.

Nei tumori analizzati (n=195) la percentuale media delle cellule positive è stata 30 (range 0-90; media= 32) e la colorazione per l' UTR non è stata rilevata in 19 (10%).

Quando i campioni sono divisi in base al grado del tumore la percentuale media delle cellule positive è stata 46 (range 5-90), 34 (range 10-90) e 21 (0-90), rispettivamente nei tumori con basso ( $\leq 6$ ), medio e alto Gleason score ( $>7$ ), e tali differenze sono statisticamente significative. Allo stesso modo la percentuale media delle cellule positive è stata 36 (range 0-80), 31 (range 0-90) e 29 (range 0-80) rispettivamente in tumori pT2, pT3 e pT4, ma queste differenze non sono significative.



**Figura 3:** valutazione dell'UTR mediante metodica immunohistochemica: a) schema di classificazione del grado istologico secondo Gleason; b) espressione dell'UTR in tessuto di iperplasia prostatica benigna e adenocarcinoma ben differenziato (Gleason 2-3); c) tessuto con Gleason score 2; d) e) tessuto con Gleason score 4; f) tessuto con Gleason score 5; g) tessuto di adenocarcinoma prostatico, infiltrante un nervo; h) metastasi linfonodale.

Ponendo il 30% di cellule positive come cut-off per distinguere tra colorazione per UTR alta (>30%) e bassa (<30%) e stratificando i tumori per grado basso (Gleason score <7), medio (7) ed alto (>7), è stata riscontrata una colorazione alta in 34 (68%) dei 50 casi di tumore a basso grado, in 36 (52%) dei 70 casi di tumore a medio grado ed in 19 (25%) dei 75 casi di tumore ad alto grado, e queste differenze risultano statisticamente significative ( $p=0,001$ ) (Tabella 1).

Allo stesso modo una elevata colorazione per UTR diminuisce all'aumentare del grado del tumore essendo visualizzabile nel 57%, 42% e



38% dei tumori pT2, pT3 e pT4 rispettivamente, ma queste differenze non sono statisticamente significative (Tabella 1).

**Tabella 1:** espressione dell'UTR in relazione ai parametri clinici e patologici in una serie di 195 pazienti affetti da adenocarcinoma prostatico.

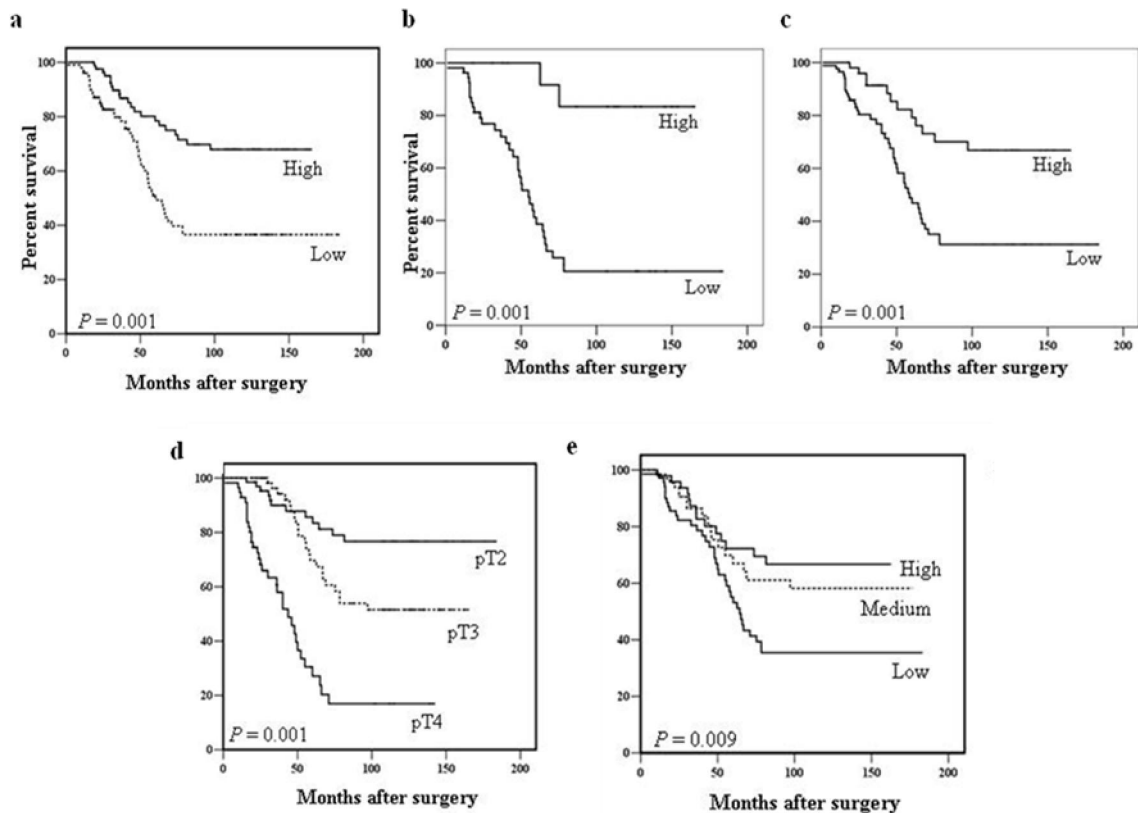
	<b>Total</b>	<b>Low n (%)</b>	<b>High n (%)</b>	<b>p value</b>
	<b>195</b>	<b>106 (54)</b>	<b>89 (46)</b>	
<b>Age (yr)</b>				
≤70	109	62 (57)	47 (43)	0.4
>70	86	44 (51)	42 (49)	
<b>Tumor stage*</b>				
pT2	67	29 (43)	38 (57)	0.07
pT3	62	36 (58)	26 (42)	
pT4	66	41 (62)	25 (38)	
<b>Gleason score*</b>				
Low	50	16 (32)	34 (68)	0.001
Medium	70	34 (49)	36 (52)	
High	75	56 (75)	19 (25)	

I dati circa il follow-up sono stati accessibili per 184 pazienti includendo 83 tumori (45%) con alta espressione per UTR e 101 (55%) con bassa espressione per UTR. 21 pazienti (25%) degli 83 esprimenti ad elevati livelli e 47 (47%) dei 101 esprimenti a bassi livelli UTR sono morti per la malattia durante il periodo di follow-up e la curva di Kaplan-Meier mostra una separazione significativa tra i due gruppi (p=0.001, long-rank test) (Fig. 4a).

