

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA, PATOLOGIA E  
IGIENE AMBIENTALE IN MEDICINA VETERINARIA**

**XXV Ciclo**

**Coordinatore: Chiar.mo Prof. Giuseppe Cringoli**

**TESI**

**STUDIO DEI PROCESSI CELLULARI E MOLECOLARI  
ATTIVATI DALL'INTERAZIONE TRA IL DOMINIO NK1 DI  
HGF ED IL RECETTORE c-MET IN CELLULE EPITELIALI  
DI PROSTATA**

**DOCENTE GUIDA:**

**Chiar.ma Prof. ssa**

**Norma Staiano**

**CANDIDATA:**

**Dott.ssa Silvana Rea**

**TUTOR:**

**Chiar.mo Prof.**

**Luigi Michele Pavone**

**ANNO ACCADEMICO 2012/2013**

# INDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	
<b>1.1</b>	<b>Il tumore prostatico: incidenza, fattori di rischio e approcci terapeutici</b>	<b>p. 4</b>
<b>1.2</b>	<b>Struttura del complesso HGF/c-MET</b>	<b>p. 7</b>
<b>1.3</b>	<b>Segnali cellulari e molecolari attivati dal complesso HGF/c-MET</b>	<b>p. 13</b>
<b>1.4</b>	<b>Ruolo del complesso HGF/c-MET nei tumori</b>	<b>p. 16</b>
<b>2.</b>	<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>p. 18</b>
<b>3.</b>	<b>PROCEDURE SPERIMENTALI</b>	
<b>3.1</b>	<b>Materiali</b>	
<b>3.1.1</b>	<i>Anticorpi e prodotti chimici</i>	<b>p. 20</b>
<b>3.1.2</b>	<i>Microrganismi e mezzi di coltura</i>	<b>p. 21</b>
<b>3.1.3</b>	<i>Vettore di espressione</i>	<b>p. 22</b>
<b>3.2</b>	<b>Metodologie</b>	
<b>3.2.1</b>	<i>Trasformazione di cellule competenti di <i>P. pastoris</i></i>	<b>p. 22</b>
<b>3.2.2.</b>	<i>Espressione di <i>NK1</i></i>	<b>p. 24</b>
<b>3.2.3.</b>	<i>Elettroforesi</i>	<b>p. 25</b>
<b>3.2.4.</b>	<i>Cromatografia</i>	<b>p. 26</b>
<b>3.2.5.</b>	<i>Colture cellulari</i>	<b>p. 27</b>
<b>3.2.6</b>	<i>Immunofluorescenza</i>	<b>p. 27</b>
<b>3.2.7</b>	<i>Saggio di proliferazione</i>	<b>p. 28</b>

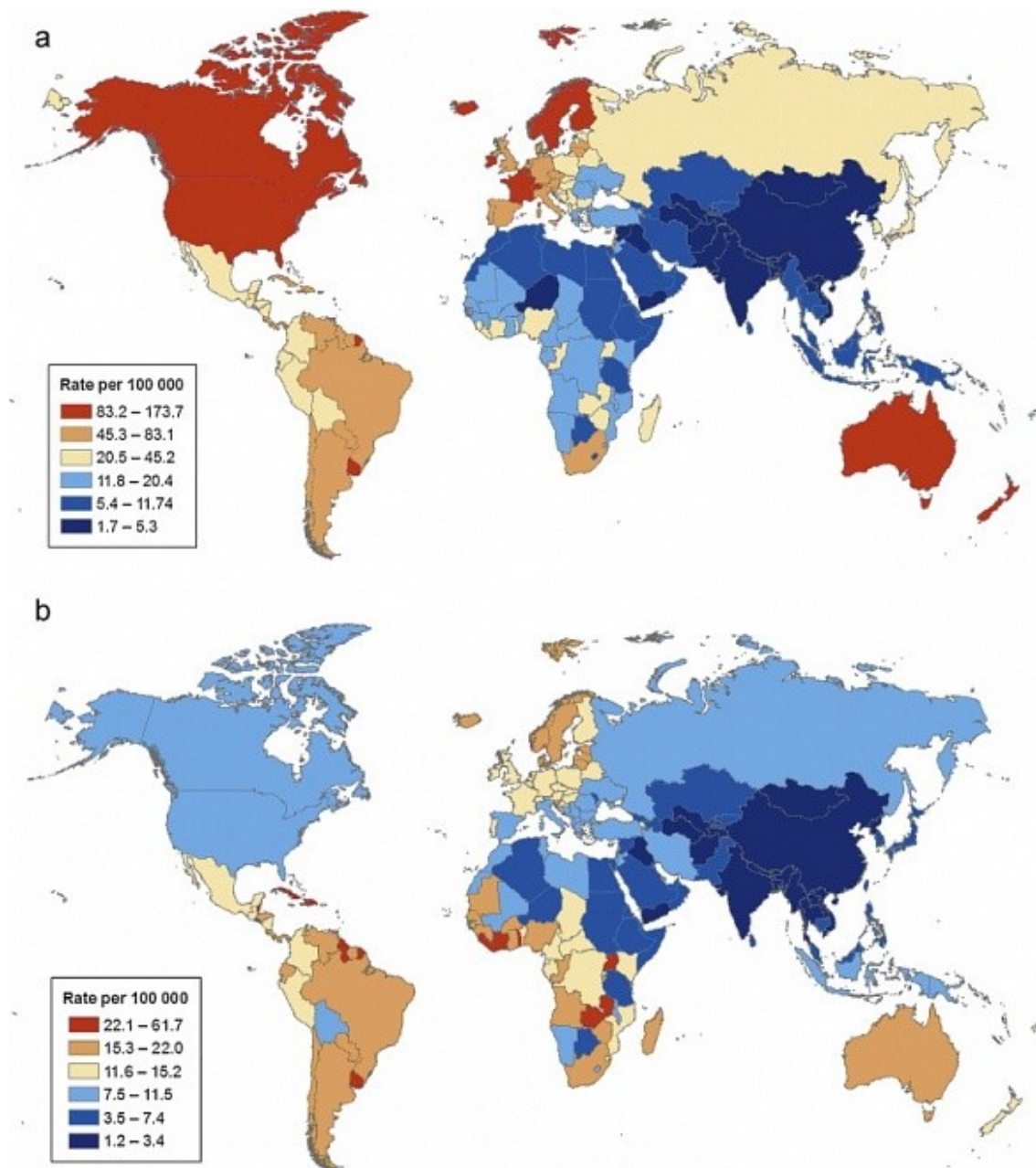
<b>3.2.8</b>	<b><i>Saggi di “scattering” e EMT</i></b>	<b>p.28</b>
<b>3.2.9</b>	<b><i>Saggio di “wound healing”</i></b>	<b>p. 29</b>
<b>3.2.10</b>	<b><i>Immunoprecipitazione di proteine e Western blotting</i></b>	<b>p. 29</b>
<b>4.</b>	<b>RISULTATI</b>	
<b>4.1</b>	<b>Sintesi ricombinante di NK1</b>	
<b>4.1.1.</b>	<b><i>Produzione di NK1</i></b>	<b>p. 31</b>
<b>4.1.2.</b>	<b><i>Purificazione di NK1</i></b>	<b>p. 33</b>
<b>4.2</b>	<b>Attività biologica di NK1 in cellule epiteliali di prostata PNT1A</b>	
<b>4.2.1</b>	<b><i>Le cellule PNT1A esprimono c-MET</i></b>	<b>p. 33</b>
<b>4.2.2</b>	<b><i>NK1 stimola la proliferazione ed attiva ERK1/2 e STAT3</i></b>	<b>p. 39</b>
<b>4.2.3</b>	<b><i>NK1 induce EMT ed attiva SMAD2/3</i></b>	<b>p. 41</b>
<b>4.2.4</b>	<b><i>NK1 induce “scattering” ed attiva Akt</i></b>	<b>p. 44</b>
<b>4.2.5</b>	<b><i>NK1 promuove “wound healing” ed attiva p125FAK e c-Src</i></b>	<b>p. 47</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	<b>p. 50</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>p. 55</b>
<b>7.</b>	<b>ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI</b>	<b>p. 66</b>

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 Il tumore prostatico: incidenza, fattori di rischio, approcci terapeutici

Il tumore prostatico è il secondo tipo di tumore più diffuso nel mondo dopo il tumore ai polmoni e rappresenta la terza causa di morte più comune nei paesi sviluppati (1-2). L'incidenza di tale tipo di tumore, tuttavia, varia notevolmente nelle diverse parti del mondo (Figura 1). Stati Uniti, Canada, Svezia, Australia e Francia hanno la più alta incidenza di tumore alla prostata che varia da 48,1 a 137,0 casi all'anno su 100.000 persone (stima nel periodo 1988-1992), laddove nei Paesi europei si osserva un'incidenza di medio livello che varia da 23,9 a 31,0 casi all'anno su 100.000 persone. La più bassa incidenza si riscontra nelle popolazioni dell'Asia (da 2,3 a 9,8 casi all'anno su 100.000 persone) (3). A tutt'oggi non si sa bene se la differenza d'incidenza del tumore alla prostata fra le diverse etnie sia dovuta ai metodi di "screening" che si utilizzano o a fattori ambientali, genetici e/o ormonali. I fattori di rischio accertati comprendono l'avanzamento dell'età, i comportamenti alimentari (i.e., una dieta ricca di grassi animali), le abitudini sessuali (i.e., pratiche sessuali precoci e infezioni virali e batteriche trasmissibili per via sessuale), le funzioni ormonali, le infiammazioni croniche della prostata ed alterazioni genetiche (3-4).

Vari studi hanno dimostrato una forte familiarità per il tumore della prostata: la presenza di uno, due o tre parenti di primo grado affetti aumenta il rischio di tumore alla prostata rispettivamente di 2,2, 4,9 e 10,9 volte (5). La predisposizione ereditaria quale fattore di rischio per il tumore della prostata è stata confermata dall'evidenza che coppie di gemelli monozigoti hanno un grado di ricorrenza di tale tumore 4 volte superiore a quello di una coppia di gemelli dizigotici (6).



**Figura 1:** a) Tasso di incidenza mondiale del cancro alla prostata standardizzato in base all'età, b) Tasso di mortalità mondiale per cancro alla prostata (GLOBOCAN 2008).

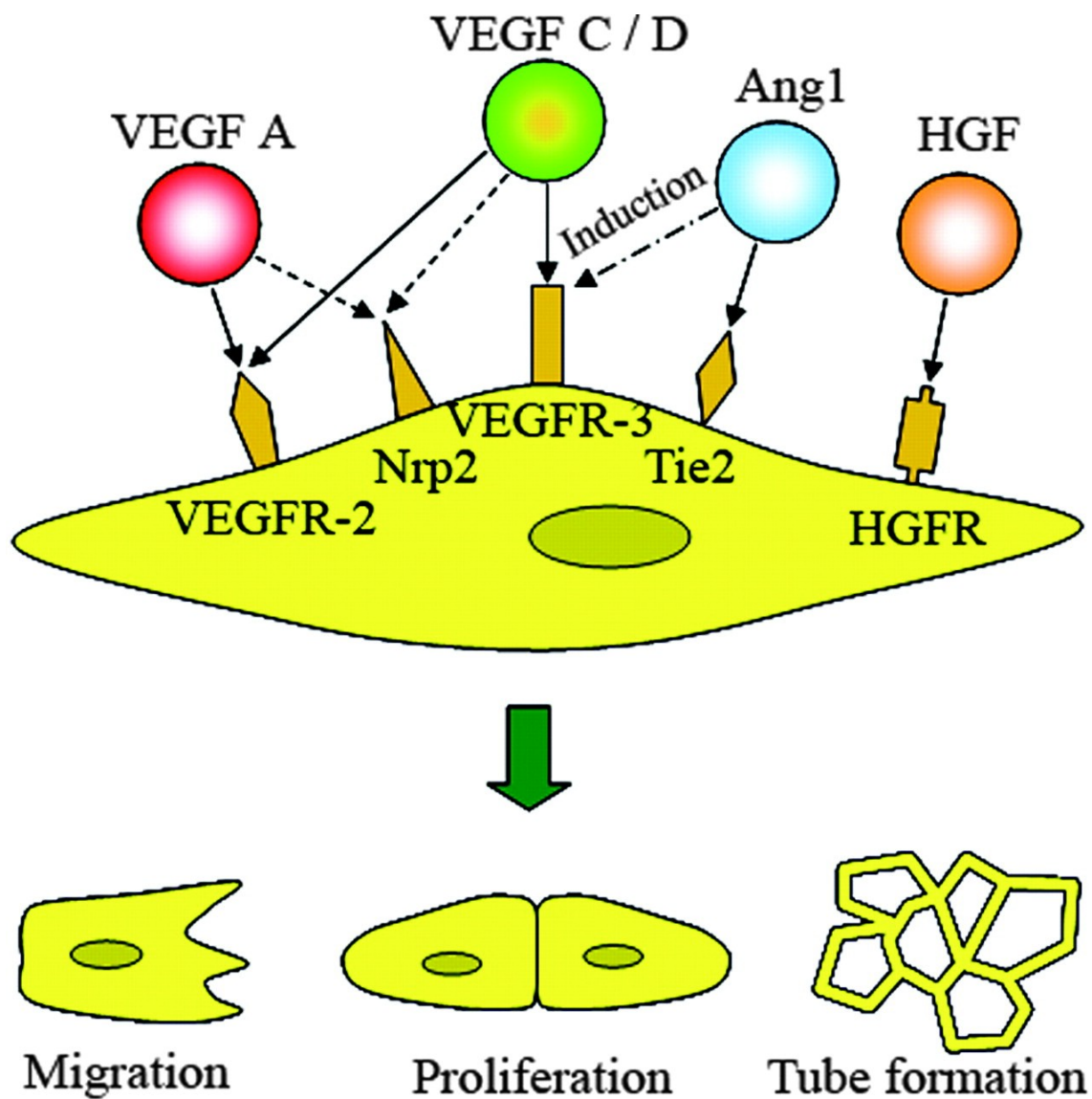
Ricerche epidemiologiche e sperimentali hanno dimostrato il ruolo chiave degli ormoni steroidei nel tumore della prostata (7-8). Tali ormoni regolano lo sviluppo, la crescita e la maturazione della ghiandola e la loro azione perdura nell'età adulta contribuendo al mantenimento della sua integrità strutturale e funzionale. La ghiandola costituisce l'organo bersaglio degli androgeni e la terapia basata sull'inibizione dei recettori degli androgeni ha rappresentato per lungo tempo la terapia di elezione per il tumore alla prostata (7). Recenti studi hanno dimostrato un ruolo anche degli estrogeni nello sviluppo e nella progressione del tumore prostatico (8). In particolare, è stato osservato che nelle specie suscettibili di cancro alla prostata (uomo e cane) il rapporto estrogeni/androgeni aumenta con l'età ed un incremento di tale rapporto è correlato allo sviluppo sia di iperplasia benigna che di cancro della prostata (9). Le variazioni nel rapporto estrogeni/androgeni sono dovuti alla riduzione della funzione testicolare (ridotta produzione di testosterone) e all'aumento dell'attività dell'aromatasi, enzima responsabile della sintesi di estrogeni, che è localizzata nello stroma prostatico. In passato estrogeni esogeni sono stati utilizzati per il trattamento del cancro alla prostata come agenti di castrazione chimica. Quando è emerso il ruolo degli estrogeni nella trasformazione e progressione neoplastica della ghiandola, molecole anti-estrogeni sono state proposte per la terapia del tumore (10).

Nuove opportunità terapeutiche per il trattamento della crescita benigna e maligna della ghiandola prostatica sono emerse da studi volti alla caratterizzazione delle interazioni tra il tumore prostatico ed il microambiente circostante, lo stroma (11). Tali ricerche hanno dimostrato che lo stroma prostatico, composto da diversi tipi di cellule che secernono fattori di crescita, componenti della matrice extracellulare (ECM), metalloproteinasi e molecole angiogeniche, gioca un ruolo chiave nei processi di trasformazione delle cellule prostatiche da un fenotipo non tumorigenico e non

metastatico ad un fenotipo maligno. Le interazioni stroma-epitelio coinvolgono una serie di fattori solubili con i rispettivi recettori che svolgono funzioni autocrine e paracrine e regolano i processi dello sviluppo della prostata, l'ispessimento benigno della ghiandola e la sua trasformazione neoplastica. I fattori di crescita solubili che mediano la comunicazione bi-direzionale tra stroma ed epitelio comprendono il fattore di crescita epatocitario (HGF) (12-13), il "transforming growth factor- $\beta$ " (TGF- $\beta$ ) (14), il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) (15) e molti altri che cooperano l'uno con l'altro o con altre molecole segnale, quali le proteine della ECM e le integrine, promuovendo una cascata di segnali che culminano nella crescita tumorale e nella diffusione metastatica in siti distanti (Figura 2). Approcci terapeutici diretti verso componenti dello stroma risultano più promettenti rispetto alle terapie convenzionali per prevenire la progressione e la metastatizzazione del tumore alla prostata (10-16).

## **1.2 Struttura del complesso HGF/c-MET**

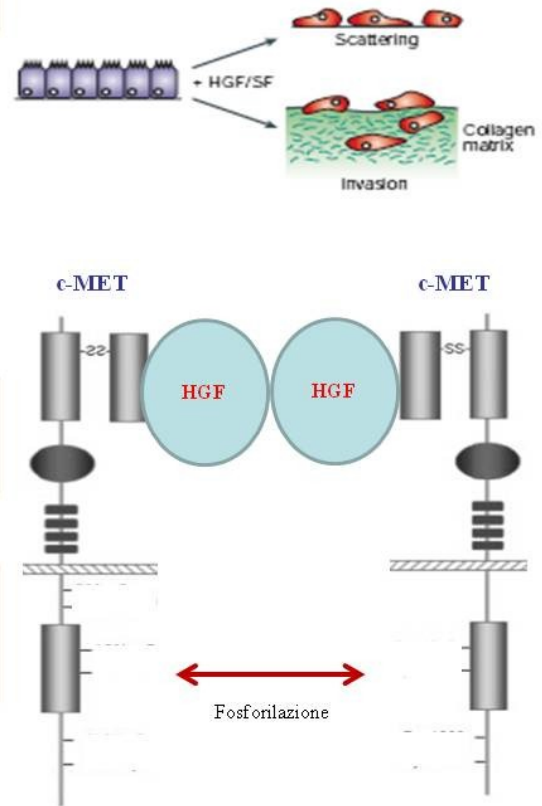
Un classico sistema ligando-recettore per la comunicazione epiteliale-mesenchimale nella prostata normale e cancerosa è rappresentato dal complesso HGF/c-MET (17-18) (Figura 3). Il recettore c-MET appartiene alla famiglia dei recettori tirosin chinasi (RTK). Tali recettori svolgono un ruolo chiave nella regolazione di importanti processi cellulari quali la proliferazione, il differenziamento, la neo-vascularizzazione e la riparazione dei tessuti. L'espressione aberrante di alcuni RTK è stata associata allo sviluppo e progressione di diversi tipi di tumore (19).



