

UNIVERSITA' DI ROMA "SAPIENZA"

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato di ricerca in Farmacologia

Tesi sperimentale

RECETTORI METABOTROPICI DEL GLUTAMMATO ESPRESSI SULLE
CELLULE STAMINALI CANCEROSE: NUOVI TARGET PER
L'OTTIMIZZAZIONE DELLA TERAPIA ANTIBLASTICA

Tutor:

Prof.ssa Daniela Melchiorri

Dottoranda:

Dott.ssa Paola Mosillo

A.A 2009/2010

SOMMARIO

1 Introduzione	p. 1
1.1 Cellule staminali adulte (SC)	p. 1
1.2 Cellule staminali emopoietiche	p. 2
1.3 Cellule staminali intestinali	p. 2
1.4 Cellule staminali tumorali	p. 3
1.5 Le sfere tumorali	p. 5
1.6 La trasmissione glutammatergica	p. 6
1.7 I recettori ionotropici del Glutammato	p. 7
2 Scopo del lavoro	p. 17
3 Materiali e metodi	p. 18
3.1 Coltura di cellule staminali tumorali	p. 18
3.2 Crioconservazione e scongelamento	p. 19
3.3 Estrazione e dosaggio proteico	p. 20
3.4 Analisi Western Blot	p. 20
3.5 Estrazione dell'RNA	p. 22
3.6 Determinazione della concentrazione dell'RNA	p. 22
3.7 Reazione di sintesi del cDNA	p. 23
3.8 PCR	p. 23
3.9 Elettroforesi orizzontale su gel di agarosio	p. 25
3.10 Dosaggio della concentrazione di glutammato nel mezzo	p. 25
3.11 Misurazione della formazione di AMPc	p. 25
3.12 Saggio di vitalità	p. 25
3.13 Trasfezione	p. 26
3.14 Oligonucleotidi	p. 27
4 Risultati	
4.1 Colture primarie di cellule staminali tumorali derivanti da adenocarcinoma di colon-retto esprimono i recettori mGlu	p.28

4.2 Caratterizzazione delle cellule staminali tumorali derivanti da adenocarcinoma di colon-retto	p. 30
	p. 31
4.3 Il recettore mGlu2/3 espresso in colture di cellule staminali tumorali di da adenocarcinoma di colon-retto è funzionante	
4.4 Il blocco farmacologico del recettore mGlu2/3 aumenta la risposta delle cellule staminali tumorali derivanti da adenocarcinoma di colon-retto ai chemioterapici classici	p. 33
4.5 Il blocco farmacologico del recettore mGlu2/3 amplifica la risposta al 5-FU delle cellule staminali tumorali di adenocarcinoma di colon-retto mediante inibizione della via PI-3K	p. 38
4.6 LY341495 combinato con 5-FU riduce i livelli di espressione di DYPD (dihydropyrimidine-dehydrogenase) inibendo la via della PI-3K	p. 42
5 Studi in vivo	p. 44
6 Discussioni e conclusioni	p. 45
7 Bibliografia	p. 46

1. Introduzione

Il carcinoma del colon-retto rappresenta una delle più frequenti cause di morte per neoplasia nei paesi occidentali. L'età di insorgenza è più frequentemente intorno ai 60 anni. L'incidenza nei due sessi non mostra differenza per quanto riguarda la localizzazione colica, a livello rettale sembra essere più frequente nel sesso maschile. Le sedi più colpite sono il retto (50% dei casi) ed il sigma (20% dei casi). Il 70% dei pazienti si presenta alla diagnosi con malattia chirurgicamente aggradibile, il 30% con malattia metastatica; la percentuale di recidive è del 25% a tre anni.

Gli adenocarcinomi rappresentano il 95% delle neoplasie del grosso intestino.

Il tumore del colon-retto origina da cellule epiteliali del tratto gastrointestinale, che vanno incontro a mutazioni in specifiche sequenze di DNA, interferendo con i normali meccanismi di proliferazione e auto rinnovamento. Tali mutazioni, che possono derivare da aberrazioni genetiche congenite, da fumo di tabacco, da agenti carcinogeni ambientali o da stati infiammatori cronici, guidano la transizione da cellule epiteliali di colon sane ad adenoma displastico, e infine a cancro.