La colorazione per UTR mostra una significativa associazione con il Gleason score, il quale è un importante fattore prognostico per i pazienti affetti da carcinoma prostatico (Tabella 1). Così il risultato di fattore prognostico negativo per la bassa presenza dell'UTR poteva essere una semplice conseguenza dell'associazione con il Gleason score più alto. Per escludere questa possibilità abbiamo valutato la validità dell'UTR come

fattore prognostico all'interno di un gruppo di pazienti più omogeneo. Quando abbiamo analizzato separatamente il gruppo di pazienti con Gleason score  $>7$  ( $n=70$ ), 34 (63%) dei 54 pazienti con una bassa espressione dell'UTR e 2 (13%) dei rimanenti 16 casi sono morti durante il periodo di follow-up. Infatti, le curve di Kaplan-Meier sulla sopravvivenza mostrano una significativa separazione tra i due gruppi di pazienti ( $p=0,001$  secondo il long rank test) (Fig. 4b). Un risultato equiparabile è stato ottenuto anche combinando i pazienti con grado medio (Gleason score=7) e grado alto (Gleason score  $>7$ ) di tumore (136). Durante il periodo di follow-up sono morti 42 (49%) degli 54 pazienti con tumore a bassa espressione di UTR mentre solo 12 (23%) dei 51 dei casi rimanenti e le curve di Kaplan-Meier sulla sopravvivenza mostrano una significativa separazione tra i due gruppi di pazienti ( $p=0,001$ ) (Fig. 4c). Il grado avanzato di tumore ( $p=0,001$ ) e alto Gleason score ( $p=0,009$ ) sono spesso associati ad una sopravvivenza assoluta più breve (Fig 4d, 4e).

Nell'analisi multivariata effettuata costruendo un modello secondo Cox includendo età, Gleason score, avanzamento del tumore e colorazione per UTR solo la bassa colorazione per UTR ( $p=0,03$ ; C.I. 1.323-3.828; RR 2.25) e il grado avanzato del tumore ( $p=0,001$ ; CI=1.712-6.347; RR= 3.3) hanno confermato essere fattori predittivi di una sopravvivenza più bassa. (Tabella 2).



**Figura 4:** rilevanza dell'UTR come fattore prognostico. Sulla sinistra è riportato la percentuale della sopravvivenza assoluta. a) pazienti con bassa ed alta espressione dell'UTR; b) pazienti con Gleason scor = o >7 con alta e bassa espressione di UTR; c) pazienti con Gleason score >7 con alta e bassa espressione di UTR; d) pazienti a differente stadio tumorale: pT2, pT3 o pT4; e) pazienti con basso, medio ed alto Gleason score.

**Tabella2.** Contributo dei vari fattori prognostici alla sopravvivenza assoluta secondo la Cox analisi in pazienti con adenocarcinoma prostatico.

Variable	<i>Risk</i>	<i>95% confidence</i>	<i>p value</i>
	Ratio	Interval	
Age§	1.412	0.876-2.276	0,109027778
Gleason score*	1.012	0.547-1.907	0,658333333
Tumor stage#	3.296	1.712.-6.347	0.001
UTR**	2.250	1.323-3.828	0.003

§ Il valore è dato dal paziente più vecchio verso il più giovane (cut-off=70anni)

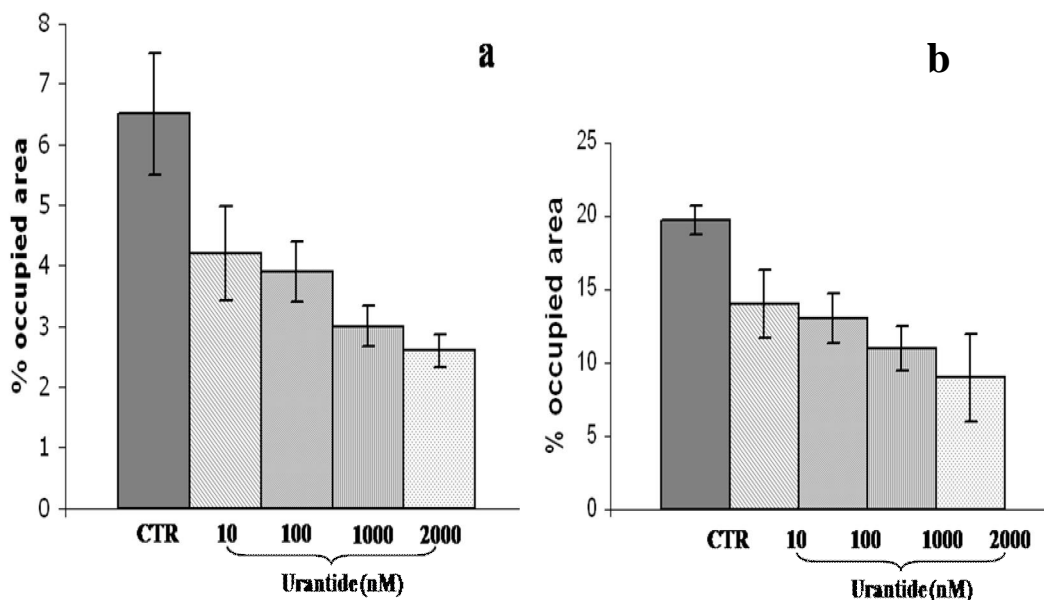
\* Il valore è dato come più alto Gleason score (>7) verso il più basso

# Il valore è dato come più alto stadio tumorale (pT4) verso il più basso

\*\* Il valore è dato come tumori basso esprimenti ( $\leq 30\%$  cellule positive) verso alto esprimenti ( $>30\%$ )

### III.IV Effetti dell'Urantide sulla motilità e invasione delle cellule di carcinoma prostatico LNCaP.

Con l'intento di esplorare gli effetti sui processi di motilità ed invasione, le cellule LNCaP sono state trattate con Urantide a concentrazioni che vanno dai 10 ai 2000nM, per 30' a 37°C. Le cellule sono state poste quindi in camere con pozzetti precedentemente preparati con membrane ricoperte di Matrigel™, come descritto in Materiali e Metodi, per consentire la migrazione e l'invasione in presenza e assenza di Urantide. Sia l'analisi qualitativa che quantitativa è stata effettuata mediante tecnica di microscopia elettronica a scansione (SEM) e microscopia ottica computer-assistita. In seguito al trattamento con Urantide, come confermato dall'analisi quantitativa dei risultati, è stato osservato un decremento dose dipendente dell'area occupata dalle cellule che migrano (Fig. 5a) e che invadono (Fig. 5b).