**Figura 2:** Rappresentazione schematica dell'azione dei fattori di crescita nella progressione tumorale.



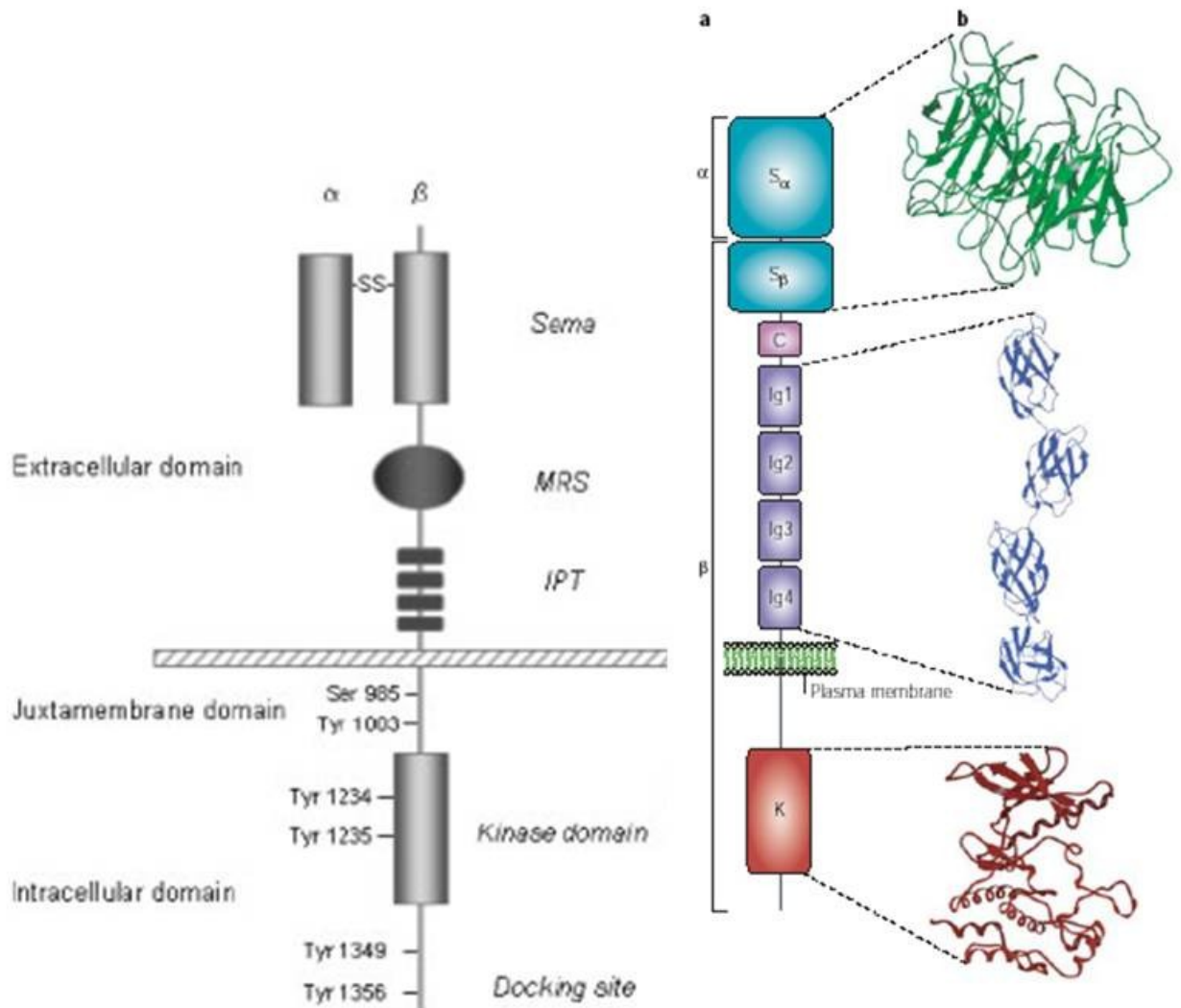
Category	Cancer type
Carcinomas	Bladder
	Breast
	Cervical
	Cholangiocarcinoma
	Colorectal
	Oesophageal
	Gastric
	Head and neck
	Kidney
	Liver
	Lung
	Nasopharyngeal
	Ovarian
	Pancreas/Gall bladder
	Prostate
	Thyroid
Musculoskeletal sarcomas	Osteosarcoma
	Synovial sarcoma
	Rhabdomyosarcoma
Soft tissue sarcomas	MFH/Fibrosarcoma
	Leiomyosarcoma
	Kaposi's sarcoma
Haematopoietic malignancies	Multiple myeloma
	Lymphomas
	Adult T-cell leukaemia
	Chronic myeloid leukaemia
Other neoplasms	Glioblastomas/
	Astrocytomas
	Melanoma
	Mesothelioma
	Wilms' tumor



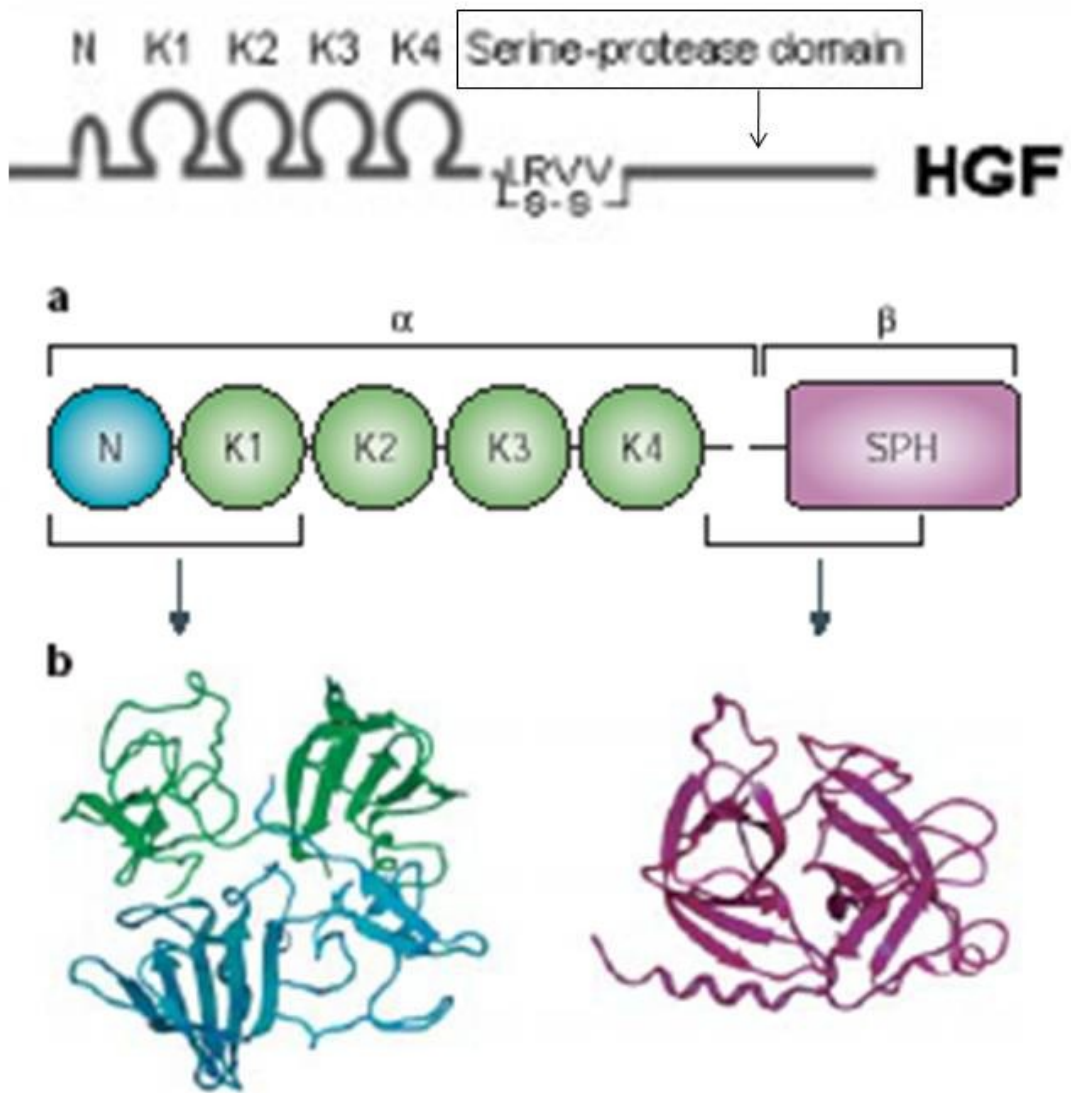
**Figura 3:** Complesso HGF/c-MET nei tumori (Birchmeier et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4:915-25).

Il recettore c-MET è un eterodimero originato dal taglio proteolitico di un precursore a singola catena e formato da una catena  $\beta$  transmembrana (145 kD) e da una catena  $\alpha$  extracellulare (50 kD) (Figura 4). La catena  $\alpha$  eterodimerizza con la porzione ammino-terminale della catena  $\beta$ , formando il dominio SEMA, principale sito di legame per il ligando HGF (20). La porzione extracellulare della catena  $\beta$  è composta da un dominio ricco di cisteine, noto come “MET-related sequence” (MRS), e quattro domini immunoglobuline-simili. La porzione intracellulare del recettore è composta dal sito catalitico e da una coda C-terminale contenente due tirosine essenziali per l'attività fisiologica di c-MET e per il suo potenziale oncogenico (21-22).

Il ligando ad alta affinità per c-MET, HGF, è una glicoproteina di 90 kDa contenente 728 residui amminoacidici. HGF appartiene alla famiglia del plasminogeno e contiene una porzione N-terminale caratterizzata da un “hairpin loop” seguito da 4 domini kringle ed un dominio serin proteasico privo di attività proteolitica (Figura 5) (23). HGF viene secreto dalle cellule mesenchimali sotto forma di un precursore inattivo a singola catena che è processato proteoliticamente per dare origine alla forma biologicamente attiva, l'eterodimero  $\alpha/\beta$ . La catena  $\alpha$ , contenente l'N-terminale e i quattro domini kringle, contiene il dominio NK1 ad alta affinità di legame per il recettore c-MET. La catena  $\beta$ , legata tramite un ponte disolfuro alla catena  $\alpha$ , anch'essa necessaria per il legame a c-MET, è composta da un dominio serin proteasico omologo alla chimotripsina (24). Il dominio serin proteasico di HGF manca di attività proteolitica a causa dell'assenza della triade catalitica Asp-His-Ser tipica degli enzimi serin proteasici. Confronti tra l'attività biologica di HGF a catena doppia e del precursore inattivo di HGF a catena singola hanno mostrato che entrambe le forme di HGF legano c-MET con affinità paragonabile, ma solo la forma matura di HGF è capace di attivare c-MET (25).



**Figura 4:** Struttura del recettore tirosin chinasi c-MET (Birchmeier et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4:915-25).



**Figura 5:** Struttura di HGF e dei suoi domini NK1 e SPH (Birchmeier et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4:915-25).

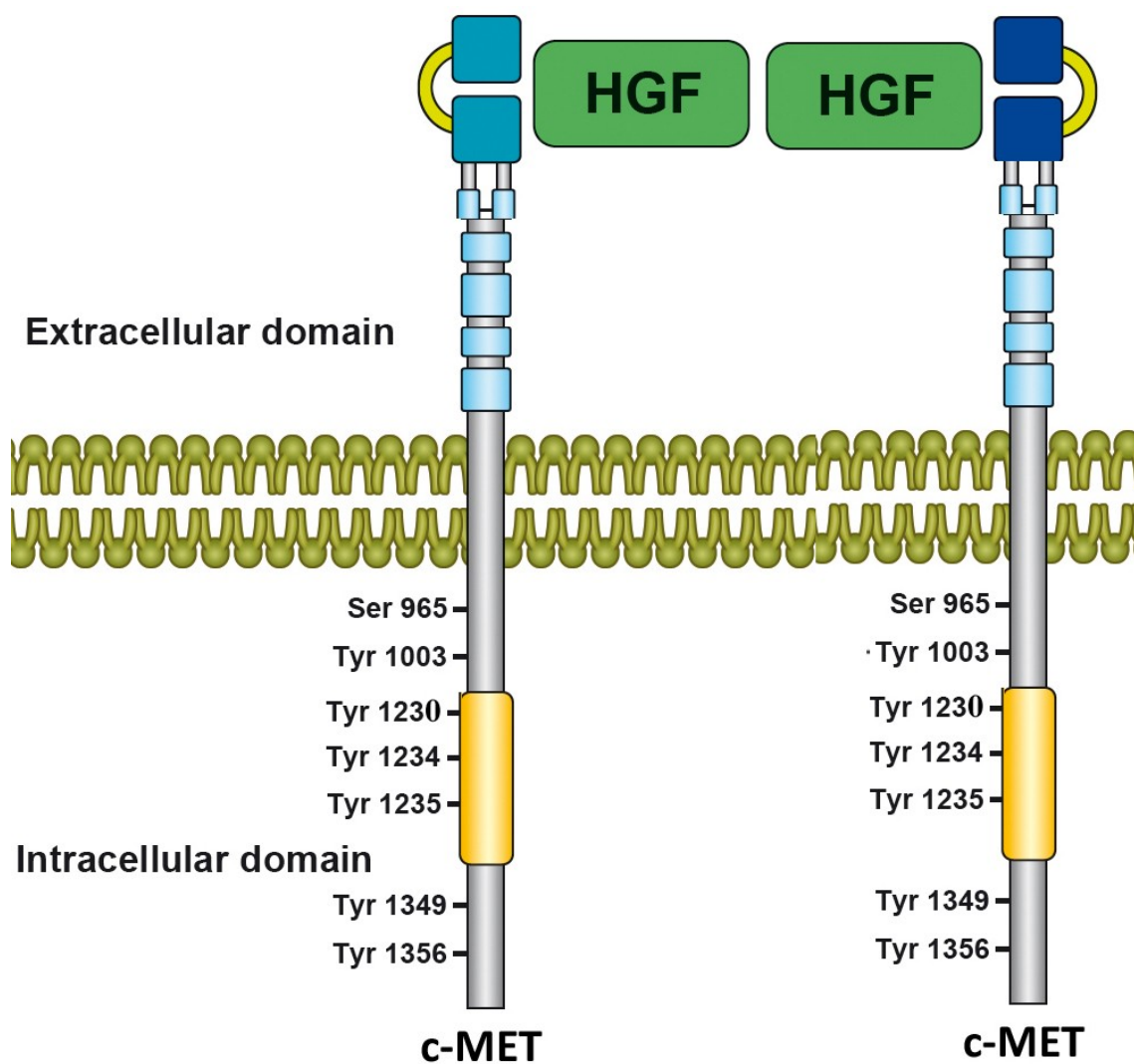
Inoltre, vari frammenti della catena  $\alpha$  tronchi al C-terminale (denominati NK1, NK2, o NK4 a seconda del numero di domini kringle conservati) legano c-MET ed in alcuni casi, quale ad esempio NK4, agiscono come potenti antagonisti delle funzioni di c-MET (26-30).

### **1.3 Segnali cellulari e molecolari attivati dal complesso HGF/c-MET**

Il recettore c-MET è espresso in cellule epiteliali (31-32), cellule endoteliali (33-34), mioblasti (35), cellule del sistema ematopoietico (36-37) e motoneuroni spinali (38). Il legame di HGF con c-MET induce l'omodimerizzazione del recettore e la fosforilazione di tre residui tirosinici (Y1230, Y1234 and Y1235) nel "loop" di attivazione del recettore conferendo ad esso attività chinasi (39) (Figura 6). La coda C-terminale di c-MET contiene le tirosine Y1349 e Y1356 che fosforilate costituiscono siti di ancoraggio per diverse proteine adattatrici intracellulari (21-22).

Il recettore c-Met ed il ligando HGF sono espressi in numerosi tessuti durante lo sviluppo embrionale e nell'adulto. Studi con modelli murini hanno mostrato che, durante lo sviluppo, HGF e c-MET forniscono i segnali essenziali per lo sviluppo del fegato, della placenta e del muscolo scheletrico (40-42). Nell'adulto i risultati ottenuti con modelli murini indicano un ruolo importante di c-MET nel riparare e rigenerare tessuti danneggiati (43-46).

L'attivazione di c-MET *in vitro* ed *in vivo* induce una molteplicità di risposte biologiche tra cui un aumento della capacità delle cellule a dissociarsi, distruggere la matrice extracellulare, migrare e proliferare (31, 33, 47-48). La prima fase di tale processo comprende la cosiddetta "transizione epiteliale-mesenchimale" (EMT).



**Figura 6:** Dimerizzazione di c-MET mediata da HGF (Accornero et al., *Curr Med Chem.* 2010;17:2699-712).

Durante l'EMT avviene la rottura delle giunzioni che tengono unite le cellule nel monostrato epiteliale, le cellule riorganizzano il loro citoscheletro e perdono il fenotipo epiteliale acquisendone uno mesenchimale. L'EMT è un evento fondamentale in numerosi processi morfogenici durante lo sviluppo embrionale e durante la riparazione dei tessuti (49). Studi relativi all'effetto di HGF sull'EMT hanno fornito risultati controversi (50-52). In alcuni casi è stato riportato che HGF ha effetti inibitori sul TGF- $\beta$ , un potente induttore dell'EMT, mentre in altri casi è stato osservato che l'interazione tra questi due fattori regola la tubulogenesi durante la formazione e la rigenerazione di organi quali la ghiandola mammaria, polmone e rene. In quest'ultimo caso è stata suggerita l'esistenza di un "crosstalk" tra i segnali indotti da TGF- $\beta$  e quelli indotti da HGF durante la morfogenesi e la rigenerazione di tessuti danneggiati (50, 53).

La cascata di segnali molecolari attivata dalla formazione del complesso HGF/c-MET per coordinare tutti gli eventi cellulari descritti è molto complessa. I residui di tirosina di c-MET, tra cui Y1349 e Y1356, presenti nella coda C-terminale forniscono un sito di ancoraggio per le proteine Grb2 e Shc che legano c-MET alla via di trasduzione di segnali mediata dalle protein chinasi MAPK associata alla proliferazione ed alla migrazione cellulare (54). La subunità p85 della fosfatidil-inositolo chinasi PI3K ha un ruolo fondamentale quale agente antiapoptotico (55). La proteina adattatrice Gab1 fornisce siti di ancoraggio per diverse proteine coinvolte nella trasduzione di segnali, potenziando e diversificando i segnali a valle del recettore c-MET (56). Infine, le ligasi ubiquitine Cbl che si ancorano alla tirosina fosforilata Y1003 di c-MET svolgono un ruolo fondamentale per l'ubiquitinazione e la degradazione di c-MET (57).

#### **1.4 Ruolo del complesso HGF/c-MET nei tumori**

L'attivazione di c-MET è documentata in molteplici patologie maligne nell'uomo, tra cui i tumori alla vescica, mammella, cervice, colon-retto, stomaco, testa, collo, prostata, pancreas, reni, tiroide ed ovaie, e in vari sarcomi, tumori ematopoietici e melanoma (13, 45, 52, 58). Tutte le risposte fisiologiche evocate da c-MET durante la formazione degli organi e la rigenerazione dei tessuti sono caratteristiche anche dello sviluppo e della progressione del cancro. Le cellule neoplastiche, infatti, hanno la capacità di promuovere l'EMT, spostarsi attraverso l'ambiente extracellulare, sopravvivere in compartimenti estranei e proliferare per raggiungere siti distanti. La disregolazione delle vie di trasduzione di segnali di HGF/c-MET promuove la formazione di tumori e l'invasione attraverso molteplici meccanismi che comprendono: a) la formazione di un "loop" autocrino che rende le cellule indipendenti dai fattori di crescita; b) l'iperespressione di c-MET che determina l'omodimerizzazione del recettore e l'attivazione anche in assenza di HGF; c) la presenza di mutazioni puntiformi di singoli amminoacidi che generano un recettore costitutivamente attivo (59).