Le cellule staminali del tratto gastrintestinali rappresentano il bersaglio naturale di mutazioni tumorigeniche: ciò è dovuto sia alla loro lunga emivita che alla loro capacità di auto rinnovamento. L'ipotesi di tumorigenesi del tumore del colon-retto, guidata dalle cellule staminali, è confermata dalla recente identificazione e caratterizzazione fenotipica di una sottopopolazione di cellule di cancro di colon, in grado di dare inizio alla crescita tumorale e di riprodurre fedelmente il carcinoma di colon umano su topi nudi.

1.1 Cellule Staminali Adulte (SC)

Nel corso della vita i tessuti adulti vanno incontro a un massivo turnover, data la presenza di un sottoinsieme di cellule indifferenziate, dotate della capacità di autorinnovarsi. Per esempio, nell'intestino umano una popolazione di cellule intestinali staminali è responsabile della generazione di più di 10^{10} cellule differenziate ogni giorno. Nell'ultimo decennio alcuni studi hanno dimostrato che le cellule staminali risiedono anche nei tessuti adulti mitoticamente inattivi

come il cervello, in cui contribuiscono alla rigenerazione in seguito ad una lesione (Korbling ed Estrov 2003).

1.2 Cellule staminali emopoietiche

I primi studi, che hanno dimostrato l'origine tumorale da un nucleo di cellule staminali, sono stati condotti su cellule del sangue, data la loro facilità di estrazione, di purificazione e di trapianto. La leucemia mieloide cronica deriva dalla proliferazione e differenziazione aberrante di cellule staminali leucemiche, dette LSC (Bonnet e Dick, 1997). Le LSC risultano essere molto eterogenee e dotate di capacità proliferativa e di auto-rinnovamento.

Prova della staminalità delle cellule emopoietiche è data dagli esperimenti fatti su topi irradiati (Szilvassy et al., 1990). Sperimentalmente le cellule staminali emopoietiche umane, prelevate dal midollo, vengono selezionate in base all'espressione di marcatori positivi (CD34, CD133, c-Kit) e negativi (CD38, specifici del *lineage*). Queste cellule vengono iniettate in topi riceventi, su cui si eseguono saggi di ripopolamento, che permettono di identificare due popolazioni di cellule ematopoietiche staminali: le cellule progenitrici *committed*, che differenziano in uno specifico *lineage* e che garantiscono la ricostruzione a breve termine, e le cellule staminali ematopoietiche, capaci di auto-rinnovarsi e di ripopolare il sistema ematopoietico anche dopo cicli multipli di trapianto.

1.3 Cellule staminali intestinali

L'identificazione di cellule staminali intestinali è resa difficile dalla mancanza di saggi clonogenici e dalla difficoltà di identificarle, dato che sono frammiste alle cellule figlie più differenziate. Ad oggi manca un marcatore specifico ma si dispone del musashi-1, proposto da Nishimura (2003).

L'epitelio del colon ha un'organizzazione morfologica e funzionale peculiare: la proliferazione cellulare e il differenziamento avvengono lungo l'asse del villo. Le cellule staminali intestinali sono ritenute responsabili della produzione dei progenitori immaturi, che generano i tipi cellulari maturi,

chiamati enterociti, cellule endocrine e cellule a calice (Blanpain et al., 2007). Queste cellule perdono la loro capacità proliferativa e acquisiscono il loro fenotipo differenziato prima di migrare verso il lume intestinale.

Dato che le cellule differenzianti migrano dalla base della cripta verso i villi, si ritiene che le cellule staminali intestinali risiedano tra le cellule basali della cripta all'interno di una nicchia protettiva, che è composta da cellule epiteliali proliferanti e da cellule mesenchimali, che le circondano.

Una volta definito un ruolo cardine nell'omeostasi e carcinogenesi, le cripte del colon sono state oggetto di studio mediante tecniche di metilazione per comprenderne le caratteristiche biologiche.

Sono stati condotti con successo studi relativi all'identificazione di cellule staminali nel tratto gastroenterico a livello delle cripte. (Yatabe et al., 2001 e Greaves et al., 2006).