**Figura 5:** effetti sulla motilità e l'invasione delle cellule LNCaP. L'analisi è stata effettuata dopo 72 h dall'inizio del trattamento. Le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di Urantide. Il risultato è espresso come % dell'area occupata (mm<sup>2</sup>).

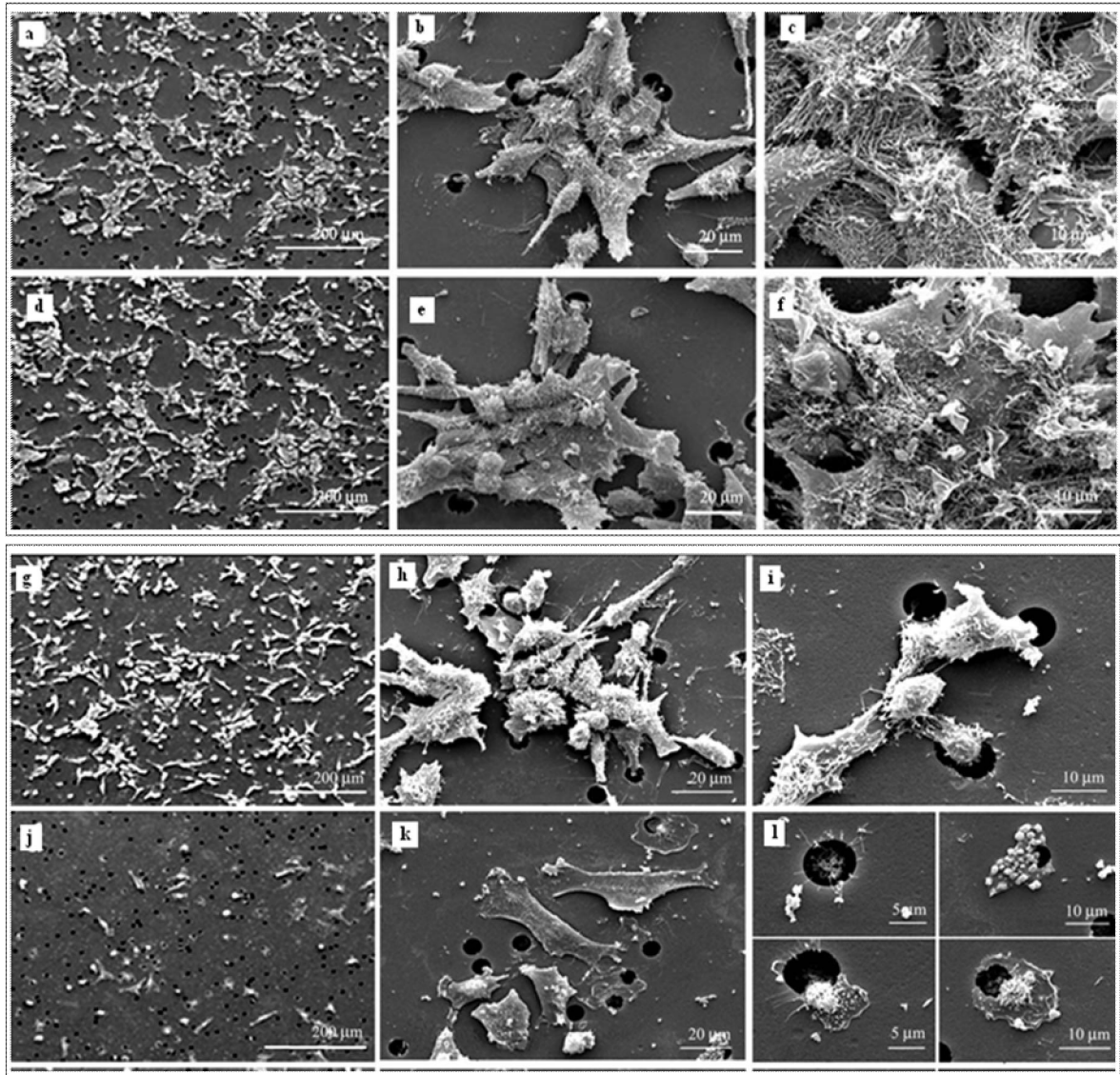
L'analisi SEM mostra che quando le cellule LNCaP sono piastrate sul substrato adottano una morfologia affusolata o rotondeggiante (dati non mostrati). Durante la migrazione si muovono invece come cellule cluster, sia in presenza che in assenza di Matrigel™ (Fig. 6-7). Quando osservate dal lato superiore del filtro, i clusters (Fig. 6a) sono caratterizzati da cellule leader che si muovono attraverso i pori. Per di più sono circondate da cellule di supporto (Fig. 6b), unite insieme da lunghi ed intrecciati microvilli (Fig. 6c). Dopo il trattamento con Urantide (Fig. 6d-f) si osserva una maggiore formazione di clusters attraverso il moltiplicarsi di protrusioni inter-cellulari che ne limitano la migrazione attraverso i pori della membrana (Fig 6e-6f).

Sul lato sottostante del filtro nel gruppo controllo è visibile come le cellule leader trascinino cellule di supporto ( Fig. 6g-i) mentre nel gruppo trattato con Urantide (Fig. 6j-l) si osservano solo cellule isolate e appiattite, che attraversano i pori della membrana in maniera minore rispetto al controllo.

Quando la migrazione avviene in presenza di Matrigel™ sono ancora visibili i clusters con le cellule leader sul lato superiore della membrana (Fig. 7a-7b).