Un'altra caratteristica importante di c-MET è la sua abilità d'interagire con altri recettori sulla superficie delle cellule (60). Sono stati identificati i seguenti "partners" molecolari di c-MET: recettori tirosin chinasi quali, ad esempio, EGFR, RON, ErbB2, l'integrina  $\alpha 6\beta 4$ , i recettori per l'acido ialuronico CD44 e il gruppo B delle plexine (19, 61-64). Il "crosstalk" tra c-MET e gli altri "partners" di membrana modula l'attivazione di c-MET e consente l'integrazione dei segnali che regolano le risposte cellulari. L'attivazione, ad esempio, delle vie di segnali di Ras-MAPK e PI3K-Akt è rafforzata quando c-MET è attivato contemporaneamente ad EGFR (65).



In conclusione, l'attivazione di c-MET mediata dal ligando HGF implica la fosforilazione di alcuni residui tirosinici del recettore e la conseguente stimolazione di numerose vie di trasduzione di segnali a cui corrispondono una serie di risposte biologiche quali la mitosi, la motilità cellulare, l'angiogenesi e l'inibizione dell'apoptosi (19, 31, 33-36, 45, 47). L'attivazione impropria del sistema HGF/c-MET è responsabile dell'insorgenza, della progressione e della diffusione metastatica di numerosi tumori (12, 19, 25, 45, 47, 59). Ad oggi, la cascata di segnali attivata dal complesso HGF/c-MET sia nella prostata normale che tumorale non è stata del tutto chiarita.

## 2. SCOPO DELLA TESI

Numerose evidenze hanno dimostrato un ruolo determinante della citochina pleiotropica HGF e del suo recettore tirosin chinasi c-MET nella crescita e progressione tumorale e nelle metastasi. Questo lavoro di tesi è rivolto alla caratterizzazione del ruolo di HGF/c-MET nella crescita e progressione del cancro della prostata. In precedenza, le conseguenze biologiche del legame di HGF a c-MET sono state analizzate in diversi sistemi cellulari in coltura, soprattutto in linee cellulari tumorali, o in campioni di tessuto tumorale di diversa origine. I segnali cellulari attivati dal complesso HGF/c-MET, responsabili della trasformazione fenotipica di cellule normali in cellule tumorali, tuttavia, differiscono nei vari tessuti e, ad oggi, sono stati analizzati in diversi studi indipendenti, ma mai in un'unica linea cellulare. Inoltre, le cellule epiteliali di prostata normale e le cellule epiteliali di prostata tumorali differiscono nella loro risposta ad HGF (66).

In questa ricerca sono state studiate le risposte cellulari e molecolari conseguenti all'interazione HGF/c-MET utilizzando cellule epiteliali di prostata umana PNT1A. Tali cellule rappresentano un efficace modello per l'analisi dei processi cellulari quale, ad esempio, la proliferazione dell'epitelio prostatico in risposta ad androgeni e fattori di crescita (67). Sebbene le cellule PNT1A siano considerate cellule pre-neoplastiche in quanto il processo di immortalizzazione con SV40T le rende suscettibili alla trasformazione maligna, esse sono cellule non-tumorigeniche che mostrano proprietà molecolari e biochimiche molto simili all'epitelio di prostata normale (68).

Allo scopo di valutare gli effetti morfologici e molecolari derivanti dall'interazione HGF/c-MET nella linea cellulare epiteliale di prostata umana PNT1A, è stato sintetizzato per via ricombinante in colture di lievito *Pichia pastoris* il frammento

di HGF NK1. Questa molecola, una variante di “splicing” di HGF, costituita dal suo dominio N-terminale e dal primo dominio kringle, fu dapprima descritta come antagonista di c-MET, ma studi successivi su colture cellulari e su modelli *in vivo* hanno stabilito il ruolo di NK1 quale agonista del recettore (26-27, 69-70).

Il frammento NK1, prodotto per via ricombinante, e' stato purificato e somministrato alle cellule PNT1A in differenti dosi e per diversi intervalli di tempo ed è stato valutato l'effetto di tale trattamento sulla proliferazione e migrazione cellulare. Successivamente, allo scopo di contribuire al chiarimento dei meccanismi molecolari con cui l'interazione NK1/c-MET regola i processi di proliferazione e migrazione delle cellule epiteliali di prostata, sono stati studiati i profili di fosforilazione di proteine intracellulari di segnale (ERK1/2, STAT3, SMAD2/3, Akt, c-Src, FAK) ed i livelli di espressione delle E-caderine, fibronectina, vimentina,  $\alpha$ -actinina e “ $\alpha$ -smooth muscle actin” nelle cellule PNT1A sia trattate con NK1 sia non trattate.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che le cellule PNT1A esprimono il recettore c-MET e che NK1 è in grado di attivare il recettore fosforilando residui di tirosina critici per la sua funzione (39). L'attivazione di c-MET da parte di NK1 risulta in un incremento della proliferazione e della motilità delle cellule epiteliali di prostata PNT1A. La caratterizzazione del meccanismo molecolare con cui il complesso NK1/c-MET promuove le trasformazioni fenotipiche delle cellule PNT1A possono non solo contribuire ad una migliore comprensione del ruolo fisiopatologico di HGF nella prostata umana, ma anche fornire le basi per lo sviluppo di terapie innovative per la cura del tumore alla prostata nell'uomo.

### 3. PROCEDURE SPERIMENTALI

#### 3.1 Materiali

##### 3.1.1 Anticorpi e prodotti chimici

*Anticorpi primari:* l'anticorpo monoclonale di topo anti-ERK1/2 difosforilato (M8159), l'anticorpo monoclonale di topo anti- $\gamma$ -tubulina (T6557), l'anticorpo monoclonale di topo anti- $\alpha$ -actinina (A7811), l'anticorpo monoclonale di topo anti-vinculina (V9131), l'anticorpo monoclonale di topo anti- $\alpha$ -SMA (A5228), l'anticorpo monoclonale di topo anti-p125FAK (F2918), l'anticorpo monoclonale di topo anti-fibronectina (F7387) sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); l'anticorpo monoclonale di topo anti-fosfotirosina (sc-508), l'anticorpo policlonale di coniglio anti-c-MET (sc-10), l'anticorpo policlonale di coniglio anti-fosfo-c-MET (Y1313) (sc-34085), l'anticorpo policlonale di coniglio anti-fosfo-c-MET (Y1349) (sc-34086), l'anticorpo policlonale di coniglio anti-fosfo-SMAD2/3 (sc-11769-R) sono stati acquistati dalla Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA); l'anticorpo policlonale di coniglio anti-fosfo-Akt (#9271), l'anticorpo policlonale di coniglio anti-fosfo-c-Src (#2101), l'anticorpo policlonale di coniglio anti-fosfo-STAT3 (Y705) (#9131), l'anticorpo policlonale di coniglio anti-fosfo-STAT3 (S727) (#9134) sono stati acquistati dalla Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA); l'anticorpo policlonale di coniglio anti-fosfo-c-MET (Y1356) (PAB9992) dalla Abnova (Walnut, CA, USA); l'anticorpo monoclonale di topo anti-E-caderina (ab1416), e l'anticorpo policlonale di coniglio anti-vimentina (ab15248) dalla AbCam (Cambridge, UK).

*Anticorpi secondari:* l'anticorpo policlonale di capra anti-coniglio IgG-FITC (F0382) è stato acquistato dalla Sigma Aldrich Chemical Co., l'anticorpo policlonale di

capra anti-topo IgG coniugato alla perossidasi di rafano (HRP) (sc-2031) e l'anticorpo policlonale di capra anti-coniglio IgG-HRP (sc-3837) dalla Santa Cruz Biotechnology Inc.

*Prodotti chimici:* 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) è stato acquistato dalla Santa Cruz Biotechnology Inc.; i reagenti SDS-PAGE dalla Bio-Rad (Richmond, CA, USA); La proteina-A sefarosio (CL-4B) dalla Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK); l'inibitore di c-MET SU11274, la fibronectina da plasma umano (F2006), bicina e polietilen glicole dalla Sigma Aldrich Chemical Co; l'inibitore di MEK PD098059, l'inibitore di PI3K wortmannina dalla Calbiochem (La Jolla, CA, USA); l'inibitore di PI3K LY294002 dalla Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA).

### **3.1.2 *Microrganismi e mezzi di coltura***

*Escherichia coli* (*E. coli*) ceppo JM109: il ceppo batterico è stato acquistato dalla Boehringer Ingelheim Italia (Milano) ed utilizzato per le manipolazioni genetiche. Il mezzo di coltura dei batteri è LB (Luria-Bertani), liquido e solido (Agar), preparato come descritto da Sambrook in Molecular Cloning: A Laboratory Manual.

*Pichia pastoris* (*P. pastoris*) ceppo GS115: il ceppo è stato gentilmente fornito dal Prof. E. Gherardi (Laboratorio di Biologia Molecolare, MRC, Cambridge, U.K.) ed utilizzato come sistema di espressione della proteina ricombinante.

I mezzi di coltura per lieviti utilizzati sono BMGY e BMMY: BMGY ("Buffered Minimal Glycerol") costituito da potassio fosfato 100 mM, pH 6,0, 1,34% "yeast nitrogen base" (YNB), 0,002% biotina, 1% glicerolo; BMMY ("Buffered Minimal Methanol"), mezzo di coltura per l'induzione dell'espressione della proteina eterologa

in lieviti, costituito da potassio fosfato 100 mM, pH 6,0, 1,34% YNB, 0,002% biotina, 0,5% metanolo.

L'ampicillina (Amp) (Sigma Aldrich Chemical Co.) è stata usata alla concentrazione di 1 µg/ml sia per le colture batteriche, sia per le colture di lievito.

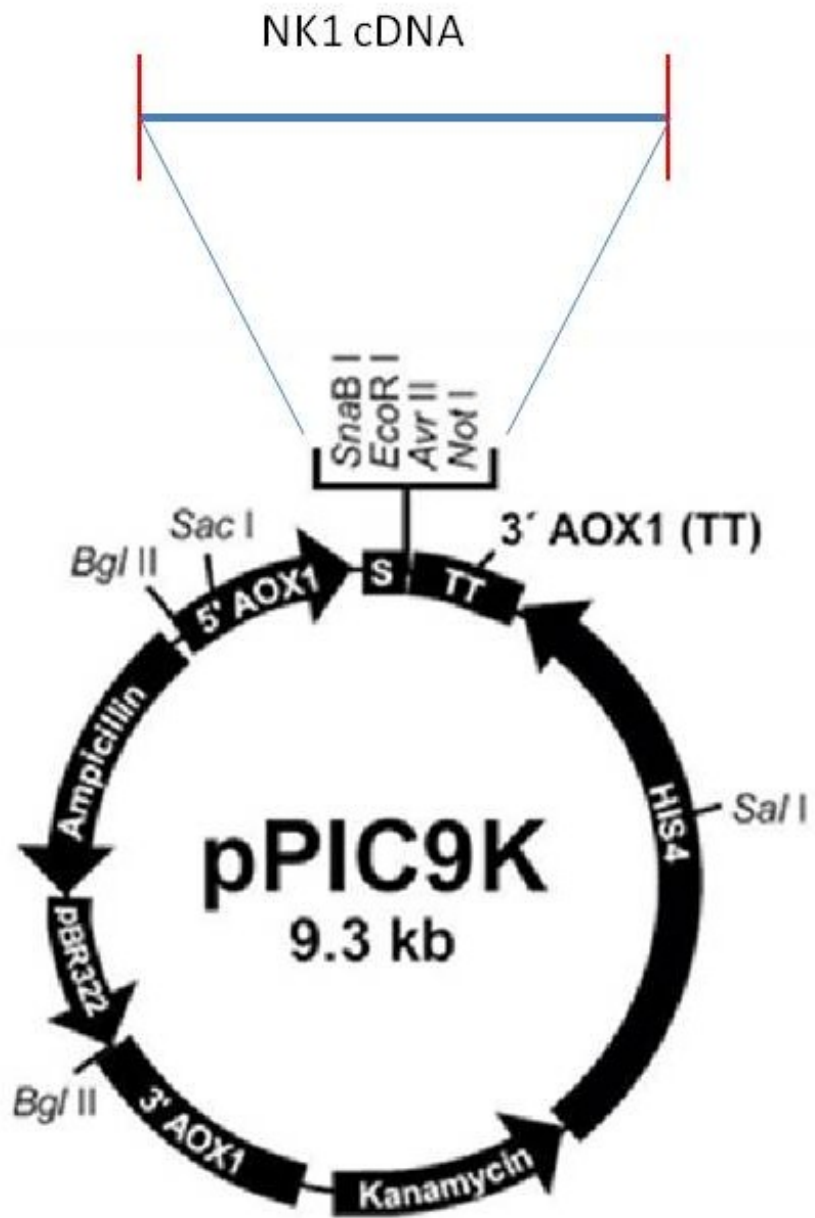
### **3.1.3 Vettore di espressione**

Vettore di espressione: pPIC9K/NK1 prodotto nel laboratorio del Prof. E. Gherardi attraverso l'inserzione del cDNA codificante per NK1 nel vettore pPIC9K. Il vettore così ottenuto è stato utilizzato come vettore di espressione della proteina in *P. pastoris*. La mappa del vettore è rappresentata in Figura 7.

## **3.2 Metodologie**

### **3.2.1 Trasformazione di cellule competenti di *P. pastoris***

Cellule competenti di *P. pastoris* sono state ottenute attraverso un inoculo in 10 ml di YPD ("Yeast Peptone Dextrose Medium", Invitrogen) e cresciute per tutta la notte a 30°C in agitazione. Il giorno successivo, parte dell'inoculo è stato diluito in 100 ml di YPD fino ad una concentrazione cellulare di partenza di 0,1 OD<sub>600nm</sub>. 100 ml di coltura sono stati cresciuti a 30°C fino ad una concentrazione di 0,7 OD<sub>600nm</sub>. La coltura cellulare è stata raccolta mediante centrifugazione a 4.500 rpm per 20 minuti e lavata in 50 ml di soluzione A [1 M sorbitolo, 10 mM di bicina, pH 8,35, 3% (v:v) glicole etilenico]. Le cellule sono state risospese in 4 ml di soluzione A e suddivise in aliquote da 0,2 ml. In ciascuna aliquota sono stati aggiunti 11 µl di dimetilsolfossido (DMSO). Le cellule rese competenti sono state congelate a -80°C.



**Figura 7:** Struttura del vettore di espressione in lievito pPIC9K/NK1.

La trasformazione delle cellule competenti di *P. pastoris* è stata eseguita secondo la procedura di seguito descritta. Sono stati utilizzati 50 µg di vettore pPIC9K/NK1, linearizzato con SAL1, in un volume finale di 20 µl. Il DNA è stato aggiunto alle cellule competenti ancora congelate insieme ad un DNA “carrier”, “salmon sperm”. I campioni sono stati incubati a 37°C per 5 minuti in agitazione. Ad essi sono stati aggiunti 1,5 ml di soluzione B [40% (w:v) di polietilen glicole 1000, bicina 0,2 M, pH 8,35]. I campioni sono stati lasciati per un ora nel bagnetto a 30°C e successivamente centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti. Il precipitato cellulare è stato risospeso in 1,5 ml di soluzione C (NaCl 0.15 M, bicina 10 mM, pH 8,35). E' stata eseguita un'ultima centrifugata ed il precipitato cellulare è stato risospeso in 0,2 ml di soluzione C. Le cellule sono state piastrate su piastre di agarosio contenente mezzo di coltura selettivo His<sup>-</sup> (Invitrogen) e cresciute per 2 giorni a 30°C.

### **3.2.2. Espressione di NK1**

Espressione analitica: in primo luogo è stata effettuata una espressione analitica per l'individuazione del clone che meglio esprimesse NK1. Le colonie trasformate di *P. pastoris* sono state prelevate dalla piastra di trasformazione ed inoculate in 10 ml di BMMY. La coltura è stata incubata a 30°C in forte agitazione per 72 ore. Successivamente le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 3500 rpm per 15 minuti a 4°C ed allontanate. Il supernatante di ciascun clone è stato analizzato mediante elettroforesi SDS-PAGE. Il clone che presentava la maggiore espressione di NK1 è stato cresciuto e conservato in 20% glicerolo a -80°C.

Espressione preparativa: in seguito all'individuazione del clone positivo per l'espressione di NK1, è stata effettuata una espressione preparativa della proteina in 2 litri di mezzo di coltura con induzione con metanolo secondo la procedura di seguito



descritta. 100  $\mu$ l di cellule di *P. pastoris*, ceppo GS115, trasformato con pPIC9K/NK1, sono stati inoculate in 12 ml di BMGY e cresciute per una notte a 30°C in agitazione. Il giorno successivo sono stati utilizzati 3 ml di questa coltura per inoculare 500 ml di BMGY che sono stati cresciuti per una notte fino ad una concentrazione cellulare di 5 OD<sub>600nm</sub>. A questo punto le cellule sono state raccolte tramite centrifugazione, risospese in 2 litri di BMMY e cresciute per 72 ore in agitazione a 30°C. Dopo 24 ore, ogni giorno è stato aggiunto metanolo (0,5% finale). Dopo 72 ore le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 8000 rpm per 40 minuti. Il supernatante contenente NK1 è stato filtrato in filtri da 0,22  $\mu$ m e conservato a 4°C.

### **3.2.3. Elettroforesi**

La quantità di proteine totali in ciascun campione è stata determinata mediante il saggio Bio-Rad “DC protein”. I campioni, contenenti uguali quantità di proteine totali, sono stati bolliti per cinque minuti in un tampone (“sample buffer”) contenente 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% sodio dodecil solfato (SDS), 10% glicerolo, 0,1% blu di bromofenolo e 5%  $\beta$ -mercaptoetanololo. Sono stati, quindi, caricati sul gel di poliacrilammide al 15% ed immersi nel tampone di corsa costituito da 25 mM Tris, 250 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8.3. La visualizzazione di NK1 è stata effettuata mediante colorazione del gel con brilliant blue di comassie preparato sciogliendo 0,25 g di Coomassie Blue R-250 in una soluzione costituita da 50% metanolo e 10% acido acetico. Il gel è stato immerso nel colorante in blanda agitazione per almeno un’ora e poi decolorato con una soluzione al 10% etanolo e 10% acido acetico in leggera agitazione con cambi della soluzione decolorante fino alla scomparsa del colore di fondo.

### **3.2.4. Cromatografia**

La proteina NK1 ricombinante prodotta è stata purificata mediante cromatografia di affinità con eparina secondo la procedura descritta da Chirgadze et al. (69). Per purificare la proteina di interesse da contaminanti proteici è stata utilizzata una resina ad affinità con eparina (Amersham Pharmacia Biotech) in colonne di dimensioni di 1 cm di diametro per 5 cm di altezza con un volume totale di resina di 5 ml. La colonna è stata equilibrata in tampone A (sodio fosfato 50 mM, pH 7,3). L'eluizione è stata eseguita a 4°C nello stesso tampone A con un gradiente salino lineare da 150 mM a 2 M NaCl ad un flusso di 2 ml al minuto per un volume totale 10 volte maggiore del volume della colonna. Il volume delle frazioni raccolte è stato di circa 1,5 ml ed il cromatogramma è stato disegnato misurando l'assorbanza dell'eluato a 280 nm. Le frazioni di interesse sono state riunite e conservate a -20°C.