Le cellule staminali nei tessuti adulti non si dividono con lo stesso ritmo delle cellule progenitrici, dato che il ritmo di proliferazione è funzione del turnover tissutale (Cotsarelis et al., 1990): ne consegue che questo tipo di cellule staminali, in condizioni sperimentali, non contengono DNA marcato in quantità maggiori rispetto alle cellule differenziate.

Marcando il materiale genetico delle cellule proliferanti nelle cripte intestinali murine col precursore del DNA [³H]TdR, è stato possibile identificare cellule a basso indice mitotico, con conseguente limitata diluizione del marcatore (Potten et al., 2002).

Una volta definita la localizzazione delle cellule staminali intestinali, è stato possibile isolarle attraverso la dissezione mediante laser e confrontarne il profilo molecolare con la progenie differenziata circostante (Giannakis et al., 2006).

1.4 Cellule staminali tumorali

La trasformazione neoplastica è un processo che comprende l'accumulo di mutazioni e cambiamenti epigenetici. A causa della loro longevità e proprietà di auto-rinnovamento, le cellule staminali sembrano essere il bersaglio ideale dei processi carcinogenici: infatti sono maggiormente propense ad accumulare mutazioni se confrontate con cellule a breve emivita e più differenziate.

L'ipotesi più recentemente accreditata sulla formazione dei tumori è che siano generati da nuclei di cellule staminali, visto che, sebbene monoclonali in origine, la maggior parte dei tumori mostra un marcato grado di eterogeneità morfologica e funzionale (Happner et al., 1984).

Questo suggerisce che un tumore non deriverebbe soltanto da un'espansione monoclonale di una cellula maligna ma piuttosto da una cellula trasformata, capace di generare una progenie di cellule eterogenee, che possono andare incontro a differenziamento e che sono dotate di un'elevata capacità proliferativa.

Sono stati proposti due modelli per spiegare lo sviluppo tumorale: il “modello scolastico”, secondo cui ogni cellula tumorale ha la capacità di proliferare e rigenerare il tumore, per cui, popolazioni discrete di cellule tumorali, una volta isolate, avrebbero la capacità di dare origine a un tumore se impiantate, e il “modello delle cellule staminali tumorali”, che prevede nella neoformazione maligna un numero ristretto di cellule capaci di iniziare e sostenere la crescita tumorale, per cui se sperimentalmente venisse iniettato un numero esiguo di cellule tumorali difficilmente verrebbe a formarsi una massa tumorale.

Dato che numerosi studi dimostrano che queste cellule staminali sono dotate di auto-rinnovamento, di differenziamento e di proliferazione, è possibile chiamarle “cellule staminali tumorali” (CSC).

Probabilmente le CSC derivano dalla trasformazione di cellule staminali normali del tessuto corrispondente, o verosimilmente risultano da mutazioni, che possono avvenire in fase di amplificazione mediante riarrangiamenti genici.

Le CSC esprimono il CD133 che è marker di staminalità (Shmelkov et al., 2005).

In questi ultimi anni le CSC sono state isolate da diversi tumori solidi, quali ad esempio l'adenocarcinoma prostatico, il melanoma e il carcinoma epatico.

Recentemente sono state identificate CSC a livello dell'adenocarcinoma di colon-retto (Ricci-Vitiani et al. 2007 e O'Brien et al. 2007). Queste cellule sono state definite CC-IC, ovvero cellule inizianti il cancro del colon e sono CD133⁺. Normalmente il colon esprime un numero esiguo di cellule CD133⁺ ma l'aumentata espressione orienta verso la malignità. Le CC-IC, se impiantate sottocute in topi nudi, sono in grado di riprodurre il tumore originale. Studi simili sono stati condotti anche su tumori cerebrali (Vescovi et al, 1999) e mammari (Al-Hajj et al., 2003; Singh et al., 2003).