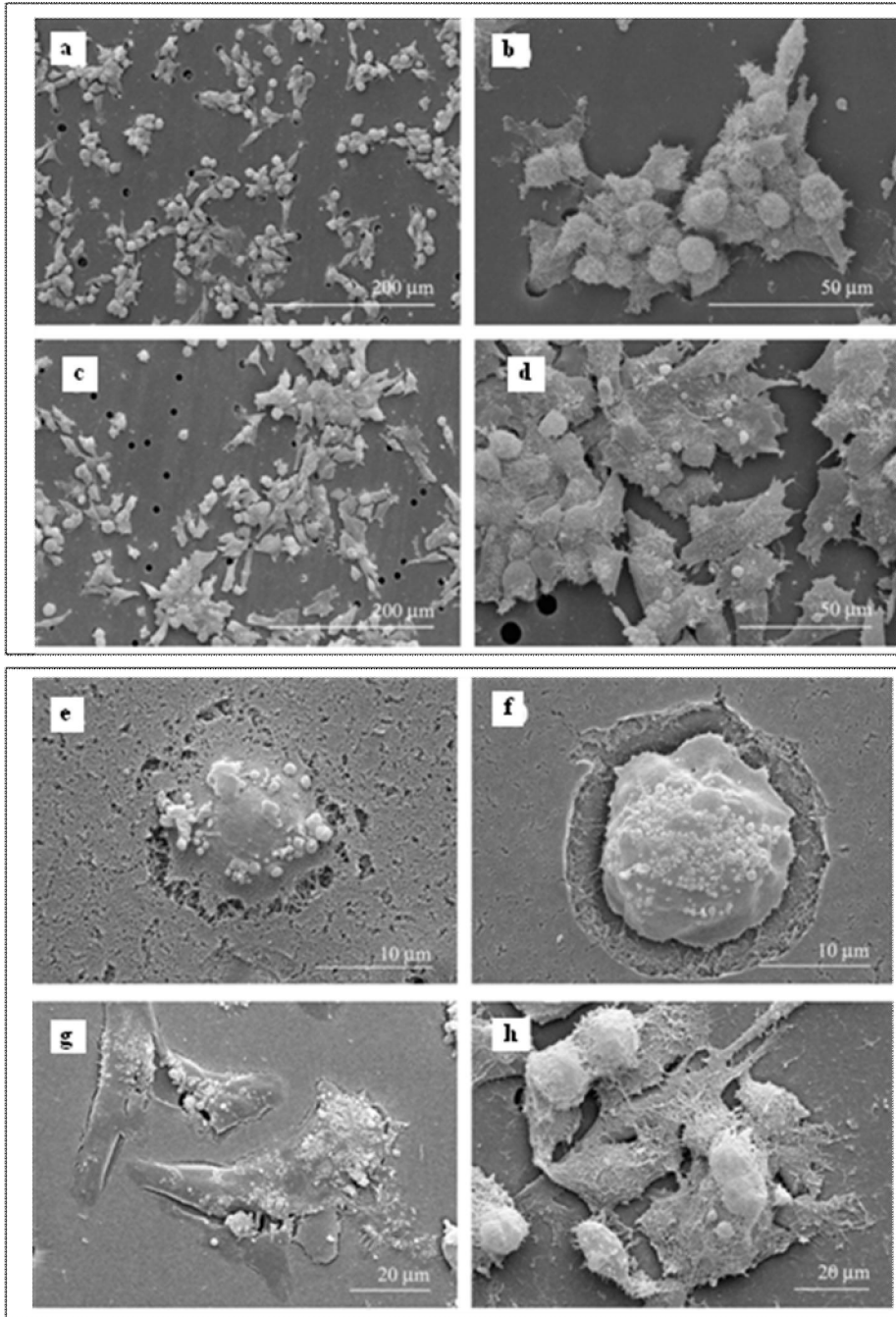
Come osservato durante la migrazione nel lato superiore della membrana, dopo il trattamento con Urantide (Fig. 7c-d) aumentano sia la formazione dei clusters di cellule che la formazione di materiale fibroso.

Durante la fase iniziale dell'invasione le cellule infiltrano il Matrigel™ attraverso protrusioni simili a vescicole adottando un movimento ameboide (Fig 7e-f); ad ogni modo le immagini suggeriscono una intensa degradazione proteolitica che intercorre nell'ultima fase di invasione (Fig. 7f-h).



**Figura 6:** effetti dell'Urantide sulla motilità e l'invasione delle cellule LNCaP.

Il trattamento con Urantide induce una riduzione dose dipendente del numero di cellule che invadono (Fig. 5); comunque le immagini suggeriscono che la digestione proteolitica non diminuisce con l'aggiunta di Urantide mentre diminuiscono le formazioni caratteristiche del movimento ameboide (Fig. 7g-h).