Successivamente la proteina è stata purificata mediante cromatografia ad esclusione molecolare G200. Il volume di campione iniettato è stato di 500 µl. E' stato utilizzato un flusso di 0,5 ml/min e le frazioni sono state raccolte riunite, concentrate e conservate a -80°C.

La concentrazione della proteina è stata determinata misurando l'assorbimento a 280 nm, adoperando il coefficiente di assorbimento molare a 280 nm calcolato per la NK1 in  $26030 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . E' stato utilizzato uno strumento CARY Lambda-Max Varian adoperando celle di quarzo (Hellman) con cammino ottico di 1 cm a temperatura ambiente. NK1 ricombinante purificato è stato diluito in acqua sterile ad una concentrazione di 1 mM (soluzione stock).

### ***3.2.5 Colture cellulari***

Le cellule epiteliali di prostata umana PNT1A sono state acquistate all'ATCC (Rockville, MD, USA). Esse sono state coltivate in mezzo RPMI in presenza di 10% siero fetale bovino (FBS) inattivato al calore, 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomina e 1% L-glutamina. Le cellule sono state tripsinizzate, lavate in RPMI contenente 10% FBS e risospese in RPMI con la quantità indicata di FBS. Sono state piastrate in piastre di Petri o vetrini che in alcuni casi sono stati previamente rivestiti con fibronectina. Per gli esperimenti di stimolazione, NK1 ricombinante è stato diluito nel mezzo di coltura a diverse concentrazioni finali. In alcuni esperimenti, le cellule PNT1A, prima della stimolazione con NK1, sono state pre-incubate con 50 µM PD098059 per 90 minuti, oppure 50 µM LY294002 per 1 ora, oppure 0.5 µM wortmannina per 1 ora, oppure 2 µM SU11274 per 16 ore.

### ***3.2.6 Immunofluorescenza***

Le cellule PNT1A sono state piastrate su vetrini e coltivate fino al 60% di confluenza. Le cellule sono state lavate due volte in tampone fosfato (PBS), fissate per 30 minuti in paraformaldeide (4%) in PBS a 4°C e lavate tre volte per 5 minuti in agitazione a temperatura ambiente. Le cellule fissate sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente in agitazione in una soluzione di albumina sierica bovina (BSA) (5%) in PBS. Dopo due lavaggi in PBS per 5 minuti, le cellule sono state incubate per una notte a 4°C con l'anticorpo primario anti-c-MET diluito 1:100 in PBS. Il giorno successivo, le cellule sono state lavate due volte in PBS per 5 minuti a temperatura ambiente e incubate con l'anticorpo secondario coniugato con fluoresceina-isotiocianato (FITC) per 2 ore a 4°C. Dopo il lavaggio in PBS, i vetrini sono stati incubati per 7 minuti a 4°C con DAPI diluito 1:500 in PBS e lavati due volte. I coprivetrini sono stati

montati sui vetrini usando il mezzo di montaggio Moviol. I vetrini sono stati osservati al microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse TE300 e fotografati.

### ***3.2.7 Saggio di proliferazione***

Le cellule PNT1A sono state piastrate su piastre a 24 pozzetti alla concentrazione di 100.000 cellule per pozzetto e lasciate crescere per una notte in mezzo completo RPMI. Successivamente, le cellule sono state lavate e lasciate crescere per 24 ore in mezzo privo di siero (RPMI contenente 1% FBS). Le cellule, poi, sono state trattate con RPMI-1% FBS contenente NK1 a diverse concentrazioni nell'intervallo compreso tra  $10^{-11}$  e  $10^{-6}$  M. Le cellule di controllo (CTR) sono state trattate con il mezzo senza l'aggiunta di NK1. Dopo 24, 36 e 48 ore di incubazione a 37°C, le cellule sono state tripsinizzate e il numero di cellule vive, risospese in una soluzione di trypan blue, è stato determinato mediante conta diretta usando un emocitometro. Per l'analisi statistica dei risultati è stato usato il t-student test e le differenze sono state considerate significative a  $P < 0,05$ .

### ***3.2.8 Saggi di “scattering” e EMT***

Le cellule PNT1A sono state piastrate in piastre a 96 pozzetti alla concentrazione di 35.000 cellule per pozzetto in RPMI-1% FBS in presenza di NK1  $10^{-6}$  M. Le piastre sono state incubate per una notte a 37°C. Il giorno successivo, le cellule sono state lavate in PBS e fissate in paraformaldeide al 4% in PBS per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo un ulteriore lavaggio in PBS, le cellule fissate sono state colorate con una soluzione di brilliant blue di comassie (0,5% Coomassie, 40% metanolo, 10% acido acetico, 50% acqua distillata) per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente, le cellule sono state lavate in acqua distillata e lasciate asciugare

completamente per 24 ore. Le cellule sono state osservate al microscopio ottico e fotografate.

### ***3.2.9 Saggi di “wound healing”***

Le cellule sono state piastrate alla concentrazione di 100.000 cellule per pozzetto in piastre a 24 pozzetti non rivestite o preventivamente rivestite con 10 µg/ml fibronectina e lasciate aderire per 24 ore a 37°C in mezzo RPMI contenente 10% FBS. Le cellule sono state poi lavate in PBS e incubate per una notte in RPMI contenente 1% FBS. Il giorno successivo è stata provocata una ferita al centro della piastra graffiando il monostrato cellulare con un ago da siringa per insulina. Le cellule sono state lavate in PBS e trattate con RPMI-1% FBS contenente NK1  $10^{-7}$  M. Dopo 48 ore le cellule sono state lavate in PBS, fissate in paraformaldeide al 4% in PBS per 1 ora temperatura ambiente, lavate in PBS e colorate con la soluzione di brilliant blue di comassie per 1 ora a temperatura ambiente. Infine, le cellule sono state lavate in acqua distillata e fatte asciugare completamente per 24 ore. Le cellule sono state osservate al microscopio ottico e fotografate.

### ***3.2.10 Immunoprecipitazione di proteine e Western blotting***

Le cellule PNT1A, sia non trattate o pre-incubate con una quantità appropriata di inibitore e successivamente stimulate con NK1 ( $10^{-6}$  M) per differenti intervalli di tempo, sono state lavate in PBS e sottoposte a lisi con 0,5 ml di tampone RIPA contenente 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 1 mM EDTA, 0,25% sodio deossicolato, 10 mM NaF, 10 µM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM fenilmetilsulfonilfluoride ed un cocktail di inibitori delle proteasi (10 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml pepstatina, 10 µg/ml leupeptina). I lisati cellulari sono stati incubati a 4°C per

45 minuti e centrifugati a 14.000 rpm per 15 minuti a 4°C. Il soprannatante è stato suddiviso in piccole aliquote che sono state conservate a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

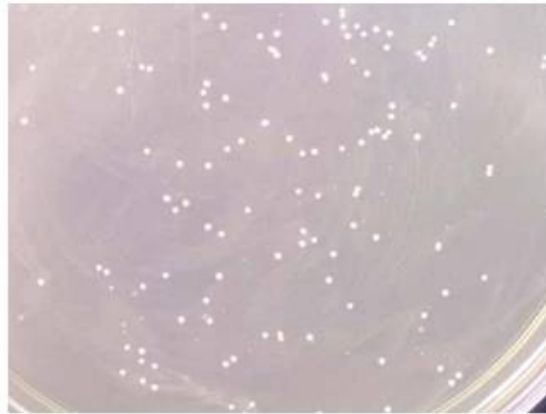
La quantità di proteine totali in ciascun campione è stata determinata mediante il saggio Bio-Rad "DC protein". I campioni contenenti la stessa quantità di proteine (50 µg) sono stati bolliti per 5 minuti in tampone SDS (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerolo, 0,1% blu di bromofenolo e 5% β-mercaptoetanololo), separati mediante SDS-PAGE, trasferiti su membrana Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, USA) e incubati per una notte a 4°C. Legami aspecifici sono stati bloccati mediante incubazione per 1 ora a temperatura ambiente con latte in polvere al 5% in TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 137 mM NaCl, 0,01% Tween-20). Le membrane sono state incubate per una notte a 4°C con l'anticorpo primario alla diluizione appropriata. Dopo il lavaggio in TBST per tre volte per 5 minuti, le membrane sono state incubate con l'anticorpo secondario appropriato a temperatura ambiente per 45 minuti in agitazione costante. L'espressione delle proteine oggetto di studio è stata rivelata mediante il kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech) e visualizzata mediante autoradiografia. Il filtro è stato, successivamente, sottoposto alla procedura di "stripping" mediante incubazione per 30 minuti a 70°C con una soluzione contenente 2% SDS, 100 µM mercaptoetanololo in 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, e trattamento con l'anticorpo monoclonale anti-tubulina.

## 4. RISULTATI

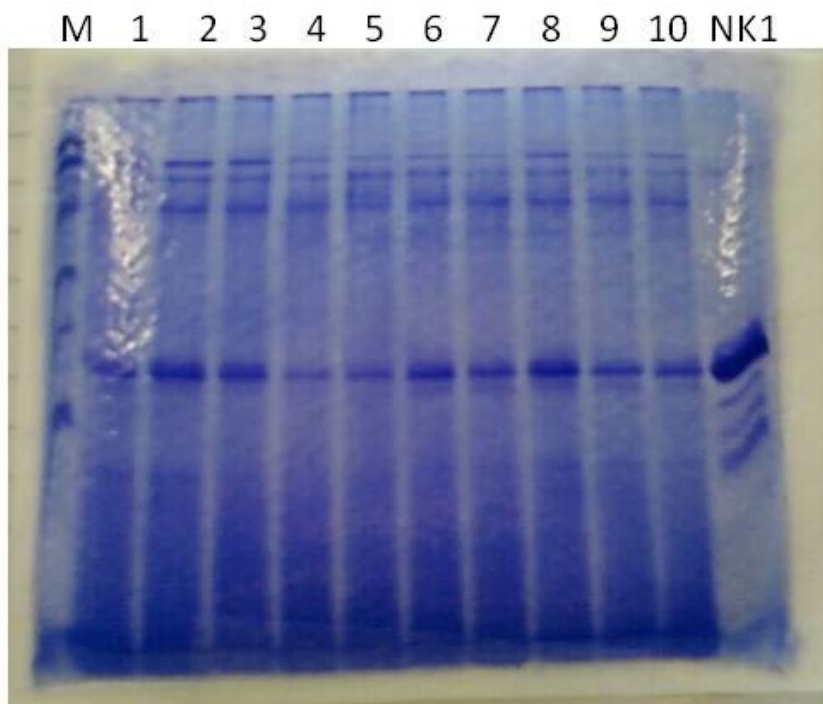
### 4.1 Sintesi ricombinante di NK1

#### 4.1.1. Produzione di NK1

La prima fase del progetto di tesi ha riguardato la sintesi ricombinante di NK1 mediante un sistema di espressione eucariotico di lievito *P. pastoris*. A tale scopo è stato necessario trasformare le cellule di lievito con il vettore di espressione per lieviti inducibile da metanolo codificante per il frammento NK1 di HGF. Il vettore pPIC9K/NK1 è stato digerito con l'enzima di restrizione SAL1 con la finalità di ottenere un vettore di espressione linearizzato, in quanto la probabilità di integrazione del vettore nel genoma di lievito aumenta in seguito a trasformazione con un vettore linearizzato. È stata, quindi, effettuata la trasformazione del ceppo GS115 di lievito *P. pastoris* reso preventivamente competente e le colonie risultanti su piastra di sorbitolo/agar sono state raccolte, inoculate nel mezzo di coltura per lieviti e conservate a -80°C. È stato verificato per via analitica, con colorazione al comassie di un gel denaturante di proteine, quale dei cloni di *P. pastoris* esprimesse in maggiori quantità la proteina di interesse (NK1). Il risultato di tale analisi è descritto in Figura 8, da cui si evince che NK1 risulta espresso in tutti i cloni esaminati, ma in maggiore quantità nel clone 8. È stato scelto il clone 8 per proseguire nella preparazione della proteina ricombinante. Il clone 8 è stato cresciuto in 2 litri dell'opportuno mezzo di coltura e l'espressione della NK1 è stata indotta dall'aggiunta di metanolo. La proteina rilasciata nel mezzo di coltura è stata separata dalle cellule di lievito mediante centrifugazione a 8000 rpm per 40 minuti.



Colonie trasformate di *P. pastoris*



**Figura 8:** Espressione analitica di NK1 in seguito a trasformazione di cellule competenti di *P. pastoris* con pPIC9K/NK1.



#### **4.1.2. Purificazione**

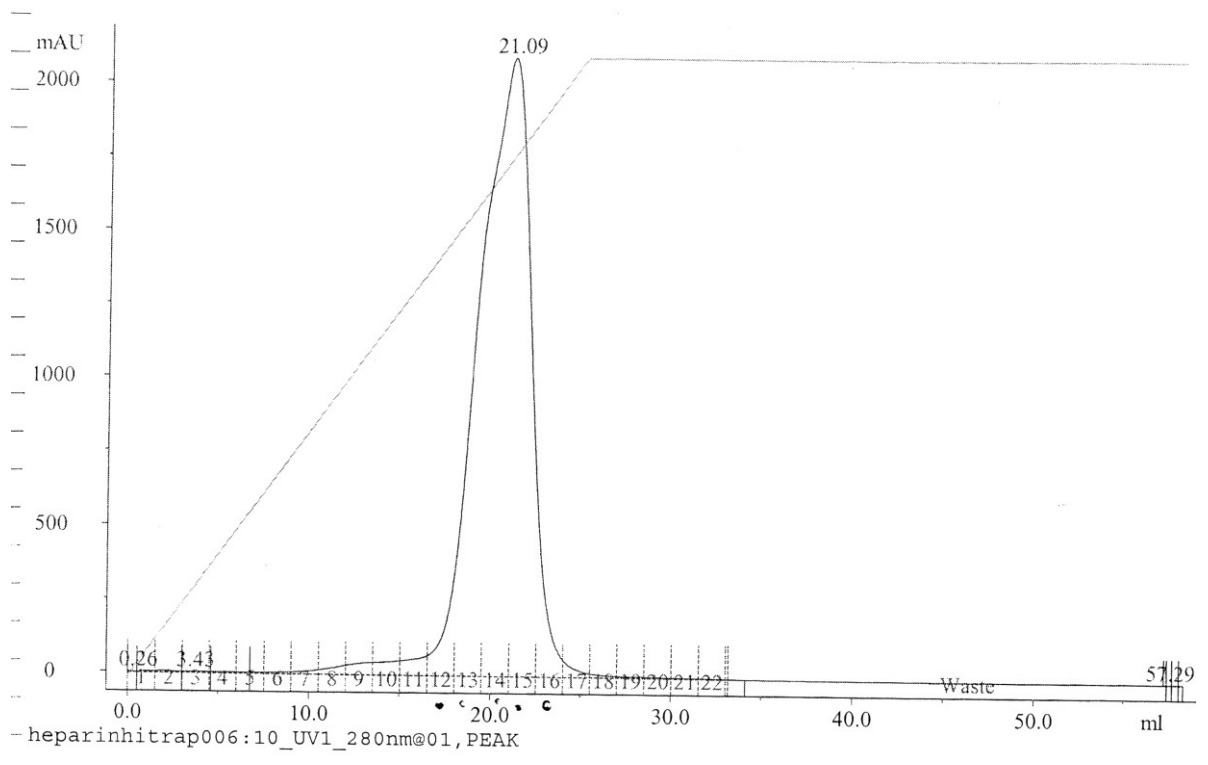
Il supernatante contenente NK1 è stato caricato sulla colonna cromatografica ad affinità con eparina. La proteina è stata purificata con gradiente lineare salino da una concentrazione iniziale di 150 mM ad una concentrazione finale 2 M (Figura 9). Le frazioni raccolte sono state riunite, concentrate e purificate mediante cromatografia ad esclusione molecolare G200. Il cromatogramma è riportato in Figura 10. Le frazioni della proteina purificata sono state raccolte e concentrate. È stata determinata la concentrazione delle proteine totali del campione dializzato ed è risultata una concentrazione di 2 mg/ml in un volume finale di 50 ml. Dalla Figura 11 si può evidenziare la qualità della proteina purificata.

### **4.2 Attivita' biologica di NK1 nelle cellule epiteliali di prostata PNT1A**

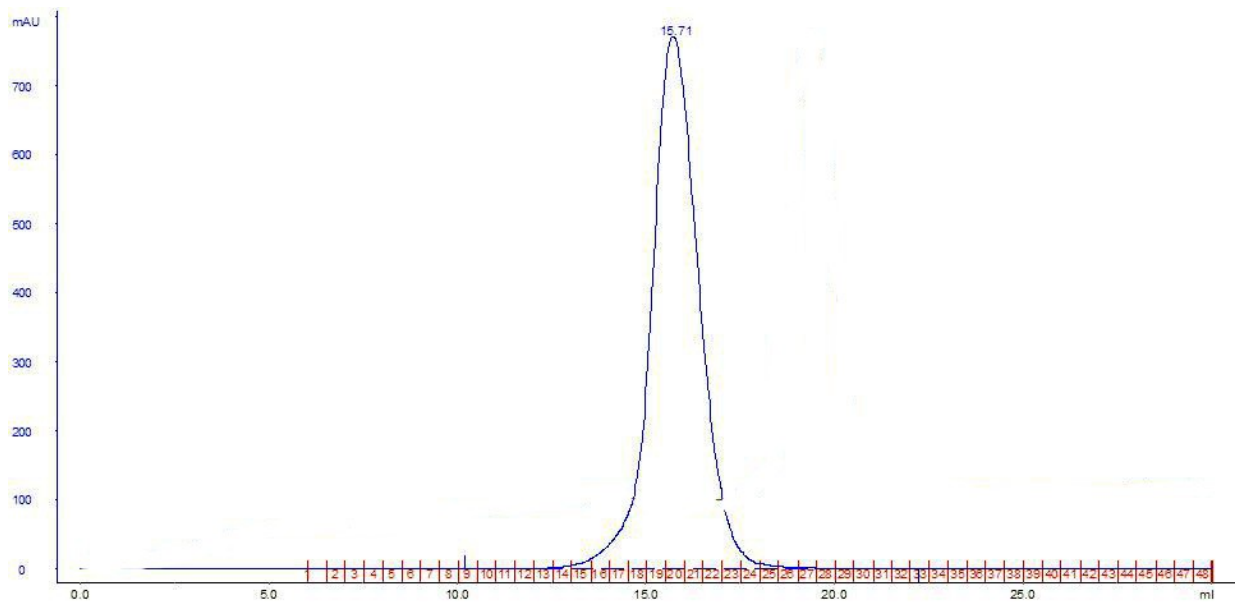
#### **4.2.1 Le cellule PNT1A esprimono c-MET.**

Studi precedenti di analisi immunohistochemica dell'espressione di c-MET in tessuti benigni di prostata hanno dimostrato la localizzazione del recettore di HGF nello strato basale epiteliale della ghiandola di prostata normale (71). Alterazioni dell'espressione di c-MET sono state riscontrate in linee cellulari di carcinoma di prostata, in tessuti affetti da neoplasia intraepiteliale prostatica di elevato grado e in tumori della prostata più avanzati (72-74).