1.5 Le Sfere tumorali

Le cellule staminali tumorali, se messe in coltura in condizioni di indifferenziamento, quindi in assenza di siero e con aggiunta di fattori mitogeni, quali EGF e bFGF, tendono a crescere in sospensione e ad aggregarsi in sfere dette “ sfere tumorali”, che hanno un aspetto molto simile alle ben conosciute neurosfere (Fig. 1). Questi aggregati cellulari tendono ad organizzarsi in diversi livelli e possono avere forma sferica regolare e irregolare. Le cellule disposte nello strato più esterno possono occasionalmente presentare dei processi citoplasmatici. Caratteristica è la loro eterogeneità: le cellule che compongono le sfere tumorali presentano differenze nelle dimensioni, nel contenuto citoplasmatico, nel metabolismo, e possono trovarsi in diverse fasi del ciclo cellulare. Le differenze metaboliche possono essere correlate alla loro localizzazione, in quanto le cellule disposte negli strati più superficiali della sfera hanno un più facile accesso ai nutrienti presenti nel mezzo di coltura. Si riscontrano, infatti, intense attività cellulari negli strati più periferici delle sfere e zone di apoptosi, necrosi e bassissima attività trascrizionale nelle cellule degli strati più interni, dove gli scambi metabolici sono difficili e le cellule appaiono scure.(Bez et al., 2003).

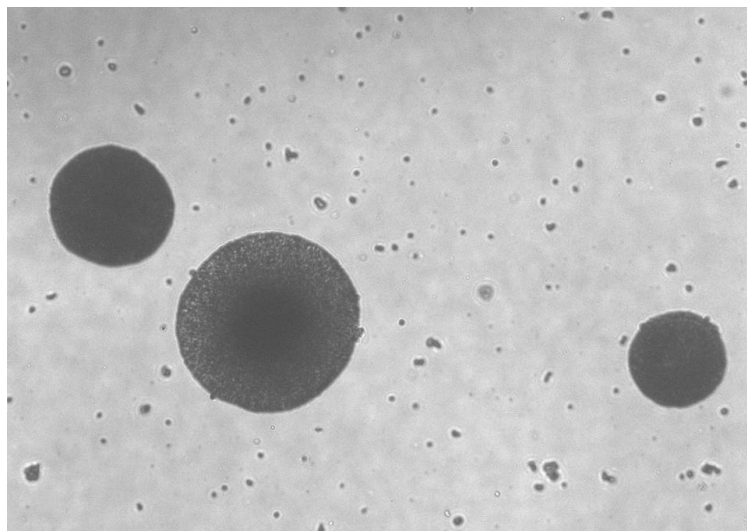


Fig. 1 Sfere tumorali

1.6 La trasmissione Glutammatergica

L'aminoacido L-glutammato è il principale neurotrasmettitore di tipo eccitatorio del sistema nervoso centrale (SNC). Il glutammato interagisce con due tipi di recettori classificati in base al diverso meccanismo di trasduzione del segnale in:

- Recettori ionotropici, che formano canali di membrana permeabili a ioni Na^+ e Ca^{2+} . L'attivazione dei recettori ionotropici media la trasmissione eccitatoria rapida nel sistema nervoso centrale.
- Recettori metabotropici, che sono accoppiati a proteine G. Il ruolo di questi recettori è modulare la trasmissione sinaptica o promuovere meccanismi di plasticità cellulare attraverso la produzione di secondi messaggeri

La neurotrasmissione glutammatergica svolge un ruolo importante in molti processi fisiologici e patologici del SNC, tra cui la trasmissione eccitatoria rapida, la plasticità sinaptica, i meccanismi di apprendimento e memoria, la coordinazione motoria ed alcuni fenomeni di neurotossicità. Importanti circuiti neuronali utilizzano sinapsi glutammatergiche in cui la trasmissione del glutammato è implicata in eventi fisiologici correlati alla sinaptogenesi, alla sopravvivenza neuronale nelle prime fasi dello sviluppo, a meccanismi riparativi dopo lesione ed a fenomeni di plasticità sinaptica nell'adulto. Inoltre, l'interazione del glutammato con i suoi recettori è alla base della cascata di eventi che inducono degenerazione neuronale in seguito a fenomeni di tipo ischemico, ipoglicemico o traumatico (Choi, 1988, Beall 1992). E' l'eccessivo rilascio di glutammato che causa il danno cerebrale. Numerose evidenze sperimentali indicano, inoltre, il coinvolgimento del sistema glutammatergico nella patogenesi di alcune malattie neurodegenerative croniche quali il morbo di Parkinson, la malattia di Alzheimer e la corea di Huntington. I recettori del glutammato, sia quelli ionotropici che quelli metabotropici, sono implicati quindi in una serie di processi molto importanti sia dal punto di vista fisiologico che patologico.