**Figura 7:** effetti dell'Urantide sulla motilità e l'invasione delle cellule LNCaP in presenza di Matrigel™.

### **III.V Effetti dell'Urantide sui fattori di adesione.**

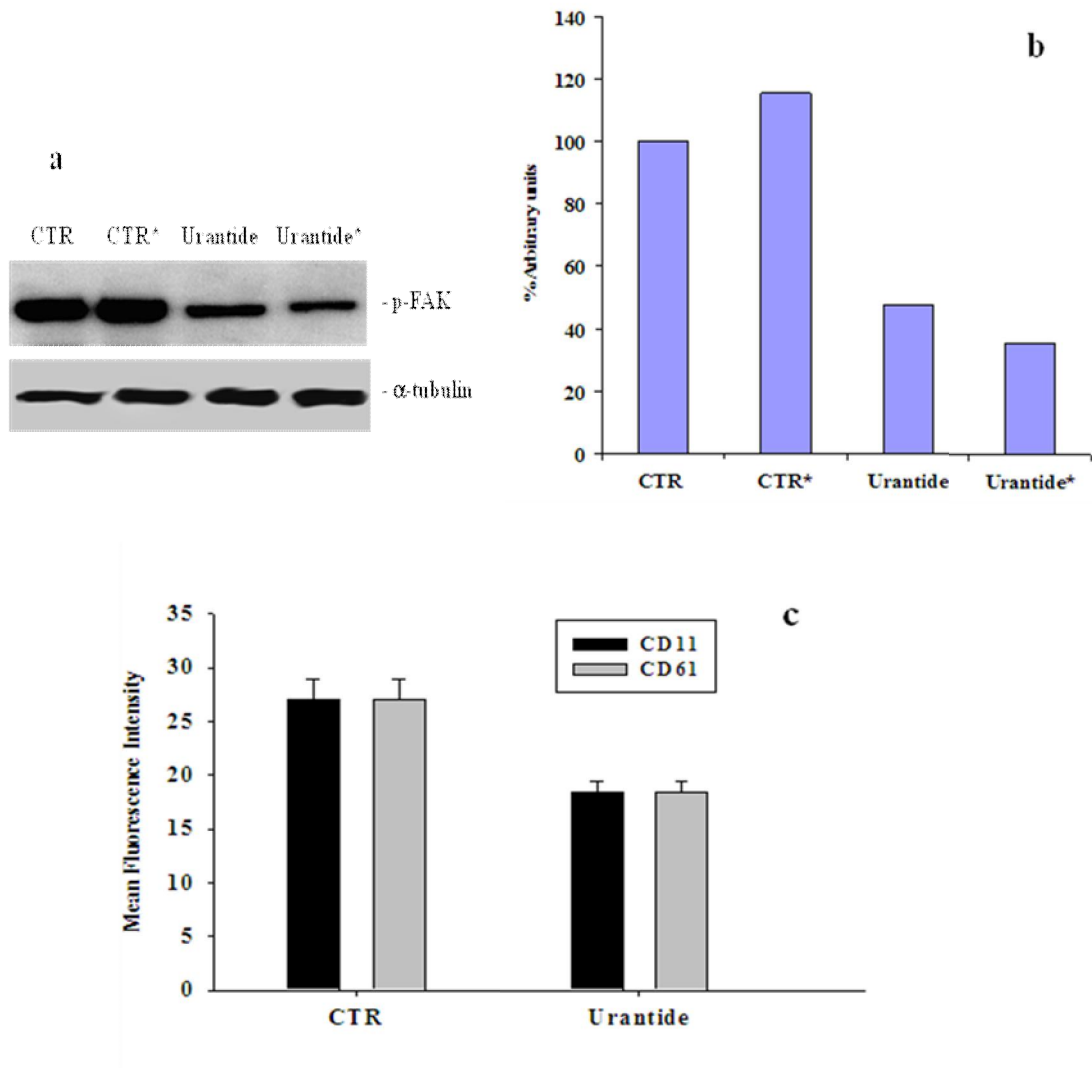
Le integrine sono molecole eterodimeriche presenti sulla superficie delle cellule le quali hanno un sito che si lega all'actina del citoscheletro, mentre un altro sito è responsabile delle interazioni con la matrice extracellulare. Inoltre le integrine mediano il signaling dallo spazio extracellulare all'ambiente interno attraverso il signaling associato alle integrine e a molecole adattatrici come FAK (chinasi di adesione focale) per regolare la sopravvivenza, la proliferazione e la forma della cellula, come la polarità, l'adesione, la migrazione e la differenziazione. FAK è una proteina tirosino-chinasica non recettoriale che promuove sia la motilità cellulare che l'invasione attraverso l'attivazione di distinti pathways. FAK non fosforila altre proteine ma una volta attivata si autofosforila (p-FAK) e attiva i meccanismi a valle.

Le cellule LNCaP, le quali mostrano una spiccata motilità, quando sono indotte a migrare mostrano un incremento della forma attivata di FAK, ossia p-FAK (Fig. 8a-b). Il trattamento con 1000 nM di Urantide per 24 h riduce in maniera significativa la quantità di p-FAK sia nelle cellule adese alla membrana che migranti (Fig. 8 a-b).

Abbiamo inoltre valutato sia l'espressione di CD61 (integrina  $\alpha v \beta 3$ ) che di CD11 (integrina  $\beta 2$ ) entrambe coinvolte nei processi di adesione cellulare (Fig. 8c).

Il trattamento per 24h con Urantide 100 nM induce un 50% di riduzione dell'espressione sia di CD11 che di CD61 in accordo con i dati precedentemente descritti (Fig. 8c).





**Figura 8:** effetti dell'Urantide sui fattori di adesione delle cellule LNCaP: a) valutazione di FAK e p-FAK; b) quantizzazione effettuata considerando l'intensità delle bande; i risultati sono espressi come % di unità arbitraria; c) valutazione di CD11 e CD61 in seguito al trattamento con 100 nM di Urantide per 24 h.

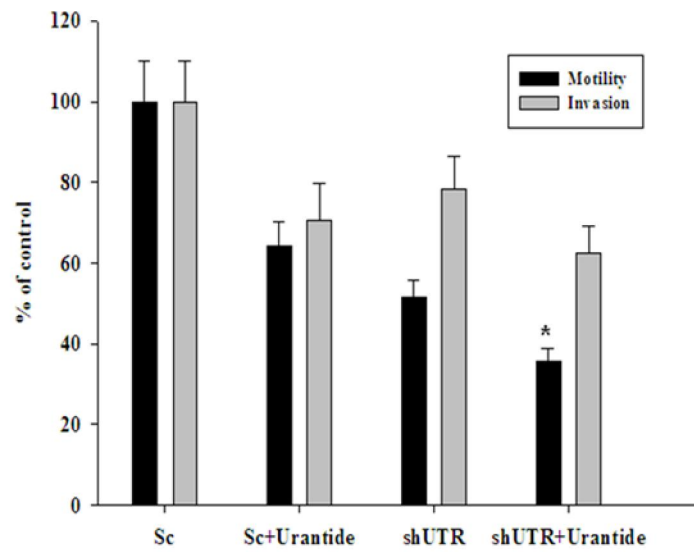
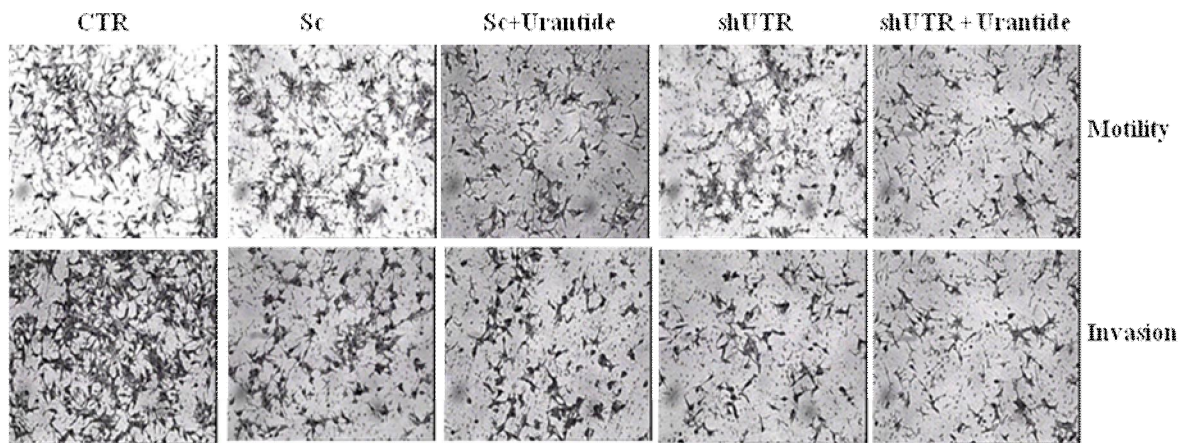
### **III.VI Effetti dell'Urantide e dell'assenza dell'UTR sulla motilità ed invasione delle cellule LNCaP.**

Per comprendere il contributo reale dell'UTR nella regolazione della motilità e dell'invasione delle cellule LNCaP, abbiamo transfettato in maniera transiente le cellule LNCaP con shRNA per UTR in modo da down-regolare l'espressione della proteina UTR.