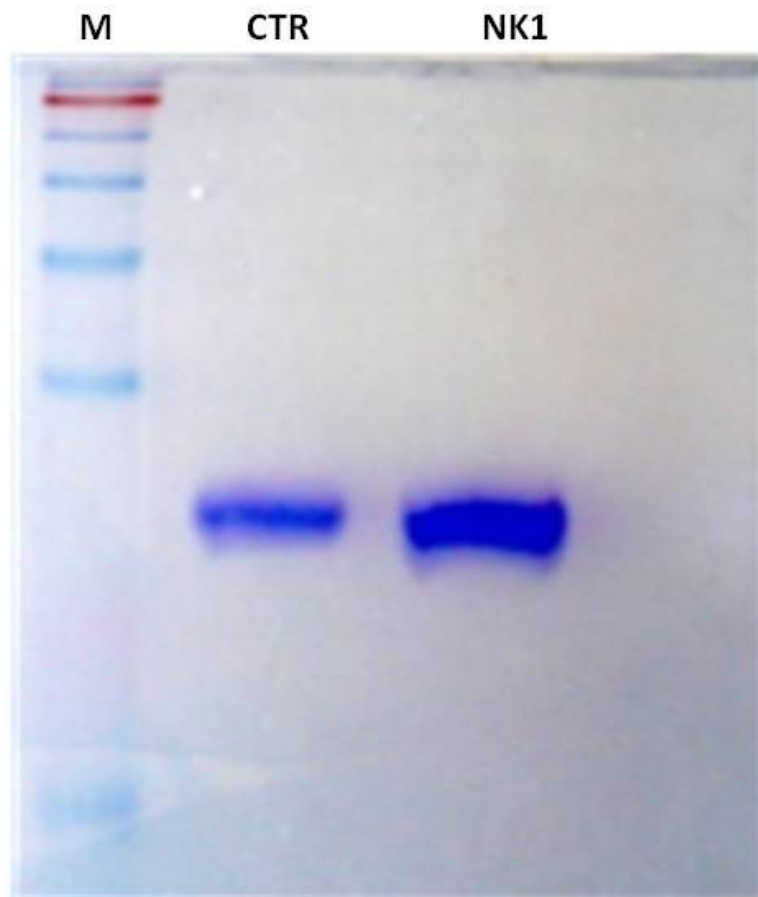
Nel nostro studio, abbiamo inizialmente valutato l'espressione della proteina c-MET nelle cellule epiteliali di prostata PNT1A mediante immunofluorescenza e Western blotting. L'analisi di immunofluorescenza dimostra la localizzazione del recettore c-MET sulla membrana delle cellule PNT1A (Figura 12a). L'analisi mediante Western blotting per l'espressione di c-MET in lisati cellulari di PNT1A mostra la presenza della



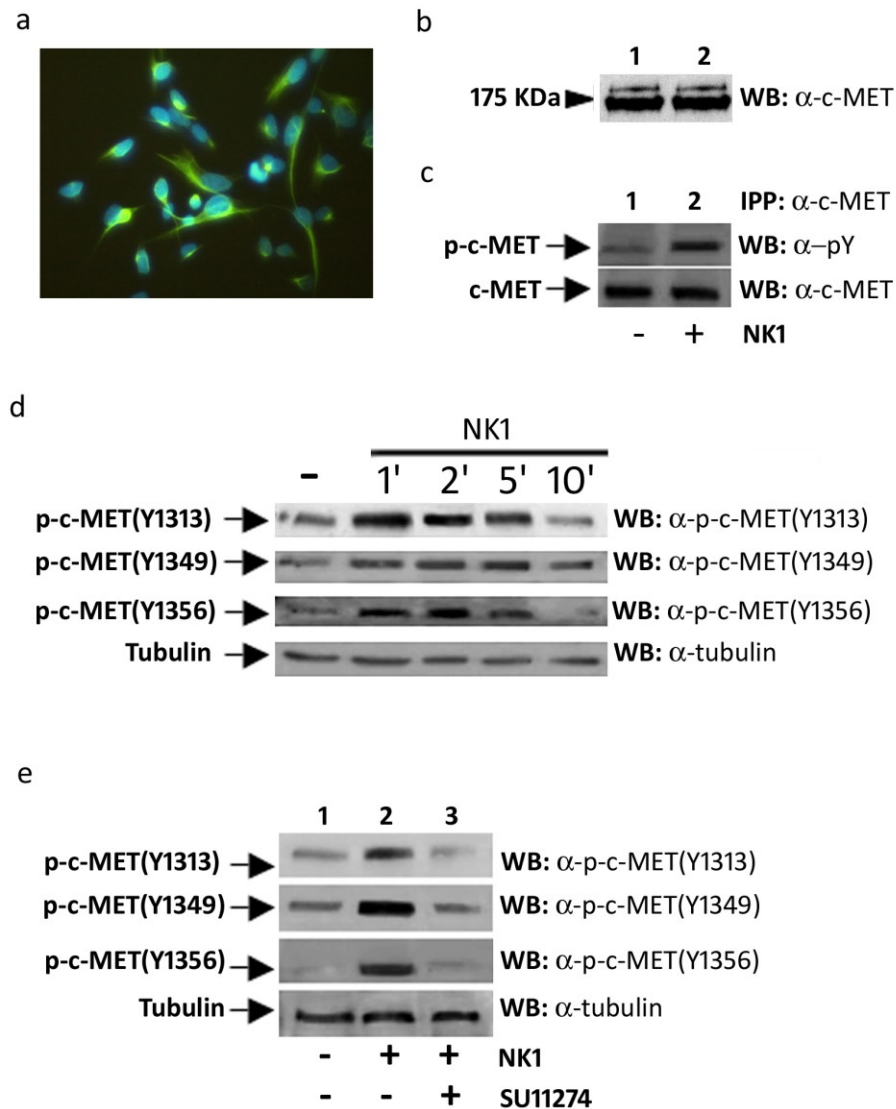
**Figura 9:** Cromatogramma della purificazione di NK1 con cromatografia ad affinità di eparina e gradiente lineare salino.



**Figura 10:** Cromatografia ad esclusione molecolare di NK1 su G200.



**Figura 11:** Gel di poliacrilammide colorato con Comassie della proteina purificata.



**Figura 12: Espressione del recettore c-MET e fosforilazione di c-MET indotta da NK1, in cellule epiteliali di prostata umana.**

(a) Immunofluorescenza per c-MET. (b) Western blotting anti-c-MET (175 kDa) di lisati di HepG2 (controllo positivo) (lane 1) e PNT1A (lane 2). (c) Immunoprecipitazione (IPP) di c-MET da lisati di PNT1A controllo (non trattate) (lane 1) e PNT1A trattate con NK1 ( $10^{-6}$  M) per 5 minuti (lane 2) e Western blotting anti-fosfotirosina ( $\alpha$ -PY). Il blot in alto è stato sottoposto alla procedura di “stripping” con anticorpo anti-c-MET (blot in basso). (d) Fosforilazione dei residui di tirosina 1313, 1349, e 1356 di c-MET indotta da NK1 in cellule PNT1A. Western blotting di lisati di cellule non trattate (controllo) e cellule esposte a NK1 ( $10^{-6}$  M) per 1, 2, 5 e 10 minuti, usando gli anticorpi anti-fosfo-c-MET (Y1313), anti-fosfo-c-MET (Y1349) e anti-fosfo-c-MET (Y1356). Il blot in alto è stato sottoposto alla procedura di “stripping” con l’anticorpo anti- $\gamma$ -tubulina (blot in basso). (e) Western blotting con anticorpi anti-fosfo-c-MET (Y1313), anti-fosfo-c-MET (Y1349), e anti-fosfo-c-MET (Y1356) di lisati di cellule non trattate (controllo) (lane 1), cellule esposte a NK1 (10  $\mu$ M) per 5 minuti sia in assenza (lane 2) che in presenza di 2  $\mu$ M SU11274 (lane 3). Il blot in alto è stato sottoposto alla procedura di “stripping” con l’ anticorpo anti- $\gamma$ -tubulina (blot in basso).

banda con peso molecolare prevista di 175 kDa che corrisponde alla proteina c-MET (Figura 12b). La stessa banda è stata evidenziata in lisati di cellule di carcinoma epatocellulare di fegato umano (HepG2) (controllo positivo) (75). Questi risultati forniscono la prima evidenza dell'espressione di c-MET nella linea cellulare epiteliale di prostata umana normale PNT1A.

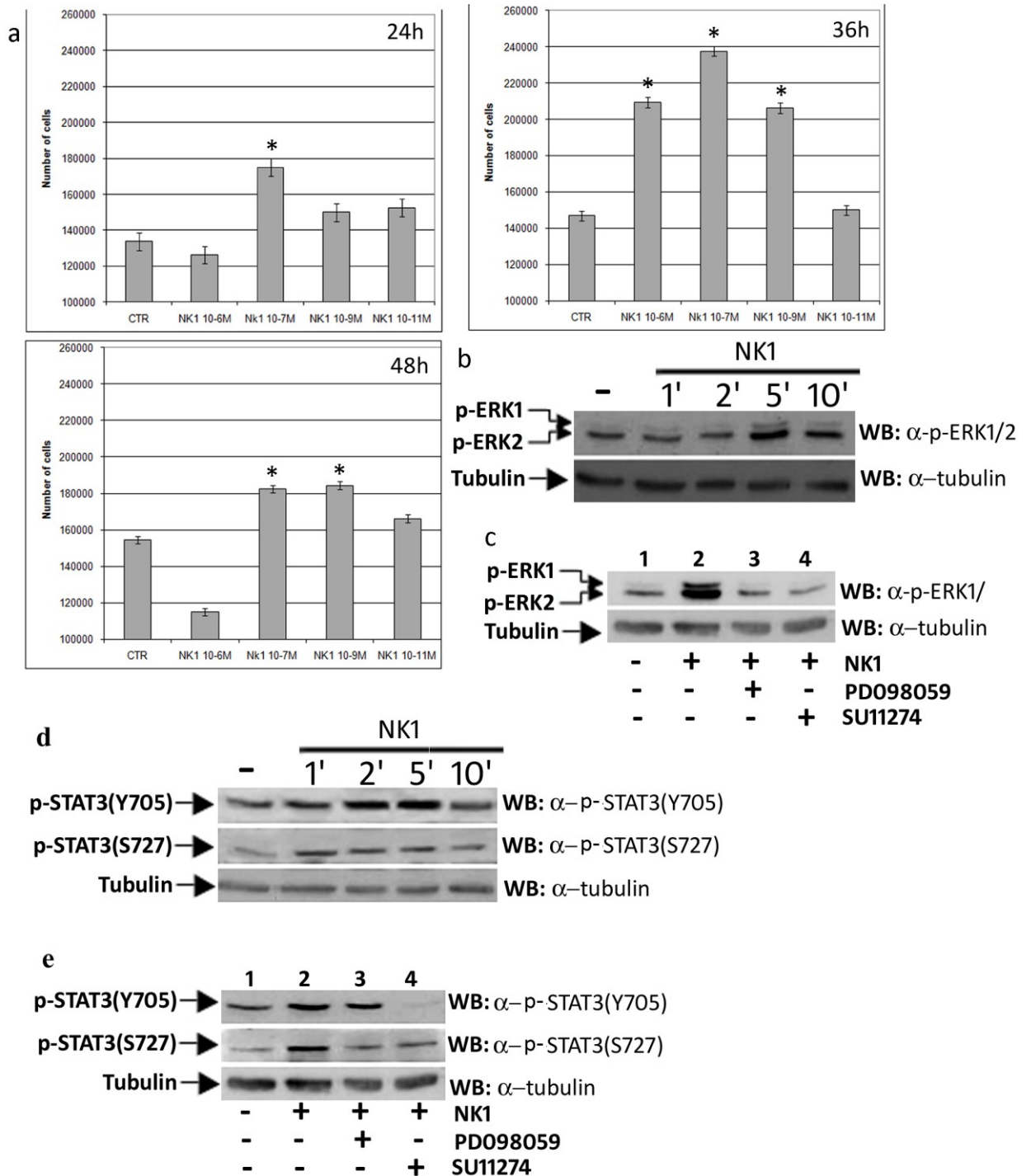
La proteina matura c-MET può esistere come un complesso  $\alpha$ - $\beta$  in cui la subunità  $\beta$  (140 KDa) è collegata attraverso ponti disolfuro alla catena  $\alpha$  più piccola, che è di 35 kDa (76-77). L'attivazione di c-MET implica la fosforilazione di diversi residui di tirosine, tra cui i residui di tirosina nelle posizioni 1313, 1349 e 1356 dell'estremità carbossi-terminale della subunità  $\beta$  del recettore (39, 78). Poiché questi residui hanno un ruolo cruciale nell'attivazione delle vie di trasduzione di segnali coinvolte nell'attività biologica di c-MET in risposta ad HGF, abbiamo valutato la capacità di NK1 di attivare c-MET nelle cellule PNT1A. L'aggiunta di NK1 ( $10^{-6}$  M) alle cellule ha provocato una rapida fosforilazione di c-MET, mentre il recettore appare fosforilato in misura minore nelle cellule di controllo (non trattate) (Figura 12c). In particolare, NK1 promuove la fosforilazione di c-MET a livello dei residui di Tyr 1313/1349/1356 entro i primi 5 minuti dalla stimolazione (Figura 12d). La fosforilazione indotta da NK1 dei residui di tirosina è inibita dall'inibitore specifico di c-MET, SU11274 (79) (Figura 12e).

Questi risultati dimostrano che il frammento NK1 conserva la capacità dell'intero HGF di attivare c-MET attraverso la fosforilazione di residui critici di tirosina del recettore e confermano l'evidenza del legame NK1/c-MET (69).

#### ***4.2.2 NK1 stimola la proliferazione ed attiva ERK1/2 e STAT3***

La proliferazione cellulare incontrollata è uno dei processi tipici della tumorigenesi e delle metastasi. Nel sistema cellulare PNT1A l'aggiunta di NK1 determina un incremento dose- e tempo-dipendente della proliferazione cellulare (Figura 13a). NK1 induce il massimo livello di proliferazione delle PNT1A alla concentrazione di  $10^{-7}$  M dopo 36 ore di esposizione delle cellule. Sebbene le cellule prostatiche normali e tumorali possano differire nella loro risposta all'HGF, questo risultato ben si correla con l'attività proliferativa indotta da HGF in linee cellulari di cancro prostatico (74, 80-81).

In accordo con precedenti evidenze che dimostrano che la proliferazione cellulare in risposta a stimolazione con HGF è mediata dall'attivazione della via di trasduzione del segnale Ras/MAPK (82-83), abbiamo osservato che il trattamento delle cellule PNT1A con NK1 ( $10^{-6}$  M) induce la fosforilazione delle chinasi ERK1/2 (Figura 13b). La pre-incubazione delle cellule sia con l'inibitore di c-MET SU11274 o con PD098059, inibitore selettivo di MEK (84), attivatore diretto a monte delle MAP chinasi ERK1/2, previene la fosforilazione di ERK1/2 indotta dall'esposizione delle cellule ad NK1 (Figura 13c). Ciò indica che l'attivazione di ERK1/2 da parte di NK1 richiede la fosforilazione di c-MET e la successiva attivazione della via di trasduzione del segnale Ras/MAPK.



**Figura 13: NK1 induce proliferazione cellulare e attiva ERK1/2 e STAT3 in PNT1A.**

(a) Curve di crescita cellulare tempo- e dose-dipendenti in risposta al trattamento delle PNT1A con NK1. Il numero di cellule vitali è stato determinato mediante il metodo di esclusione al trypan blue. I dati riportati indicano i valori medi di tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. Le barre verticali indicano S.E. \*  $P < 0.05$ . (b) Time-course della fosforilazione di ERK1/2 in PNT1A indotta da NK1. Western blotting anti-fosfoERK1/2 di lisati di cellule non trattate (controllo) e cellule esposte a NK1 ( $10^{-6}$  M) per 1, 2, 5 e 10 minuti. (c) Western blotting anti-fosfo-ERK1/2 di lisati di cellule non trattate (controllo) (lane 1), cellule esposte a NK1 ( $10^{-6}$  M) per 5 minuti in assenza (lane 2) o in presenza di 50  $\mu$ M PD098059 (lane 3) o 2  $\mu$ M SU11274 (lane 4). (d) Fosforilazione di STAT3 indotta dall'esposizione di PNT1A ad NK1. Western blotting anti-fosfo-STAT3 (Y505) o anti-fosfo-STAT3 (S727) di lisati di cellule di controllo (non trattate) e cellule esposte a NK1 ( $10^{-6}$  M) per 1, 2, 5 e 10 minuti. (e) Western blotting anti-fosfo-STAT3 (Y505) o anti-fosfo-STAT3 (S727) di lisati di cellule controllo (non trattate) (lane 1), cellule esposte a NK1 ( $10^{-6}$  M) per 5 minuti sia in assenza (lane 2) che in presenza di 2  $\mu$ M SU11274 (lane 3) o 50  $\mu$ M PD098059. Tutti i blot in alto sono stati sottoposti alla procedura di "stripping" con l'anticorpo anti- $\gamma$ -tubulina (blot in basso) per la normalizzazione.