1.7 Recettori ionotropici del Glutammato

Similmente agli altri recettori ionotropici attivati da ligando, anche i recettori per il glutammato sono costituiti da diverse subunità che si assemblano a formare un canale ionico. Si ritiene che il canale sia formato dall'assemblaggio di quattro subunità, e che la diversa combinazione delle subunità conferisca le differenti proprietà funzionali dei recettori. Tali recettori sono stati distinti in tre classi in base alle loro caratteristiche farmacologiche:

- a) recettori AMPA (attivati dall'acido α amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazol propionico);
- b) recettori Kainato; (attivati dall'acido Kainico)
- c) recettori NMDA (attivati dall'acido N-metil-D-aspartico).

L'analisi di idrofobicità ha indicato che ogni subunità dei recettori ionotropici presenta 4 domini transmembrana; (TM1-TM4), un dominio N-terminale extracellulare ed un dominio C-terminale intracellulare. Sono stati proposti vari modelli di topologia, il più accreditato è quello in cui la regione transmembrana TM2 potrebbe non essere una classica α -elica transmembrana ma potrebbe ripiegarsi verso il citoplasma a formare un'ansa.

a) I recettori AMPA

I recettori AMPA si trovano nella maggior parte delle sinapsi eccitatorie, ne mediano la neurotrasmissione rapida e coesistono spesso con i recettori NMDA. Sono caratterizzati da una cinetica rapida di attivazione e inattivazione, e da una bassa permeabilità ai cationi bivalenti. I recettori AMPA sono formati dall'assemblaggio di quattro subunità, indicate come GluR-A/GluR-D oppure GluR-1/GluR-4 (Hollmann & Heinemann, 1994), costituite da 850-950 aminoacidi ed omologhe per circa il 70%. In realtà, però, per nessuno dei recettori ionotropici per il glutammato si conosce con certezza il numero e il tipo di subunità che li compongono. La maggior parte delle informazioni elettrofisiologiche e molecolari sono state ottenute su recettori ricombinanti. Questi studi hanno dimostrato che caratteristiche distintive dei recettori AMPA, come la permeabilità al Ca^{2+} e le proprietà di desensitizzazione e/o inattivazione, dipendono dalla composizione delle subunità (Hollmann et al., 1991, Burnashev et al., 1992, Burnashev 1993; Mosbacher et al., 1994). E' ormai certo, ad esempio, che la presenza della subunità GluR-B (o GluR2) determina una bassa permeabilità al Ca^{2+} . Infatti, tutte le cellule che *in vivo* esprimono la subunità GluR-B presentano recettori AMPA con una bassa permeabilità al Ca^{2+} mentre neuroni privi di questa subunità, come le cellule del Purkinje, presentano, invece, recettori AMPA dotati di un'alta permeabilità a questo catione. La permeabilità al Ca^{2+} è modulata negativamente dalla presenza del residuo aminoacidico

arginina (R) nella seconda regione transmembranale (TM2) della subunità GluR-B. Al contrario, nelle altre tre subunità la stessa posizione è occupata dall'aminoacido glutammina (Q) (Hume et al., 1991). Questa posizione critica per la permeabilità dei canali AMPA è stata denominata sito Q/R. La presenza del residuo di arginina nel sito Q/R della subunità GluR-B non può essere dedotta dalla sequenza del gene; infatti, la sequenza genica della subunità GluR-B presenta, come le altre subunità, il codone CAG per l'aminoacido glutammina, mentre l'RNA messaggero presenta il codone CGG per l'arginina (Sommer et al., 1991). Questa discrepanza è stata risolta con la dimostrazione che un singolo nucleotide dell' RNA della subunità GluR-B è modificato attraverso un meccanismo di "RNA editing" (Higuchi et al., 1993). Nel cervello adulto, dunque, la subunità GluR-B è presente solo nella forma modificata post-trascrizionalmente: la forma non modificata è presente solo per lo 0.01%, che è una percentuale irrilevante. Ciò sta a significare che la maggior parte dei neuroni esprime la subunità GluR-B contenente l'aminoacido arginina nel sito Q/R che partecipa alla formazione di recettori AMPA non permeabili al Ca^{2+} .