Abbiamo riscontrato che il trattamento con Urantide alla concentrazione 100 nM per 48h e la down-regolazione dell'UTR produce rispettivamente una riduzione del 40 e 50% della motilità cellulare nelle camere di Boyden (Fig. 9). Questo effetto è di poco incrementato, con un 55% di inibizione, se si ha il trattamento con l'Urantide e la contestuale deplezione del recettore (Fig. 9).

Abbiamo rilevato che le cellule non trattate migrano attraverso la matrice del Matrigel™ in più rispetto alle cellule trattate con Urantide che transfettate con shUTR dove l'invasione è ridotta rispettivamente del 20 e 30% (Fig. 9). La down-regolazione dell'UTR nelle cellule trattate con l'Urantide non ne incrementa gli effetti, portando ad un 30% di inibizione dell'invasione cellulare (Fig. 9)

Questi risultati dimostrano che l'UTR è coinvolto nell'invasione delle cellule di carcinoma prostatico umano androgeno-dipendenti e la sua down-regolazione con uno specifico shRNA causa effetti biologici simili a quelli innescati dall'aggiunta dell'antagonista, ma non potenzia gli effetti di quest'ultimo.



**Figura 9:** Effetti qualitativi ed analisi quantitativa innescati dall'Urantide e della trasfezione con shRNA per UTR sulla motilità ed invasione delle cellule LNCaP.

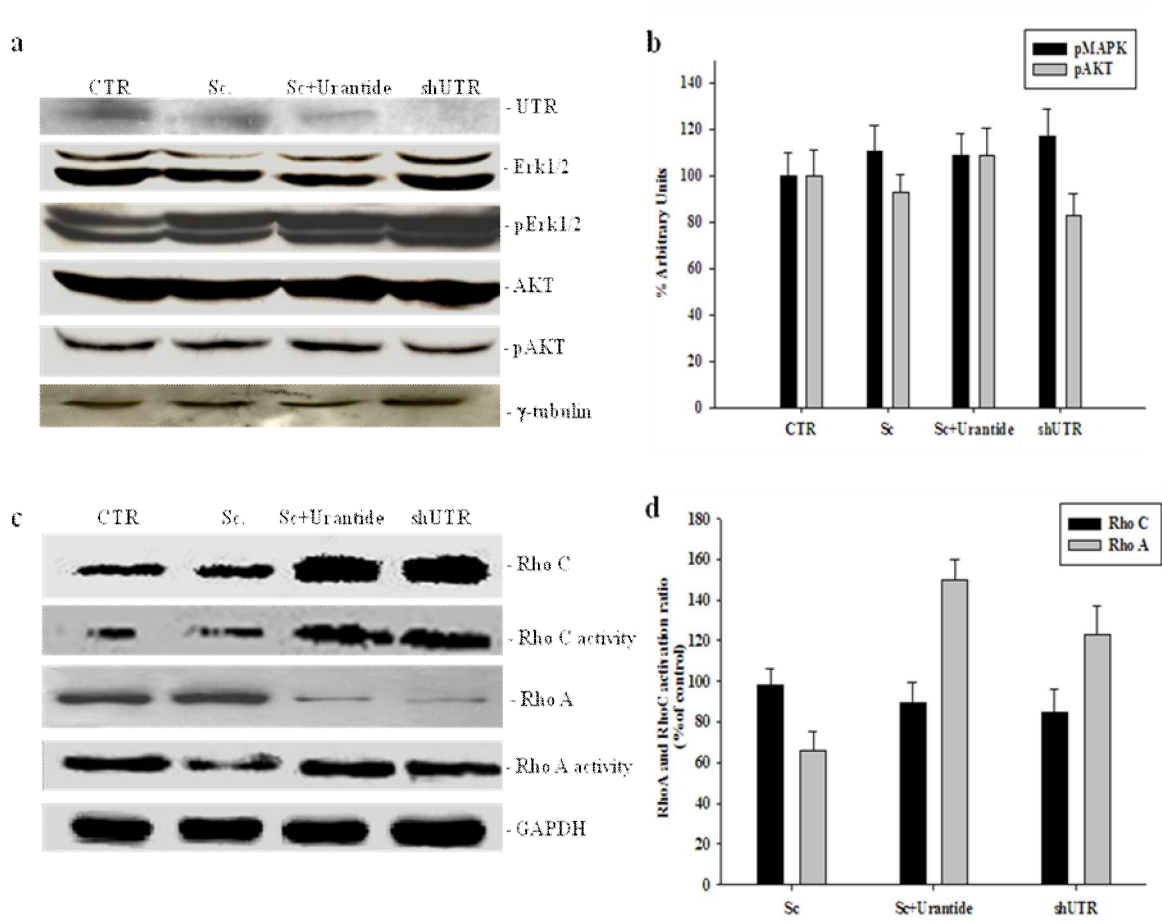
### **III.VII Effetto della down-regolazione dell'UTR sul pathway di trasduzione del segnale Ras-mediato.**

Con l'intento di valutare i meccanismi molecolari della contribuzione specifica da parte dell'UTR nella regolazione della motilità e dell'invasione cellulare delle cellule LNCaP abbiamo inoltre valutato gli effetti dell'shRNA per UTR sulla proliferazione e i pathways di sopravvivenza (Fig. 10).

Abbiamo dunque transfettato in modo transiente le cellule LNCaP con l'shRNA per UTR in modo da down-regolare l'espressione della proteina UTR (Fig. 10a). La down-regolazione dell'UTR determina un leggero incremento della fosforilazione di Erk-1/2 (Fig. 10a-b) mentre non sono stati registrati effetti significativi sulla fosforilazione di AKT.