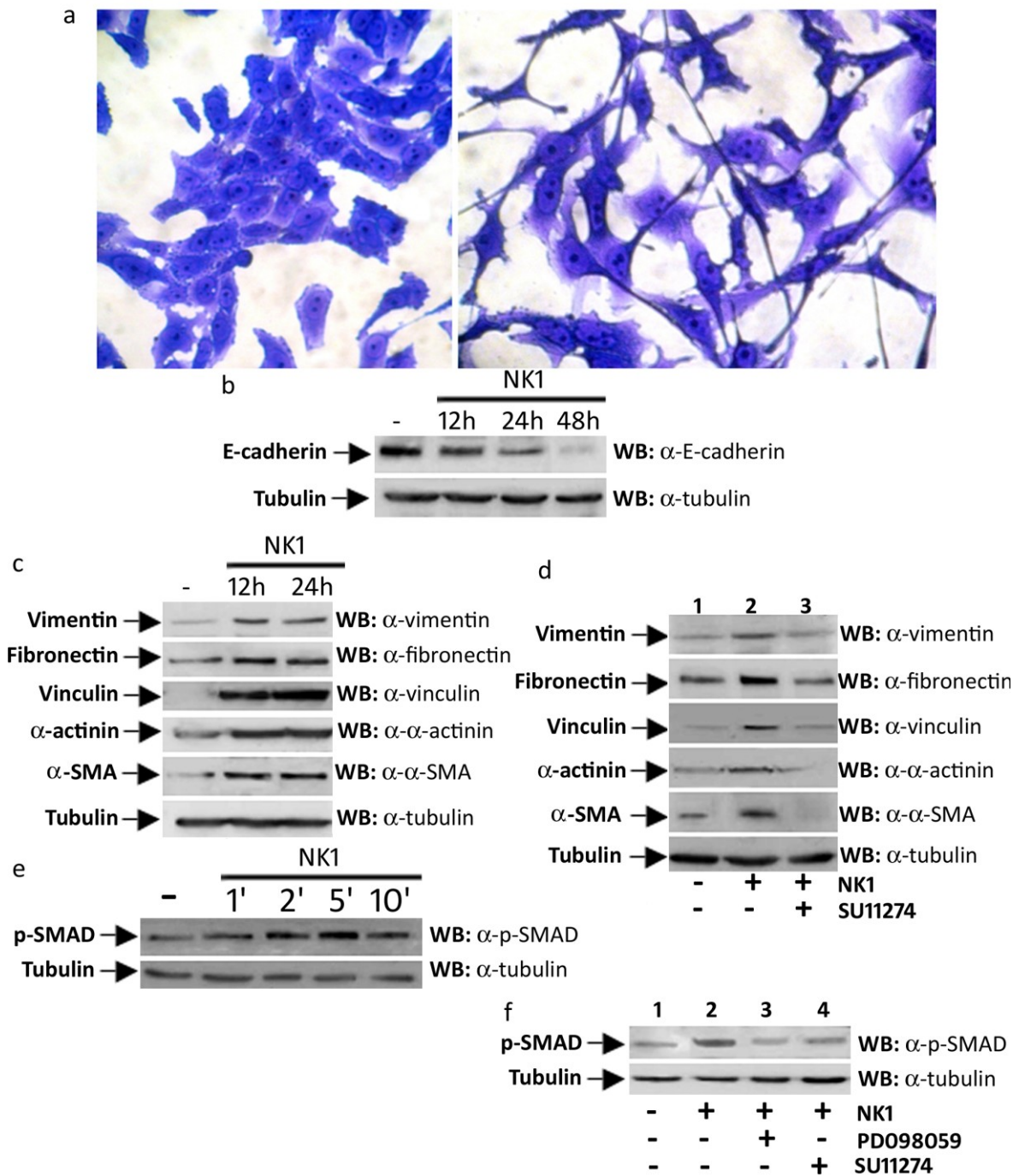
Nella gran parte dei tipi di cancro umano è stata dimostrata l'attivazione costitutiva del trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione 3 (STAT3) che svolge un ruolo importante nella proliferazione e sopravvivenza cellulare (85). In questo studio abbiamo verificato che l'aggiunta di NK1 ( $10^{-6}$  M) alle cellule PNT1A promuove la fosforilazione del residuo di tirosina di STAT3 in posizione 705, necessaria per la sua dimerizzazione e traslocazione nucleare, e del residuo di serina in posizione 727, necessaria per la massima attività trascrizionale di STAT3 (Figura 13d). La fosforilazione del residuo Tyr705 di STAT3 risulta inibita dalla pre-incubazione delle PNT1A con SU11274 prima del trattamento con NK1 (Figura 13e). Tale risultato indica che la fosforilazione del residuo Tyr705 di STAT3 è dipendente dall'attivazione di c-MET. Essa risulta, invece, indipendente da MEK, come si evidenzia dalla mancanza di effetto dell'inibitore di MEK PD098059 sulla fosforilazione del residuo Tyr705 di STAT3 (Figura 13e). Al contrario, la fosforilazione del residuo Ser727 di STAT3 richiede l'attivazione sia di c-MET che di MEK, come dimostra l'effetto inibitorio sia di SU11274 sia di PD098059 sulla fosforilazione di Ser727 di STAT3 indotta da NK1 in cellule PNT1A (Figura 13e).

#### ***4.2.3 NK1 induce EMT ed attiva SMAD2/3***

La transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) è un processo biologico che consente ad una cellula epiteliale polarizzata, che normalmente interagisce con la membrana basale attraverso la sua superficie basale, di andare incontro a molteplici cambiamenti biochimici che la rendono capace di assumere un fenotipo mesenchimale. Quest'ultimo presenta un'aumentata capacità di migrazione e invasione, elevata resistenza all'apoptosi ed un notevole aumento della produzione delle componenti della matrice extracellulare (86). Precedenti evidenze suggeriscono che c-MET è in grado di

promuovere il processo di EMT (52-53). Abbiamo, quindi, valutato la capacità di NK1 di promuovere EMT nelle cellule PNT1A. Prima del trattamento con NK1, le cellule PNT1A mostrano una normale forma epiteliale presentandosi strettamente impaccate in coltura, mentre in seguito all'esposizione ad NK1 ( $10^{-6}$  M) le cellule formano strutture di forma irregolare e non uniformi in densità (Figura 14a). In seguito a trattamento con NK1 le cellule mostrano un fenotipo mesenchimale con una forma più allungata rispetto alle cellule epiteliali e risultano debolmente associate mostrando alcune caratteristiche delle cellule staminali adulte (49, 87).

Nel processo dell'EMT avviene la rottura delle giunzioni di aderenza cellula-cellula che sono mediate dalle interazioni omotipiche dei domini extracellulari dell'E-caderina (51, 57). In questo studio, abbiamo osservato una riduzione dell'espressione dell'E-caderina nelle cellule sottoposte a trattamento con NK1 ( $10^{-6}$  M) rispetto ai livelli di espressione nelle cellule non trattate (Figura 14b). In concomitanza alla ridotta espressione dell'E-caderina, il trattamento delle cellule PNT1A con NK1 per 12 ore promuove un aumento dei livelli di espressione dei marcatori mesenchimali vimentina, fibronectina, vinculina,  $\alpha$ -actinina e  $\alpha$ -actina del muscolo liscio ( $\alpha$ -SMA) come dimostrato dagli esperimenti di Western blotting riportati in Figura 14c. Livelli superiori di espressione di queste proteine nelle cellule trattate con NK1 rispetto a quelli delle cellule di controllo (non trattate) persistono fino a 24 ore successive al trattamento. Inoltre, la pre-incubazione di cellule PNT1A con SU11274, prima della stimolazione con NK1, previene l'aumento dei livelli di espressione di questi marcatori (Figura 14d) dimostrando che tale incremento richiede l'attivazione di c-MET da parte di NK1.



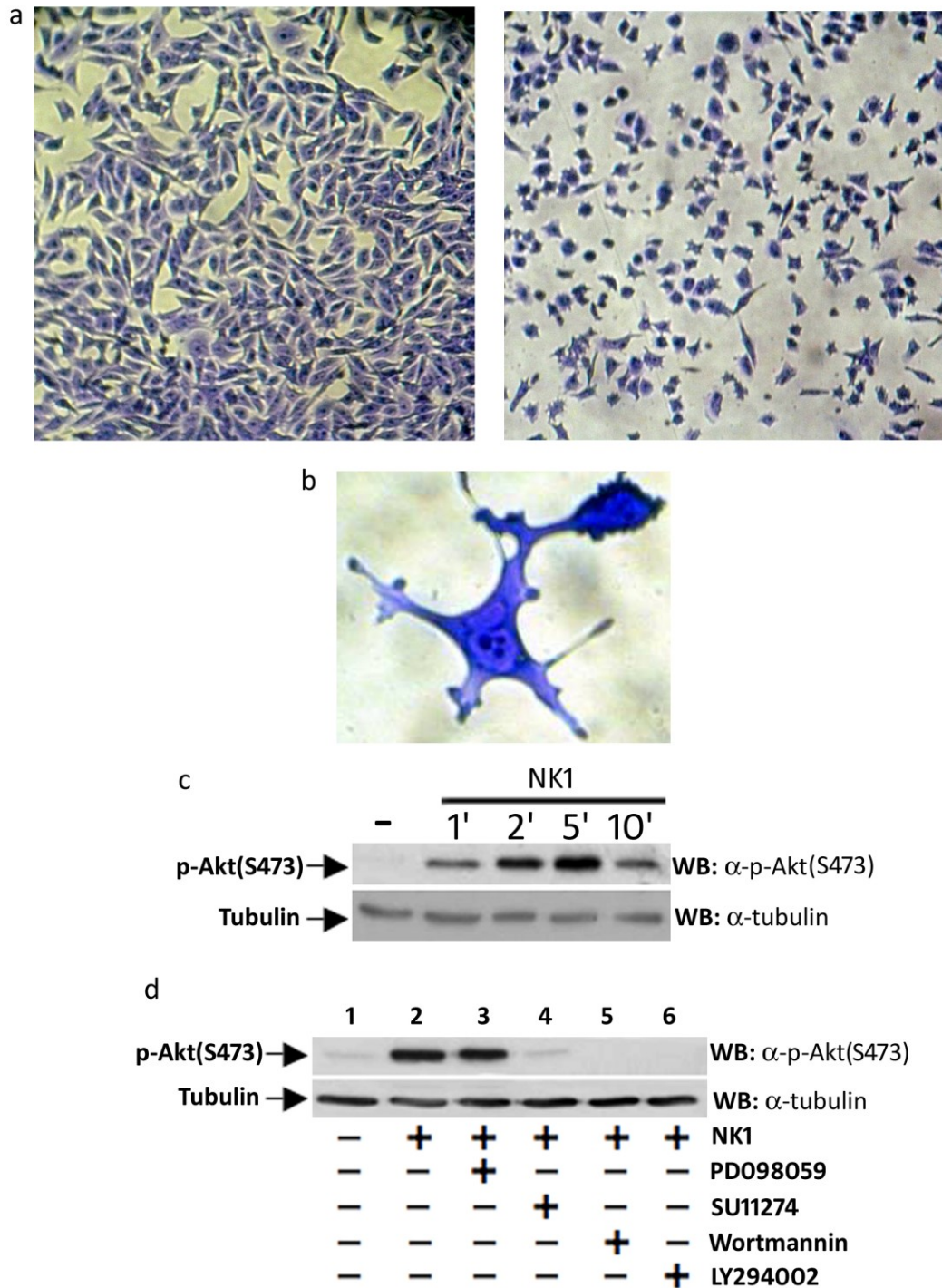
**Figura 14: NK1 promuove EMT in cellule PNT1A e induce la fosforilazione di SMAD2/3.**

Il pannello di sinistra mostra la morfologia epiteliale normale di un monostrato di PNT1A che appaiono in coltura strettamente impaccate. Il pannello di destra mostra la morfologia mesenchimale acquisita dalle cellule in seguito al trattamento con NK1 ( $10^{-6}$  M). Le cellule mostrano una forma più allungata se confrontata alle cellule epiteliali di controllo (non trattate) e risultano associate meno saldamente. (b) Riduzione dei livelli di espressione di E-caderina in PNT1A esposte a NK1. Western blotting anti-E-cadherina di lisati di cellule PNT1A controllo (non trattate) e cellule esposte a NK1 ( $10^{-6}$  M) per 12, 24 e 48 ore. (c) Aumento dei livelli di espressione di vimentina, fibronectina, vinculina,  $\alpha$ -actinina, e  $\alpha$ -SMA in cellule PNT1A esposte a NK1. Western blotting di lisati da cellule controllo (non trattate) e cellule esposte a NK1 ( $10^{-6}$  M) per 12 e 24 ore usando specifici anticorpi. (d) Western blotting di lisati di cellule non trattate (controllo) (lane 1), cellule esposte a NK1 ( $10^{-6}$  M) per 12 ore sia in assenza (lane 2) che in presenza di 2  $\mu$ M di SU11274 (lane 3), usando specifici anticorpi. (e) Fosforilazione di SMAD2/3 indotta da NK1 in PNT1A. Western blotting anti-fosfo-SMAD2/3 di lisati di cellule controllo (non trattate) e cellule esposte a NK1  $10^{-6}$  M per 1, 2, 5 e 10 minuti. (f) Western blotting anti-fosfo-SMAD2/3 di lisati da cellule controllo (non trattate) (lane 1), cellule esposte a NK1 ( $10^{-6}$  M) per 5 minuti sia in assenza (lane 2) che in presenza di 50  $\mu$ M PD098059 (lane 3) o 2  $\mu$ M SU11274 (lane 4). Tutti i blot in alto sono stati sottoposti alla procedura di “stripping” con l’anticorpo anti- $\gamma$ -tubulina (blot in basso) per la normalizzazione.

Le proteine SMAD rappresentano fattori chiave nel processo di EMT (88-90). In particolare, SMAD2 e SMAD3 vengono fosforilate dal recettore di TGF- $\beta$ 1 e rapidamente traslocano al nucleo in associazione con il comune mediatore SMAD4 (91). Benché TGF- $\beta$  sia considerato il principale regolatore dell'EMT, tuttavia, altri fattori possono indurre la fosforilazione delle proteine SMAD (92). La fosforilazione e la trascrizione di SMAD2 risultano, infatti, attivate da EGF ed HGF, indicando ciò che non solo TGF- $\beta$  ma anche i recettori tirosin chinasi possono attivare le proteine SMAD (93). Nel nostro studio, l'aggiunta di NK1 ( $10^{-6}$  M) alle cellule PNT1A promuove un aumento della fosforilazione di SMAD2/3 tempo-dipendente (Figura 14e) e tale effetto è inibito dalla pre-incubazione delle cellule con l'inibitore selettivo di c-MET SU11274 e dall'inibitore di MEK PD098059 (Figura 14f). Tali risultati indicano che la fosforilazione di SMAD2/3 indotta da NK1 e, più in generale, il processo di EMT delle cellule PNT1A richiede l'attivazione di c-MET ed ERK1/2.

#### ***4.2.4 NK1 induce “scattering” ed attiva Akt***

Il processo di “scattering”, correlato alla riduzione dell'espressione dell'E-caderina ed al contemporaneo incremento dell'adesione delle cellule alla matrice extracellulare mediata dalle integrine, ricapitola una serie di eventi che si verificano durante l'invasione tumorale e le metastasi (94). Le cellule epiteliali strettamente raggruppate demoliscono le loro giunzioni cellula-cellula e diventano cellule singole dotate di motilità ed invasività (95). Precedentemente è stato riportato che HGF causa lo “scattering” in cellule epiteliali di rene canino MDCK (96).



**Figura 15: NK1 promuove “scattering” in PNT1A e fosforilazione di Akt.**

(a) Il pannello di sinistra mostra le cellule epiteliali PNT1A strettamente associate, mentre il pannello di destra mostra le cellule trattate con NK1 che hanno rotto le loro giunzioni cellula-cellula e appaiono come singole cellule. (b) Forma non-polarizzata acquisita dalle PNT1A in seguito al trattamento con NK1. (c) Fosforilazione di Akt indotta dall'esposizione delle PNT1A ad NK1. Western blotting anti-fosfo-Akt di lisati di cellule controllo (non trattate) e cellule esposte a NK1 ( $10^{-6}$  M) per 1, 2, 5 e 10 minuti. (d) Western blotting anti-fosfo-Akt di lisati di cellule controllo (non trattate) (lane 1), cellule esposte a NK1 ( $10^{-6}$  M) per 5 minuti sia in assenza (lane 2) che in presenza di 50  $\mu$ M PD098059 (lane 3) o 2  $\mu$ M SU11274 (lane 4), o 0,5  $\mu$ M wortammina (lane 5), o 50  $\mu$ M LY294002 (lane 6). Tutti i blot in alto sono stati sottoposti alla procedura di “stripping” con l'anticorpo anti- $\gamma$ -tubulina (blot in basso) per la normalizzazione.

In questo studio, tra i cambiamenti morfologici indotti dal trattamento delle cellule prostatiche PNT1A con NK1, abbiamo osservato l'induzione dello "scattering" che previene la crescita a grappolo tipica delle cellule epiteliali (Figura 15a) e conferisce loro una forma non-polarizzata (Figura 10b). In conseguenza dei cambiamenti morfologici che conferiscono alle cellule maggiore propensione alla migrazione, le cellule perdono la polarità apicale-basale e acquisiscono una polarità anteriore-posteriore (Figura 15b) correlata a contatti cellula-cellula deboli e ad un'aumentata motilità e invasività.

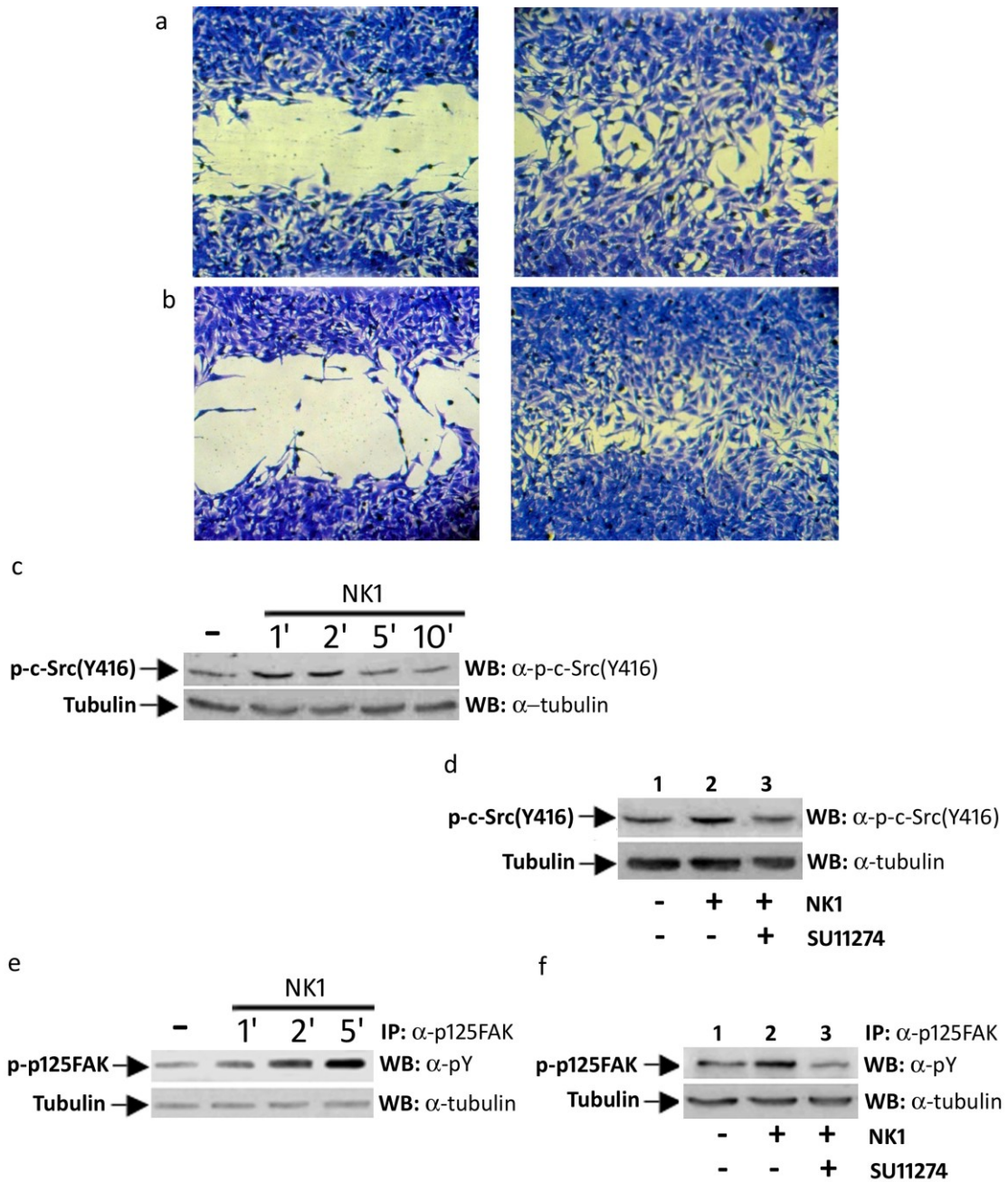
Alcuni studi suggeriscono che la via di trasduzione del segnale che coinvolge PI3K/Akt ha un ruolo nell'attività biologica dell'HGF relativa all'induzione della migrazione cellulare e dell'invasione (97-98). Nella nostra indagine abbiamo evidenziato che la stimolazione delle cellule con NK1 ( $10^{-6}$  M) induce un rapido aumento dei livelli di fosforilazione della serina 473 di Akt rispetto a quelli delle cellule di controllo (non trattate) (Figura 15c). Questo risultato è in accordo con l'osservazione che alcuni tipi di cellule di cancro prostatico avanzato esprimono elevati livelli di Akt fosforilato (98-99). La pre-incubazione delle cellule PNT1A con PD098059 prima della stimolazione con NK1 non riduce l'attivazione di Akt, mentre l'inibitore SU11274 e gli inibitori altamente selettivi di PI3K wortmannina e LY294002 inibiscono la fosforilazione di Akt indotta da NK1 (Figura 15d). Questi risultati suggeriscono che la fosforilazione di Akt è una conseguenza dell'attivazione di c-MET indotta da NK1 e coinvolge la via di trasduzione del segnale di PI3K a valle, mentre è indipendente dalla cascata di segnale Ras/MEK/ERK.