b) I recettori KAINATO

L'acido kainico è una potente neurotossina che ha proprietà di agonista per alcuni sottotipi dei recettori per il glutammato. Il kainato attiva una corrente non-desensitizzante, quando si lega con i recettori AMPA, e una desensitizzante rapida, quando interagisce con una sottofamiglia di recettori ad alta affinità (KA1, KA2, GluR-5, -6, -7).

I recettori ad alta affinità per il kainato presentano una limitata omologia di sequenza con gli altri recettori per il glutammato clonati e risultano 50 volte meno abbondanti rispetto ai recettori AMPA nel cervello. Studi di distribuzione delle 5 subunità rivelano l'espressione di questi recettori in tutte le regioni cerebrali, suggerendo che i recettori per il kainato potrebbero essere coinvolti in tutti i circuiti glutammatergici, benché il loro ruolo non sia stato del tutto chiarito. Se espresse in sistemi eterologhi, le subunità KA1 e KA2 non danno origine ad omo-oligomeri funzionali; tuttavia se co-espresse con le subunità GluR-5 o GluR-6, le subunità KA1 e KA2 conferiscono ai canali proprietà elettrofisiologiche diverse da quelle degli stessi omomerici (Herb et al., 1992). Qualora la subunità GluR7 venga espressa in oociti di *Xenopus*, non dà luogo a correnti misurabili (Bettler et al., 1992, Lomeli et al., 1992). Tuttavia tale subunità forma canali in cellule HEK attivate da concentrazioni di kainato o glutammato superiori ai 10 mM (Schiffer et al., 1997). Anche queste subunità sono sottoposte al processo di RNA editing nel sito Q/R.

c) I recettori NMDA

I recettori NMDA differiscono dagli altri recettori ionotropici per il glutammato, in quanto, in condizioni di riposo della membrana post-sinaptica, l'applicazione dell'agonista NMDA o del glutammato non è in grado di attivare da sola il canale. Infatti, il recettore NMDA è, fisiologicamente inibito dagli ioni Mg^{2+} che risiedono nel poro del canale. Solamente quando la membrana post-sinaptica viene depolarizzata, verosimilmente attraverso l'interazione del glutammato con recettori AMPA vicini, il blocco da Mg^{2+} viene rimosso e il canale può condurre correnti ioniche. Per la loro attivazione, i recettori NMDA richiedono, quindi, la simultanea attività pre-sinaptica (rilascio di glutammato) e post-sinaptica (depolarizzazione indipendente della membrana post-sinaptica). Così, i recettori NMDA sono canali attivati da ligando e contemporaneamente voltaggio-dipendenti e, per tale proprietà, sono stati definiti come sensori dell'attività sincrona delle cellule pre- e post-sinaptiche ("coincidence detector").

Un altro fattore limitante l'attivazione dei recettori NMDA è il legame ad un sito allosterico della glicina, che potenzia l'interazione glutammato-recettore che, in assenza di glicina, non è in grado di far passare correnti ioniche. Pertanto la glicina può essere considerata un cotrasmettitore con un ruolo regolatorio per i recettori NMDA (Thomson, 1989).

I recettori NMDA sono caratterizzati da una cinetica di attivazione lenta, se comparata a quella dei recettori AMPA, e da un lungo tempo di attivazione in presenza dell'agonista (Mayer & Westbrook, 1987). Il canale NMDA è altamente permeabile al Ca^{2+} , oltre che al Na^+ e K^+ . Il rapporto permeabilità $Ca^{2+}: K^+$ è circa 10: 1. L'influsso di Ca^{2+} attraverso il recettore NMDA è alla base di numerosi processi, sia fisiologici che patologici. I recettori NMDA svolgono un ruolo importante nel promuovere l'incremento dell'efficacia sinaptica in alcune regioni cerebrali, processo chiamato "long term potentiation" (LTP), che è alla base di fenomeni di plasticità sinaptica a lungo termine, come apprendimento e memoria (Bliss & Collingridge, 1993). D'altra parte, una eccessiva attivazione di questi recettori e il conseguente influsso di Ca^{2+} può causare morte neurale per eccitotossicità (Choi, 1988).