Per di più abbiamo valutato sia gli effetti dell'Urantide che dell'shRNA per UTR sull'attivazione delle proteine appartenenti alla famiglia Ras come RhoA e RhoC, coinvolte nei meccanismi di adesione e di invasione cellulare. Abbiamo calcolato la quantità di attivazione di RhoA e RhoC facendo la proporzione tra l'intensità delle bande associate all'attività e alla forma basale di RhoA e RhoC. Più in dettaglio abbiamo riscontrato un incremento sia dell'espressione che dell'attività di RhoC (Fig.10c). Inoltre la quantità della forma attivata di RhoC non è modificata dalla down-regolazione di UTR né dall'aggiunta dell'Urantide (Fig. 10d). D'altro canto sia la deplezione dell'UTR che il trattamento con Urantide causa una riduzione dell'espressione di RhoA ma la sua attività resta inalterata (Fig. 10c).

Per cui sia il trattamento con l'Urantide che la down-regolazione dell'UTR aumenta la proporzione di RhoA attivata (Fig. 10d). Questi dati suggeriscono effetti rilevanti dell'UTR sull'attività di RhoA.



**Figura10** : effetto della down-regolazione dell'UTR e del trattamento con Urantide sul pathway di trasduzione del segnale Ras-mediato: a) analisi wester-blotting sul pathway a valle di Ras e b) quantizzazione espressa in % di unità arbitraria; c) valutazione delle proteine appartenenti alla famiglia Ras e d) quantizzazione espressa in % di unità arbitraria.

## **CAPITOLO IV**

## DISCUSSIONE

L'UTR è altamente espresso nelle cellule di cancro della prostata androgeno-dipendenti LNCaP rispetto alle cellule androgeno-indipendenti.

Nel cancro prostatico primario l'espressione dell'UTR era persa nel 10% dei tumori e una espressione ridotta ( $\leq 30\%$  cellule positive) della proteina era significativamente associata con un Gleason score più alto ( $p=0.001$ ) ma non con le altre caratteristiche clinico patologiche tabella.

L'analisi della sopravvivenza con la Kaplan-Meyer dimostrava che nell'analisi univariata la ridotta espressione dell'UTR era associata con un aumentato rischio di morte per malattia.

L'UTR rappresenta un marker prognostico potenzialmente utile per i pazienti con cancro della prostata. Infatti la sua espressione era correlata con gli altri indicatori patologici noti di aggressività del tumore come il Gleason score.

D'altra parte comunque è rimarchevole il fatto che una ridotta espressione di UTR confermava essere un indicatore prognostico negativo nella scarsa sopravvivenza nel sottogruppo di pazienti con un grado del tumore medio e/o alto, Gleason score  $\geq 7$ . In tal modo si acclara la sua significatività come marker prognostico nei pazienti con cancro della prostata.

Un'altra caratteristica interessante è che la ridotta espressione di UTR risultava essere un indicatore prognostico quando analizzato in un modello multivariato che includeva il Gleason score e stadio tumorale.

Gli esperimenti stanno proseguendo in modo da avvalorare il potenziale anti-invasivo in vivo ed in vitro dell'Urantide. Stiamo valutando sia l'espressione dell'UTR in una serie più alta di carcinomi prostatici e il legame in vivo dell'Urotensia-II biotinilata in tessuti in paraffiana.

Durante la fase iniziale dell'invasione, le cellule infiltrano il Matrigel<sup>®</sup> adottando un comportamento ameboide mediante piccole vescicole senza effettuare una degradazione proteolitica. La mobilità ameboide non richiede le proteasi extracellulari ma è associata con la formazione di piccole protrusioni simil-vescicole che sono dipendenti dall'attività di ROCK. È stato ipotizzato che la via Rho/ROCK innesca la generazione di una forza contrattile che risulta nella pressione idrostatica e le successive protrusioni simil-vescicolari. RhoA è considerato mediare gli eventi del signaling che portano alla formazione di fasci contrattili di acto-miosina e filamenti di actina attraverso il suo effettore a valle la chinasi ROCK, regolando così vari processi di contrazione inclusa la motilità cellulare. Consistentemente altri studi hanno dimostrato che l'inibizione di ROCK riduce l'invasività delle cellule tumorali in vivo, molto probabilmente attraverso un ridotto movimento ameboide delle cellule. Apparentemente le LNCaP impiegano costitutivamente oltre al modo di invasione ameboide il modo mesenchimale. Il modo di invasione mesenchimale è accoppiato al clivaggio e rimodellamento dei componenti dell'ECM usando metallo proteinasi (MMP) e altre proteasi. È stato mostrato che MMP sono secrete dalla ghiandola prostatica umana, sia in *vivo* che in *vitro* e livelli di espressione più alti di MMP2 sono associati con un aumentato Gleason score, metastasi tumorali e aggressività del tumore della prostata. Nel nostro modello sperimentale le cellule del tumore della prostata ricorrevano al movimento ameboide durante la fase iniziale del processo migratorio, poi avveniva la digestione mesenchimale proteolitica indicando che la generazione di forza contrattile innescata dalla via Rho/ROCK era indotta nella fase precoce dell'interazione del recettore con la matrice extracellulare. Il trattamento Urantide induceva una riduzione dose dipendente del numero di cellule migranti e invasive, tuttavia non era impedita la digestione proteolitica ma diminuiva drammaticamente la



formazione di vescicole cellulari in accordo con la riduzione di RhoA indotta dal trattamento. Questi risultati indicavano fortemente che il movimento ameboide rappresenta per le cellule tumorali un comportamento vantaggioso che sostiene il potenziale maligno. Inoltre il trattamento con Urantide interferiva con il pathway di FAK. FAK promuove la motilità e la proliferazione cellulare attraverso l'attivazione di vie di trasduzione distinte. È una tirosino-chinasi non recettoriale che è di solito ma non sempre associata con complessi sopramolecolari di adesione focale (FAC). L'assemblaggio ed il disassemblaggio di FAC sono critici per l'attacco e il movimento cellulare. FAK non fosforila altre proteine. Comunque, quando FAK è attivato si autofosforila e lega la chinasi Src, che a sua volta fosforila altri siti su FAK e le proteine che legano FAK, Cas e Paxillina. FAK fosforilato diviene un sito di ancoraggio all'interno dei complessi di adesione focali per mediatori di eventi multipli del signaling che regolano la crescita, sopravvivenza e morfogenesi. FAK media il turnover dell'adesione cellulare attraverso la regolazione delle Rho GTPasi, in particolare RhoA, Rac 1 e Cdc-42. FAK influenza la down-regolazione della formazione di fibre da stress mediata da RhoA mediante attivazione di RhoAGAP, GRAF (una GTPasi regolatore associata con la FAK). FAK up-regola la formazione dei lamellipodi attivando RAC1 attraverso un complesso CASCRK-DOCK-ELMO. RAC1 promuove anche la sopravvivenza e la crescita cellulare a livello dell'attivazione MEK-ERK così il trattamento con Urantide inibisce la migrazione e la proliferazione cellulare down-regolando la fosforilazione di FAK delle cellule LNCaP. Inoltre abbiamo studiato il ruolo di UTR nella regolazione della motilità e dell'invasione delle cellule LNCaP, usando shRNA per UTR in modo da down-regolare l'espressione della proteina. Sia Urantide che la down-regolazione di UTR con shRNA induceva un 70% di inibizione della motilità e invasione delle LNCaP che avveniva in parallelo con una