#### 4.2.5 NK1 promuove “wound healing” ed attiva p125FAK e c-Src

In seguito al processo di EMT promosso dai fattori di crescita le cellule acquisiscono una maggiore potenzialità di migrazione e invasione (49, 51, 100). Il frammento di HGF NK1 è in grado di promuovere EMT nelle cellule PNT1A (Figura 14), aumentando così la capacità delle cellule di migrare ed invadere tessuti circostanti.

Ad ulteriore conferma dell'accresciuta motilità delle cellule PNT1A indotta da NK1, abbiamo eseguito esperimenti di “wound healing” sia in assenza che in presenza di un rivestimento di fibronectina. Le cellule PNT1A sono state deprivate del siero per 48 ore e successivamente è stato effettuato un taglio sul monostrato cellulare mediante un ago. L'aggiunta di NK1 ( $10^{-7}$  M) ha stimolato il movimento delle cellule PNT1A verso la chiusura del taglio dopo 48 ore (Figura 16a). Le cellule trattate con NK1 hanno migrato in misura significativamente più elevata nella piastra di coltura rivestita con fibronectina (Figura 16b). Questo risultato indica che NK1 è in grado di stimolare la migrazione di cellule epiteliali di prostata umana PNT1A ed è consistente con l'osservazione che il processo di “wound healing” da parte delle cellule epiteliali può essere modulato *in vitro* dalla composizione della matrice extracellulare(101-102).

Le interazioni cellulari con la matrice extracellulare giocano un ruolo essenziale nell'insorgenza e progressione neoplastica e nelle metastasi (103). La chinasi delle adesioni focali p125FAK è una proteina tirosin-chinasica citoplasmatica che gioca un ruolo chiave nelle vie di trasduzione di segnali attivate dalle integrine, recettori di superficie che legano la matrice extracellulare all'actina del citoscheletro in strutture cellulari chiamate adesioni focali (104-105). L'attivazione di p125FAK è essenziale per una migrazione cellulare efficiente in risposta alla stimolazione con fattori di crescita ed integrine (106-108).



**Figura 16: NK1 promuove “wound healing” in PNT1A e attiva c-Src e p125FAK.**

(a, b) Il monostrato di cellule confluenti, in (a) piastre non rivestite o in (b) piastre rivestite con fibronectina, è stato graffiato con un ago di siringa da insulina e le cellule attaccate sono state incubate per 24 ore in assenza o in presenza di NK1. (c) Western blotting anti-fosfo-c-Src (Y416) di lisati di cellule controllo (non trattate) e cellule esposte a NK1 ( $10^{-6}$  M) per 1, 2, 5 e 10 minuti. (d) Western blotting anti-fosfo-c-Src (Y416) di lisati di cellule controllo (non trattate) (lane 1), cellule esposte a NK1 ( $10^{-6}$  M) per 5 minuti sia in assenza (lane 2) che in presenza di  $2 \mu\text{M}$  SU11274 (lane 3). (e) Immunoprecipitazione (IPP) di p125FAK utilizzando l'anticorpo anti-p125FAK e Western blotting anti-pY di lisati di cellule controllo (non trattate) e cellule esposte a NK1 ( $10^{-6}$  M) per 1, 2, 5 e 10 minuti. (f) Immunoprecipitazione (IPP) di p125FAK usando l'anticorpo anti-p125FAK e Western blotting anti-pY di lisati di cellule di controllo (non trattate) (lane 1), cellule esposte a NK1 ( $10^{-6}$  M) per 5 minuti o in assenza (lane 2), o in presenza di  $2 \mu\text{M}$  SU11274 (lane 3). Tutti i blot in alto sono stati sottoposti alla procedura di “stripping” con l'anticorpo anti- $\gamma$ -tubulina (blot in basso) per la normalizzazione.



La proteina p125FAK attivata forma un complesso binario con la chinasi c-Src (109), bersaglio a valle attivato dal legame di HGF con il recettore c-MET (110). Il complesso c-Src/p125FAK può fosforilare molti altri substrati e innescare molteplici cascate di segnali che regolano svariate funzioni cellulari (106). In questo studio abbiamo osservato che l'aggiunta di NK1 ( $10^{-6}$  M) alle cellule PNT1A aumenta rapidamente la fosforilazione di c-Src a livello del residuo Tyr416 (Figura 16c) e la fosforilazione delle tirosine di p125FAK (Figura 11d). La fosforilazione indotta da NK1 sia di c-Src che di p125FAK è inibita dalla pre-incubazione con l'inibitore di c-MET, SU11274 (Figura 16e, f).

## 5. DISCUSSIONE

L'invasività è un meccanismo complesso attraverso cui le cellule tumorali lasciano il loro sito di origine e invadono altri tessuti. Essa è il risultato di trasformazioni del fenotipo cellulare che acquisisce proprietà di proliferazione incontrollata, aumentata abilità di migrazione e resistenza all'apoptosi (111). In questo lavoro di tesi abbiamo dimostrato la capacità del frammento di HGF NK1 di conferire alle cellule epiteliali di prostata umana PNT1A un fenotipo invasivo. Tali cellule esprimono il recettore specifico di HGF, c-MET, che viene attivato da NK1 attraverso la fosforilazione dei residui di tirosina 1313/1349/1356. In risposta all'attivazione del recettore c-MET indotta da NK1 abbiamo osservato un incremento della proliferazione e della migrazione cellulare.

Dal punto di vista morfologico, l'esposizione delle cellule a NK1 oltre ad un'incrementata proliferazione induce EMT e "scattering", che sono i primi processi cellulari caratteristici dell'aumentata capacità di migrazione delle cellule e di comportamento invasivo. Durante la progressione tumorale, il processo EMT è necessario per la conversione da tumore benigno a cancro più invasivo ed aggressivo (49, 51, 112). L'induzione dell'EMT sembra essere tessuto-specifica e cellula-specifica (86). Il fenotipo migratorio acquisito dalle cellule PNT1A dopo il trattamento con NK1 è sottolineato dalla riduzione dei livelli di espressione dell'E-caderina e dall'aumento dei livelli dei marcatori mesenchimali quali vimentina, fibronectina, vinculina,  $\alpha$ -actinina ed  $\alpha$ -SMA. La perdita delle giunzioni di E-caderina tra le cellule epiteliali e il riarrangiamento del citoscheletro verso una forma mesenchimale allungata rende le cellule PNT1A maggiormente capaci di muoversi e invadere altri tessuti. L'incremento della motilità delle cellule PNT1A trattate con NK1 è ulteriormente dimostrata

dall'aumentata capacità acquisita dalle cellule a riparare una ferita prodotta artificialmente nel monostrato cellulare.

I risultati ottenuti dimostrano che la stimolazione delle cellule PNT1A con NK1 promuove tutti gli effetti (mitogenici, morfogenici e motogenici) già descritti per il complesso HGF/c-MET in altri sistemi cellulari e in tessuti tumorali, ma mai evidenziati in una linea cellulare di prostata normale e, soprattutto, mai osservati tutti insieme in un singolo sistema cellulare.

Questo studio, tuttavia, non si è limitato all'osservazione dei cambiamenti fenotipici delle cellule trattate con NK1, ma ha anche identificato le vie di trasduzione di segnali attraverso cui NK1 promuove la trasformazione delle cellule PNT1A. L'analisi molecolare della cascata di segnali conseguenti all'attivazione di c-MET indotta da NK1 ha consentito di mettere in luce i complessi meccanismi molecolari che regolano la trasformazione maligna delle cellule prostatiche.

La fosforilazione dei residui di tirosina di c-MET forniscono il sito di ancoraggio per proteine intracellulari di segnale che determinano l'attivazione della via di trasduzione Ras/MEK/MAPK che regola i processi di proliferazione cellulare. Nel nostro lavoro abbiamo osservato che il trattamento delle cellule PNT1A con NK1 induce la fosforilazione di ERK1/2, MEK-dipendente, e l'attivazione di STAT3, direttamente coinvolti nei processi di proliferazione ed angiogenesi (82, 85). L'attivazione di STAT3 richiede la fosforilazione dei residui di Tyr707 e Ser727 che abbiamo osservato nelle cellule PNT1A trattate con NK1. La fosforilazione del residuo Ser727 è regolato dalle proteine ERK, come dimostrato dall'osservazione che essa è inibita dall'inibitore di MEK.

I nostri risultati suggeriscono che anche l'attivazione promossa da NK1 delle proteine SMAD, coinvolte nel processo EMT, richiede la fosforilazione di ERK. La

fosforilazione di SMAD2/3, infatti, risulta ridotta dal pre-trattamento delle cellule PNT1A con l'inibitore specifico di MEK. Possiamo, quindi, concludere che l'attivazione di ERK1/2, c-MET-dipendente, rappresenta un segnale molecolare chiave nella regolazione della proliferazione e dell' EMT nelle cellule PNT1A stimulate con NK1.

La prima fase del processo EMT è lo "scattering" attraverso cui le cellule epiteliali smettono di crescere raggruppate a grappolo e si separano le une dalle altre (86-87). Dopo questa prima fase in cui le giunzioni cellulari vengono distrutte, le cellule PNT1A iniziano ad acquisire una forma mesenchimale allungata e diventano fortemente mobili. L'attivazione della via di trasduzione del segnale PI3K/Akt è necessaria per l'induzione dello "scattering" delle cellule e per l'EMT (97-98). Nel nostro sistema cellulare, NK1 induce la fosforilazione di Akt attraverso un meccanismo PI3K-dipendente. Lo "scattering" e l' EMT sono i processi iniziali della migrazione cellulare, per cui possiamo concludere che NK1 conferisce alle cellule PNT1A aumentata capacità di migrazione che e' stata ulteriormente dimostrata dagli esperimenti di "wound healing".

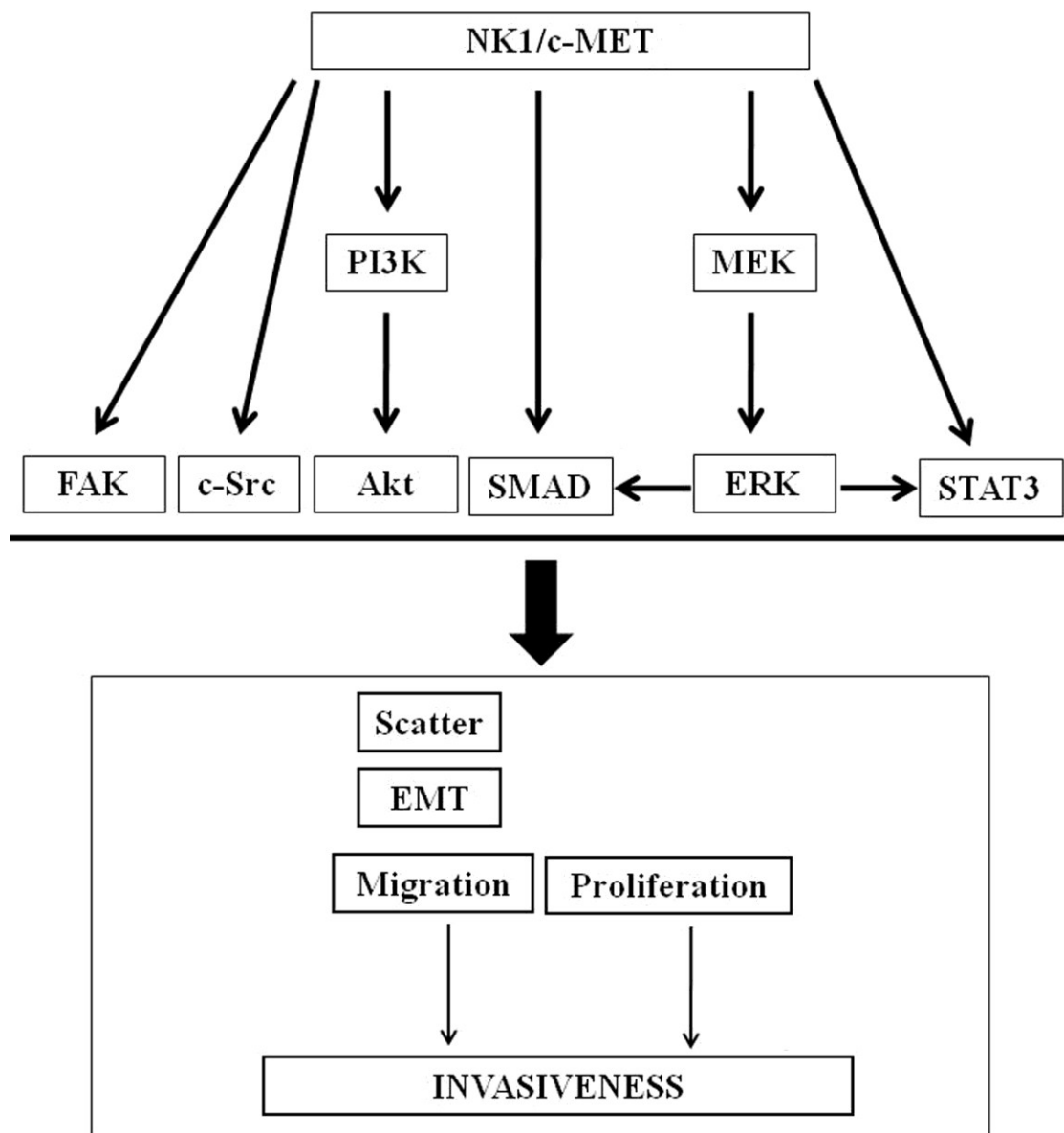
Le vie di trasduzione di segnali che regolano la migrazione cellulare prevedono il coinvolgimento delle proteine c-Src e p125FAK (107-110, 113). Nel nostro studio, abbiamo osservato che l'attivazione di queste due molecole dipende dall'attivazione di c-MET da parte di NK1, come dimostrato dagli esperimenti di inibizione della fosforilazione di c-Src e p125FAK in seguito all'utilizzo dell'inibitore di c-MET SU11274.

In uno studio precedente in cui è stato usato un approccio proteomico per identificare le molecole coinvolte nella cascata di segnali attivate dal complesso HGF/c-MET nel tumore del polmone a piccole cellule è stata dimostrata la fosforilazione di

numeroso proteine tra cui ERK1/2, MEK, STAT3, FAK, e Akt (114). Questi risultati, sebbene relativi a tessuti di cancro del polmone a piccole cellule, sono concordi con i nostri risultati relativi alle vie di trasduzione di segnali attivate da c-MET in seguito alla stimolazione delle cellule di prostata PNT1A con NK1.

Nella Figura 17 è riportato uno schema riassuntivo dei meccanismi molecolari attraverso cui NK1, attivando c-MET, induce la trasformazione delle cellule epiteliali di prostata umana PNT1A da un fenotipo normale ad un fenotipo maligno. La rappresentazione fa riferimento ad un modello generale del meccanismo molecolare che regola la trasformazione maligna delle cellule prostatiche PNT1A da parte di NK1/c-MET, ma è evidente che tutti i meccanismi cooperano in modo sinergico.

In conclusione, i nostri risultati suggeriscono che il dominio NK1 di HGF può rappresentare un valido bersaglio per l'inibizione di eventi molecolari e cellulari che sono responsabili della crescita e progressione del cancro alla prostata. Inoltre, l'identificazione delle molecole di segnale coinvolte nelle risposte cellulari all'attivazione di c-MET da parte di NK1 può risultare utile per lo sviluppo di nuovi farmaci per il trattamento della crescita benigna e maligna della ghiandola prostatica. Infine, dal momento che le molecole di segnale che si attivano nel processo neoplastico sono spesso le stesse che regolano lo sviluppo degli organi, i risultati di questo studio suggeriscono un potenziale impiego di NK1 nella rigenerazione della prostata.



**Figura 17:** Schema proposto per descrivere il meccanismo molecolare con cui il complesso NK1/c-MET induce proprietà tumorigeniche in cellule epiteliali normali di prostata PNT1A. Il complesso NK1/c-MET attiva una cascata di segnali che promuove la proliferazione cellulare, “scattering”, EMT e “wound healing” nelle PNT1A attraverso l’attivazione dei due principali “pathways” Ras/MEK/ERK1/2 e PI3K/Akt.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Baade PD, Youlten DR, Krnjacki LJ. International epidemiology of prostate cancer: geographical distribution and secular trends. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53: 171-184.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2. IARC CancerBase no. 10. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2010. Available: <http://globocan.iarc.fr>.
3. Stasiewicz D, Starosławska E, Brzozowska A, Mocarska A, Losicki M, Szumiło J, Burdan F. Epidemiology and risk factors of the prostate cancer. *Pol Merkur Lekarski* 2012; 33(195): 163-167.
4. Simard J, Dumont M, Soucy P, Labrie F. Perspective: prostate cancer susceptibility genes. *Endocrinology* 2002; 143(6): 2029–2040.
5. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int* 2003;91(9): 789-94.
6. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343(2): 78-85.
7. Yadav N, Heemers HV. Androgen action in the prostate gland. *Minerva Urol Nefrol* 201; 64(1): 35-49.
8. Ricke WA, Wang Y, Cunha GR. Steroid hormones and carcinogenesis of the prostate: the role of estrogens. *Differentiation* 2007; 75(9): 871-882.
9. Hayes RB, de Jong FH, Raatgever J, Bogdanovicz J, Schroeder FH, van der Maas P, Oishi K, Yoshida O. Physical characteristics and factors related to sexual development and behaviour and the risk for prostatic cancer. *Eur J Cancer Prev* 1992; 1:239–245.
10. Ellem SJ, Risbridger GP. The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1155: 174-186.
11. Chung LW, Baseman A, Assikis V, Zhou HE. Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *J Urol* 2005; 173: 10-20.