Dal punto di vista molecolare, i recettori NMDA sono costituiti dall'assemblaggio di due tipi di subunità: la NMDA-R1 (NR1), espressa virtualmente in tutti i recettori NMDA, e 4 NMDA-R2 (NR2A, B, C, D), codificate da geni diversi e selettivamente espresse in alcune aree cerebrali.

1.8 I Recettori metabotropici del Glutammato (mGluR)

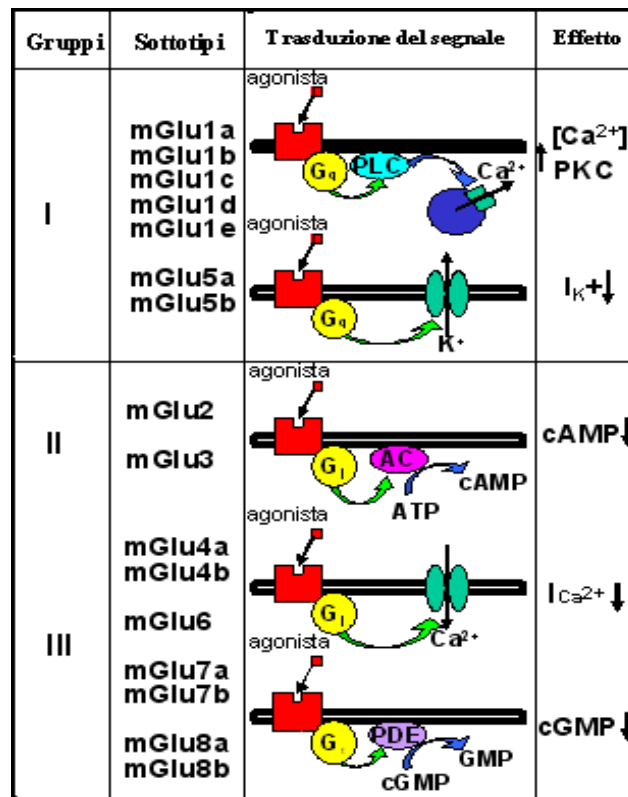


Fig. 2 I recettori metabotropici del glutammato

Elemento essenziale, affinché un neurotrasmettitore possa essere considerato metabotropico, è la possibilità di agire in maniera indiretta sulla conduttanza di membrana mediante un processo di reazioni chimiche, contrapposta, dunque, all'apertura di un canale ionico. Si deve a Sugiyama (1987) la prima associazione del termine metabotropico ai recettori per il glutammato accoppiati a proteine G. In seguito, il concetto di trasmissione metabotropica è stato esteso anche ad altri recettori strutturalmente correlati (GABA-B).

Sono stati identificati otto sottotipi recettoriali distinti in tre gruppi, in base all'omologia di sequenza (circa il 70% nello stesso gruppo, 45% tra gruppi diversi), i meccanismi di trasduzione e il profilo farmacologico (Fig.2).

Gruppo I: sottotipi mGlu1 e mGlu5,

Gruppo II: sottotipi mGlu2 e mGlu3,

Gruppo III: sottotipi mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8

I recettori metabotropici per il glutammato (mGluR) appartengono alla superfamiglia di recettori accoppiati alle proteine G eterotrimeriche (G_q , G_o , G_i) legate a diversi sistemi effettori (fosfolipasi C, adenilato ciclasi, canali ionici). Rispetto ai classici recettori metabotropici accoppiati a proteine G, questi, pur presentando 7 domini transmembrana, presentano dimensioni maggiori (Nakanishi, 1992). Analogamente ad altri recettori accoppiati a proteine G, i recettori metabotropici per il glutammato sono glicoproteine, costituite da sette domini idrofobici transmembrana (TM), che ancorano la proteina alla membrana plasmatica, da due sequenze aminoacidiche carbossi e ammino terminale, che si trovano rispettivamente nel citoplasma e nello spazio extracellulare, e da un insieme di tre segmenti di congiunzione (loop) extracellulari e intracellulari alternati che si susseguono collegando tra loro i diversi domini.