riduzione del 50% dell'espressione di CD61 e CD11a. Gli effetti sulla motilità e invasione cellulare sono dovuti all'inibizione dell'attività di RhoA e RhoC indotta sia dall'Urantide sia dalla trasfezione con l'shRNA per UTR. Questi dati suggeriscono che l'UTR può essere considerato un bersaglio terapeutico addizionale e un marker diagnostico e prognostico nell'adenocarcinoma della prostata.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) P. Grieco, P. Rovero, E. Novellino, *Recent Structure Activity Studies of the Peptide Hormone Urotensin-II: A Potent Vasoconstrictor* Current medicinal Chemistry, 2003, 10, 1241-1253;
- (2) R.S. Ames, H.M. Sarau, J.K. Chambers, R.N. Willet, N.V. Alyar, A.M. Romanic, C.S. Loudon, J.J. Foley, C.F. Sauermelch, R.W. Coatney, J. Disa, S.D. Holmes, J.M. Stadel, J.D. Martin, W.S. Liu, G.I. Glover, S. Wilson, D.E. McNulty, C.E. Ellis, N.A. Elshourbagy, U. Shabon, J.J. Trill, D.W.P. Hay, E.H. Olstein, S.A. Douglas *Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14* Nature, 1999, 401, 282 – 286;
- (3) A. Lavecchia, S. Cosconati, E. Novellino *Architecture of the Human Urotensin II Receptor: Comparison of the Binding Domains of Peptide and Non-Peptide Urotensin II Agonists* J. Med. Chem., 2005, 48, 2480-2492;
- (4) A. Carotenuto, P. Grieco, E. Novellino, P. Rovero *Urotensin-II Receptor Peptide Agonists* Medicinal Research Reviews, 2004, 24, 577-588;
- (5) K. Takahashi, K. Totsune, O. Murakami, Z. Arihara, T. Noshiro, Y. Hayashi, S. Shibahara *Expression of urotensin II and its receptor in adrenal tumors and stimulation of proliferation of cultured tumor cells by urotensin II Peptides*, 2003, 24, 301-306;
- (6) V. Carmada, W. Song, E. Marzola, M. Spagnol, R. Guerrini, S. Salvadori, D. Regoli, J. P. Thompson, D. J. Rowbotham, D.J. Behm, S.A. Douglas, G. Calò, D.G. Lambert *Urantide mimics urotensin-II induced calcium release in cells expressing recombinant UT receptors* European Journal of Pharmacology, 2004, 498, 83-86;

(7) P. Grieco, A. Carotenuto, P. Campiglia, I. Gomez-Monterrey, L. Auriemma, M. Sala, C. Marcozzi, R. d'Emmanuele di Villa Bianca, D. Brancaccio, P. Rovero, E. Novellino. *New Insight into the Binding Mode of Peptide Ligands at Urotensin-II Receptor: Structure-Activity Relationships Study on P5U and Urantide*. J. Med. Chem. 2009, 52, 3927–3940.

(8) M. Lopez *Oncologia medica pratica* Società editrice Universo Roma 2000 ;

(9) G. Bonadonna, G. Robustelli della Cuna *Medicina oncologica* V edizione Masson 1994;

(10) B.J. Feldman, D. Feldman *The development of androgen-independent prostate cancer* Nature, 2001, 1, 34-45;

(11) J.E. Johansson, L. Holmberg, S. Johansson, R. Bergström, H.O. Adami *Fifteen year survival in prostate cancer. A prospective, population-based study in Sweden*. JAMA. 1997;277:467-71;

(12) P.C. Albertsen, J.A. Hanley, J. Fine *20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer*. JAMA. 2005;293:2095-101;

(13) S. Halabi, E.J. Small, P.W. Kantoff, M.W. Kattan, E.B. Kaplan, N.A. Dawson *Prognostic model for predicting survival in men with hormone-refractory metastatic prostate cancer*. J Clin Oncol. 2003;21:1232-7;

(14) E.S. Holmboe, J. Concato *Treatment decisions for localized prostate cancer: asking men what's important*. J Gen Intern Med. 2000;15:694-701.

- (15) A.W. Partin, M.W. Kattan, E.N. Subong, P.C. Walsh, K.J. Wojno, J.E. Oesterling *Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update.* JAMA. 1997;277:1445-51.
- (16) D.F. Gleason, G.T. Mellinger *Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging.* J Urol 1974; 11: 58–64.
- (17) L. Egevad *Recent trends in gleason grading of prostate cancer. Prognosis, reproducibility and reporting.* Anal Quant Cytol Histol. 2008 Oct;30(5):254-60.
- (18) D.I. Quinn, S.M. Henshall, R.L. Sutherland *Molecular markers of prostate cancer outcome.* Eur J Cancer. 2005;41:858-87.
- (19) A. van Bokhoven, M. Varella-Garcia, C. Korch, W.U. Johannes, E.E. Smith, H.L. Miller, S.K. Nordeen, G.J. Miller, M.S. Lucia *Molecular Characterization of Human Prostate Carcinoma Cell Lines* The Prostate, 2003, 57, 205-225;
- (20) J. Gerald Mizejewsky. *Role of integrins in cancer: survey expression patterns.* Molecular Medicine 1999; 44435.
- (21) H. Lal Goel, J. Li, S. Kogan, L. Languino. *Integrins in prostate cancer progression.* Endocrine-Related Cancer (2008) 15 657–664.
- (22) P. Koistinen, J. Heino. *Integrins in Cancer Cell Invasion.* Madame Curie Bioscience Database.

(23) E. A. Clark, W. G. King, J. S. Brugge, M. Symons, Richard O. Hynes. *Integrin-mediated Signals Regulated by Members of the Rho Family of GTPases*. The Journal of Cell Biology, Volume 142, Number 2, July 27, 1998 573–586.