12. Lail-Trecker M, Gulati R, Peluso JJ. A role for hepatocyte growth factor/scatter factor in regulating normal and neoplastic cells of reproductive tissues. *J Soc Gynecol Investig* 1998; 5: 114-121.
13. Knudsen BS, Edlund M. Prostate cancer and the met hepatocyte growth factor receptor. *Adv Cancer Res* 2004; 91: 31-67.
14. Blanchère M, Saunier E, Mestayer C, Broshuis M, Mowszowicz I. Alterations of expression and regulation of transforming growth factor beta in human cancer prostate cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 82: 297-304.
15. van Moorselaar RJ, Voest EE. Angiogenesis in prostate cancer: its role in disease progression and possible therapeutic approaches. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 197: 239-250.
16. Kaminski A, Hahne JC, Haddouti el-M, Florin A, Wellmann A, Wernert N. Tumour-stroma interactions between metastatic prostate cancer cells and fibroblasts. *Int J Mol Med* 2006; 18(5): 941-950.
17. Chung LW, Li W, Gleave ME, Hsieh JT, Wu HC, Sikes RA, Zhau HE, Bandyk MG, Logothetis CJ, Rubin JS, et al. Human prostate cancer model: roles of growth factors and extracellular matrices. *J Cell Biochem Suppl.* 1992; 16H: 99-105.
18. Hwang CI, Choi J, Zhou Z, Flesken-Nikitin A, Tarakhovsky A, Nikitin AY. MET-dependent cancer invasion may be preprogrammed by early alterations of p53-regulated feedforward loop and triggered by stromal cell-derived HGF. *Cell Cycle.* 2011; 10(22): 3834-3840.
19. Accornero P, Pavone LM, Baratta M. The scatter factor signaling pathways as therapeutic associated target in cancer therapy. *Curr Med Chem* 2010; 17: 2699-2712.
20. Kong-Beltran M, Stamos J, Wickramasinghe D. The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation. *Cancer Cell* 2004; 6: 75-84..
21. Ponzetto C, Bardelli A, Maina F, Longati P, Panayotou G, Dhand R, Waterfield MD, Comoglio PM. A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-Kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4600-4608.



22. Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G, Comoglio PM. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 1994; 77: 261-271.
23. Chan AM., Rubin JS, Bottaio DP; Hirschfield DW; Chedid M; Aaronson SA. Identification of a competitive HGF antagonist encoded by an alternative transcript. *Science* 1991; 254: 1382-1385.
24. Lokker NA, Mark MR, Luis EA, Bennett GL, Robbins KA, Baker JB, Godowski PJ. Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *EMBO J* 1992; 11: 2503-2510.
25. Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Vande Woude G. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(2):89-103.
26. Jakubczak JL, LaRoche W J,Merlino G. NK1, a natural splice variant of hepatocyte growth factor/ scatter factor, is a partial agonist in vivo. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 1275–1283.
27. Youles M, Holmes O, Petoukhov MV, Nessen MA, Stivala S, Svergun DI, Gherardi E. Engineering the NK1 fragment of hepatocyte growth factor/scatter factor as a MET receptor antagonist. *J Mol Biol* 2008; 377: 616–622.
28. Otsuka T, Jakubczak J, Vieira W, Bottaro DP, Breckenridge D, Laroche WJ, Merlino G. Disassociation of met-mediated biological responses in vivo: the natural hepatocyte growth factor/scatter factor splice variant NK2 antagonizes growth but facilitates metastasis. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 2055–2065.
29. Date K, Matsumoto K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T. HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor. *FEBS Lett* 1997; 420: 1–6.
30. Nakamura T, Sakai K,Matsumoto K. Anti-cancer approach with NK4: bivalent action and mechanisms. *Anticancer Agents Med Chem* 2010; 10: 36–46.
31. Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 1987; 327: 239-242.
32. Di Renzo MF, Narsimhan RP, Olivero M, Bretti S, Giordano S, Medico E, Gaglia P, Zara P, Comoglio PM. Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. *Oncogene* 1991; 6: 1997-2003.

33. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffler A, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 1992; 119: 629-641.
34. Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, Polverini P, Rosen EM. Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1937-1941.
35. Anastasi S, Giordano S, Sthandier O, Gambarotta G, Maione R, Comoglio P, Amati P. A natural hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in myoblast cells and the effect of the constitutive Met kinase activation on myogenic differentiation. *J Cell Biol* 1997; 37: 1057-1068.
36. Galimi F, Bagnara GP, Bonsi L, Cottone E, Follenzi A, Simeone A, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor induces proliferation and differentiation of multipotent and erythroid hemopoietic progenitors. *J Cell Biol* 1994; 127: 1743-1754.
37. Nishino T, Hisha H, Nishino N, Adachi M, Ikehara S. Hepatocyte growth factor as a hematopoietic regulator. *Blood* 1995; 85: 3093-3100.
38. Ebens A, Brose K, Leonardo ED, Hanson MG Jr, Bladt F, Birchmeier C, Barres BA, Tessier-Lavigne M. Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron* 1996; 17: 1157-1172.
39. Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L, Comoglio PM. Tyrosines 1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* 1994; 9: 49-57.
40. Schmidt, F. Bladt, S. Goedecke, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995; 373: 699-702.
41. Fan B, Brennan J, Grant D, Peale F, Rangell L, Kirchhofer D. Hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 (HAI-1) is essential for the integrity of basement membranes in the developing placental labyrinth. *Dev Biol* 2007; 303(1): 222-230.
42. Takayama H, La Rochelle WJ, Anver M, Bockman DE, Merlino G. Scatter factor/hepatocyte growth factor as a regulator of skeletal muscle and neural crest development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(12): 5866-5871.

43. Tomson PL, Lumley PJ, Alexander MY, Smith AJ, Cooper PR. Hepatocyte growth factor is sequestered in dentine matrix and promotes regeneration-associated events in dental pulp cells. *Cytokine* 2013; 61(2):622-629.
44. Wen Q, Zhou L, Zhou C, Zhou M, Luo W, Ma L. Change in hepatocyte growth factor concentration promote mesenchymal stem cell-mediated osteogenic regeneration. *J Cell Mol Med* 2012; 16(6): 1260-1273.
45. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(12): 834-848.
46. Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S, Wehland j, Birchmeier C, Birchmeier W. c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol* 2007; 177: 151-162.
47. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 915-925.
48. Accornero P, Martigniani E, Macchi E, Baratta M. Hepatocyte growth factor exerts multiple biological functions on bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 2007; 90: 4289-4296.
49. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871-890.
50. Yang J, Dai C, Liu Y. A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 68-78.
51. Wells A, Chao YL, Grahovac J, Wu Q, Lauffenburger DA. Epithelial and mesenchymal phenotypic switchings modulate cell motility in metastasis. *Front Biosci* 2011; 16: 815-837.
52. Elliott BE, Hung WL, Boag AH, Tuck AB. The role of hepatocyte growth factor (scatter factor) in epithelial-mesenchymal transition and breast cancer. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80(2): 91-102.
53. Liu Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: 7-16.
54. Bolanos-Garcia VM. MET meet adaptors: functional and structural implications in downstream signalling mediated by the Met receptor. *Mol Cell Biochem* 2005; 276(1-2): 149-157.

55. Tulasne D, Foveau B. The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ* 2008; 15(3): 427-434.
56. Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 2000; 19(49): 5582-5589.
57. Peschard P, Park M. From Tpr-Met to Met, tumorigenesis and tubes. *Oncogene* 2007; 26: 1276-1285.
58. Lesko E, Majka M. The biological role of HGF-MET axis in tumor growth and development of metastasis. *Front Biosci* 2008; 13: 1271-1280.
59. Boccaccio C, Comoglio PM. Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 637-645.
60. Lai AZ, Abella JV, Park M. Crosstalk in Met receptor oncogenesis. *Trends Cell Biol* 2009; 19(10):542-551.
61. Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Papavassiliou AG. Targeting MET as a strategy to overcome crosstalk-related resistance to EGFR inhibitors. *Lancet Oncol* 2009; 10(7): 709-717.
62. Chan PC, Chen SY, Chen CH, Chen HC. Crosstalk between hepatocyte growth factor and integrin signaling pathways. *J Biomed Sci* 2006; 13(2): 215-223.
63. Taher TE, van der Voort R, Smit L, Keehnen RM, Schilder-Tol EJ, Spaargaren M, Pals ST. Cross-talk between CD44 and c-Met in B cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 246: 31-37;
64. Conrotto P, Corso S, Gamberini S, Comoglio PM, Giordano S. Interplay between scatter factor receptors and B plexins controls invasive growth. *Oncogene*. 2004; 23(30): 5131-5137.
65. Accornero P, Martignani E, Miretti S, Cucuzza LS, Baratta M. Epidermal growth factor and hepatocyte growth factor receptors collaborate to induce multiple biological responses in bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 2009; 92: 3667-3675.
66. Gmyrek GA, Walburg M, Webb CP, Yu HM, You X, Vaughan ED, Vande Woude GF, Knudsen BS. Normal and malignant prostate epithelial cells differ in their response to hepatocyte growth factor/scatter factor. *Am J Pathol* 2001; 159: 579-590.

67. Avancès C, Georget V, Térouanne B, Orio F, Cussenot O, Mottet N, Costa P, Sultan C. Human prostatic cell line PNT1A, a useful tool for studying androgen receptor transcriptional activity and its differential subnuclear localization in the presence of androgens and antiandrogens. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 184: 13-24.
68. Mitchell S, Abel P, Ware M, Stamp G, Lalani E. Phenotypic and genotypic characterization of commonly used human prostatic cell lines. *BJU Int* 2000; 85: 932-944.
69. Chirgadze DY, Hepple JP, Zhou H, Byrd RA, Blundell TL, Gherardi E. Crystal structure of the NK1 fragment of HGF/SF suggests a novel mode for growth factor dimerization and receptor binding. *Nat Struct Biol* 1999; 6: 72-79.
70. Schwall RH, Chang LY, Godowski PJ, Kahn DW, Hillan KJ, Bauer KD, Zioncheck TF. Heparin induces dimerization and confers proliferative activity onto the hepatocyte growth factor antagonists NK1 and NK2. *J Cell Biol* 1996; 133: 709-718.
71. Nakashiro K, Hayashi Y, Oyasu R. Immunohistochemical expression of hepatocyte growth factor and c-Met/HGF receptor in benign and malignant human prostate tissue. *Oncol Rep* 2003; 10: 1149-1153.
72. Pisters LL, Troncoso P, Zhau HE, Li W, von Eschenbach AC, Chung LW. c-met proto-oncogene expression in benign and malignant human prostate tissues. *J Urol* 1995; 154: 293-298.
73. van Leenders G, van Balken B, Aalders T, Hulsbergen-van de Kaa C, Ruitter D, Schalken J. Intermediate cells in normal and malignant prostate epithelium express c-MET: implications for prostate cancer invasion. *Prostate* 2002; 51: 98-107.
74. Humphrey PA, Zhu X, Zarnegar R, Swanson PE, Ratliff TL, Vollmer RT, Day ML. Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma. *Am J Pathol* 1995; 147: 386-396.
75. Chen Q, Seol D, Carr B, Zarnegar R. Co-expression and regulation of Met and Ron proto-oncogenes in human hepatocellular carcinoma tissues and cell lines. *Hepatology* 1997; 26: 59-66.
76. Tempest PR, Stratton MR, Cooper CS. Structure of the met protein and variation of met protein kinase activity among human tumour cell lines. *Br J Cancer* 1988; 58: 3-7.

77. Comoglio PM. Structure, biosynthesis and biochemical properties of the HGF receptor in normal and malignant cells. *EXS* 1993; 65: 131-165.
78. Zhu H, Naujokas MA, Fixman ED, Torossian K, Park M. Tyrosine 1356 in the carboxyl-terminal tail of the HGF/SF receptor is essential for the transduction of signals for cell motility and morphogenesis. *J Biol Chem* 1994; 269: 29943-29948.
79. Sattler M, Pride YB, Ma P, Gramlich JL, Chu SC, Quinnan LA, Shirazian S, Liang C, Podar K, Christensen JG, Salgia R. A novel small molecule met inhibitor induces apoptosis in cells transformed by the oncogenic TPR-MET tyrosine kinase. *Cancer Res* 2003; 63(17): 5462-5469.
80. MacDougall CA, Vargas M, Soares CR, Holzer RG, Ide AE, Jorcyk CL. Involvement of HGF/SF-Met signaling in prostate adenocarcinoma cells: evidence for alternative mechanisms leading to a metastatic phenotype in Pr-14c. *Prostate* 2005; 64: 139-148.
81. Nakashiro K, Okamoto M, Hayashi Y, Oyasu R. Hepatocyte growth factor secreted by prostate-derived stromal cells stimulates growth of androgen-independent human prostatic carcinoma cells. *Am J Pathol* 2000; 157(3): 795-803.
82. Paumelle R, Tulasne D, Kherrouche Z, Plaza S, Leroy C, Reveneau S, Vandebunder B, Fafeur V. Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene* 2002; 21: 2309-2319.
83. Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, Ma PC, Morrison PT, Salgia R. Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13(1): 41-59.
84. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7686-7689.
85. Zhang YW, Wang LM, Jove R, Vande Woude GF. Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. *Oncogene* 2002; 21(2): 217-226.
86. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 1420-1428.

87. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133: 704-715.
88. Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Böttinger EP. Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J* 2004; 23(5): 1155-1165.
89. Davies M, Robinson M, Smith E, Huntley S, Prime S, Paterson I. Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways. *J Cell Biochem* 2005; 95(5): 918-931.
90. Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 2005; 19: 2783-2810.
91. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 2009; 19(2): 156-172.
92. Giehl K, Imamichi Y, Menke A. Smad4-independent TGF-beta signaling in tumor cell migration. *Cells Tissues Organs* 2007; 185(1-3): 123-130.
93. de Caestecker MP, Parks WT, Frank CJ, Castagnino P, Bottaro DP, Roberts AB, Lechleider RJ. Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes Dev* 1998; 12: 1587-1592.
94. Birchmeier W. Molecular aspects of the loss of cell adhesion and gain of invasiveness in carcinomas. *Princess Takamatsu Symp.* 1994; 24: 214-232.
95. Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 2008; 27(55): 6920-6929.
96. Terauchi R, Kitamura N. Requirement of regulated activation of Ras for response of MDCK cells to hepatocyte growth factor/scatter factor. *Exp Cell Res* 2000; 256: 411-422.
97. Potempa S, Ridley AJ. Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 2185-2200.
98. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, Navolanic PM, Terrian DM, Franklin RA, D'Assoro AB, Salisbury JL, Mazzarino MC, Stivala F, Libra M. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT

- pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul* 2006; 46: 249-279.
99. Ghosh PM, Malik S, Bedolla R, Kreisberg JI. Akt in prostate cancer: possible role in androgen-independence. *Curr Drug Metab* 2003; 4(6): 487-496.
  100. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006; 172: 973-981.
  101. Garat C, Kheradmand F, Albertine KH, Folkesson HG, Matthay MA. Soluble and insoluble fibronectin increases alveolar epithelial wound healing in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1996; 271: 844-853.
  102. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117(7 Suppl): 12S-34S.
  103. Kim Y, Stolarska MA, Othmer HG. The role of the microenvironment in tumor growth and invasion. *Prog Biophys Mol Biol* 2011; 106(2): 353-379.
  104. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110: 673-687.
  105. Schaller MD. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci* 2010;123(Pt 7): 1007-1013.
  106. Zhao J, Guan JL. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28: 35-49.
  107. Hauck CR, Hsia DA, Schlaepfer DD. The focal adhesion kinase--a regulator of cell migration and invasion. *IUBMB Life* 2002; 53: 115-119.
  108. Provenzano PP, Keely PJ. The role of focal adhesion kinase in tumor initiation and progression. *Cell Adh Migr* 2009; 3(4): 347-350.
  109. Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18(5): 516-523.
  110. Brunton VG, Frame MC. Src and focal adhesion kinase as therapeutic targets in cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8(4): 427-432.



111. Boyd D. Invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15(1): 77-89.
112. Gos M, Miłoszewska J, Przybyszewska M. Epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Postepy Biochem* 2009; 55: 121-128.
113. Chen HC, Chan PC, Tang MJ, Cheng CH, Chang TJ. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase stimulated by hepatocyte growth factor leads to mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 25777-25782.
114. Ma PC, Tretiakova MS, Nallasura V, Jagadeeswaran R, Husain AN, Salgia R. Downstream signalling and specific inhibition of c-MET/HGF pathway in small cell lung cancer: implications for tumour invasion. *Br J Cancer* 2007; 97: 368-377.

## 7. PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

### • *Lavori in extenso*

1. Pavone LM, Spina A, **Rea S**, Santoro D, Mastellone V, Lombardi P, Avallone L. Serotonin transporter gene deficiency is associated with sudden death of newborn mice through activation of TGF-beta1 signalling. *J Mol Cell Cardiol.* 2009 Nov;47(5):691-7.
2. Spina A, **Rea S**, De Pasquale V, Mastellone V, Avallone L, Pavone LM. Fate map of serotonin transporter-expressing cells in developing mouse thyroid. *Anat Rec (Hoboken).* 2011 Mar;294(3):384-90.
3. Pavone LM, Cattaneo F, **Rea S**, De Pasquale V, Spina A, Sauchelli E, Mastellone V, Ammendola R. Intracellular signaling cascades triggered by the NK1 fragment of hepatocyte growth factor in human prostate epithelial cell line PNT1A. *Cell Signal.* 2011 Dec;23(12):1961-71.
4. Pavone LM, **Rea S**, Trapani F, De Pasquale V, Tafuri S, Papparella S, Paciello O. Role of serotonergic system in the pathogenesis of fibrosis in canine idiopathic inflammatory myopathies. *Neuromuscul Disord.* 2012 Jun;22(6):549-57.
5. Pavone LM, Del Vecchio P, Mallardo P, Altieri F, De Pasquale V, **Rea S**, Martucci NM, Di Stadio CS, Pucci P, Flagiello A, Masullo M, Arcari P, Rippa E. Structural characterization and biological properties of human gastrokine 1. *Mol Biosyst.* 2013 Mar 5;9(3):412-21.

### • *Comunicazioni a congressi internazionali*

6. Pavone LM, Trapani F, Spina A, **Rea S**, Avallone L, Papparella S, Paciello O. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of fibrosis in canine idiopathic inflammatory myopathies. Accettato come comunicazione orale al XII International Congress on Neuromuscular diseases, 17-22 July 2010, Naples (Italy).
7. Cattaneo F, **Rea S**, Spina A, Pavone LM, Ammendola R. Intracellular signaling cascades triggered by FPRL1 in human prostate cells. 35<sup>th</sup> FEBS Congress Molecules of Life. June 26 – July 1, 2010, Göteborg (Sweden).

### • *Comunicazioni a congressi nazionali*

8. Pavone LM, Mastellone V, **Rea S**, Cattaneo F., Spina A, De Pasquale V, Ammendola R, Avallone L. Il dominio NK1 del fattore di crescita epatocitario HGF promuove la trasformazione e la crescita neoplastica in cellule epiteliali di prostata umana. Congresso Nazionale So.Fi.Vet. 2010, Torino.

9. **Rea S**, Cattaneo F, Spina A, De Pasquale V, Tafuri S, Ammendola R, Pavone LM. Il dominio NK1 di HGF conferisce proprietà invasive alle cellule epiteliali umane di prostata PNT1A. Atti delle Giornate Scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita, Università di Napoli Federico II, Novembre 2010, Napoli.
10. Carotenuto A, Brancaccio D, Limatola A, **Rea S**, De Pasquale V, Pavone LM, Novellino E. Monitoring the effect of antagonist on P53-MDM2 interaction with NMR spectroscopy. Recent results. XXIV Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana, Lecce, Settembre 2011.
11. **Rea S**, Tafuri S, Costagliola A, De Pasquale V, Mastellone V, Pavone LM. Serotonin role in development, function and disease of thyroid gland. 56<sup>th</sup> Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica e Biologia Molecolare, Chieti, Settembre 2012.