Tutti i sottotipi di recettori metabotropici si caratterizzano per un segmento ammino-terminale di circa 560 aminoacidi. Studi di delezione genica hanno dimostrato che i due terzi di tale porzione, che costituiscono il dominio omologo LIVBP, rappresentano il sito deputato al riconoscimento ed al legame del glutammato. E' stato proposto un modello di struttura tridimensionale in cui il sito di legame per il glutammato si trova all'interno di una "gola", formata da due domini globulari.

Alcuni sottotipi di recettori metabotropici esistono in forma dimerica in condizioni non riducenti e, pur non essendo ancora nota la posizione dei residui di cisteina coinvolti, si pensa che la dimerizzazione si realizzi a livello della porzione ammino-terminale attraverso la formazione di ponti disolfuro (Moroni et al., 1996, Romano et al. 1996;1998). Nei recettori metabotropici il primo ed il terzo loop intracellulare sono altamente conservati, mentre la sequenza carbossi-terminale varia di lunghezza e non è conservata tra i diversi sottotipi. L'interazione non-covalente con le proteine G coinvolge principalmente il secondo loop intracellulare. Questo loop è poco conservato tra i diversi sottotipi recettoriali ed è ricco in aminoacidi basici che sono essenziali per l'interazione con le proteine G.

Diverse regioni della proteina recettoriale potrebbero costituire siti "target" per la modulazione farmacologica di specifici recettori. Sono state progettate e sintetizzate nuove molecole che agiscono tramite meccanismi di tipo competitivo e non competitivo (allosterico). La farmacologia degli agonisti dei recettori mGlu è stata studiata in preparazioni native (aree cerebrali o colture neurali) ed in linee cellulari esprimenti sottotipi di recettori mGlu ricombinanti umani e di ratto (Schoepp et al., 1999).

Recettori metabotropici del gruppo I

Gruppo I: sottotipi mGlu1 e mGlu5

mGlu1 e mGlu5 sono localizzati nelle porzioni periferiche delle densità post-sinaptiche, e contribuiscono alla plasticità sinaptica, alla coordinazione motoria e alla formazione della Long Term Potentiation (LTP)

Trasduzione del segnale

La stimolazione di cellule nervose di vari preparati con agonisti glutammatergici produce un rilevante aumento dell'idrolisi dei polifosfoinositidi (PPI) di membrana. L'interazione dell'agonista con i recettori di membrana del Gruppo I comporta l'attivazione della fosfolipasi C, enzima che catalizza l'idrolisi del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP₂) con liberazione di inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) e di diacilglicerolo (DAG). Entrambe le molecole si comportano da secondi messaggeri e promuovono la cascata degli eventi intracellulari lungo due diversi percorsi: l'IP₃ agisce sui calciosomi, porzioni specializzate del reticolo endoplasmatico liscio, mobilizzando i depositi di Ca²⁺ e aumentando le concentrazioni citosoliche dello ione; il DAG agisce con la fosfatidilserina e il Ca²⁺ per attivare la proteina chinasi C.

Esistono profonde differenze tra i recettori mGlu1 e mGlu5: il recettore mGlu1-a è sensibile alla tossina della pertosse ed è perciò accoppiato ad una proteina G di tipo G₀; il recettore mGlu5 è insensibile alla tossina della pertosse e quindi interagisce con la proteina G_q (Pickering et al., 1993). Inoltre, il recettore mGlu5, in cellule HEK293 o in cellule CHO, promuove il rilascio dello ione Ca²⁺ con una cinetica di tipo oscillatorio, mentre il recettore mGlu1-a produce una risposta a picco singolo ("single-peak"). Mediante il coinvolgimento di proteine GTP-dipendenti, i recettori mGlu1 (più precisamente gli 1-a, possono anche accoppiarsi a canali ionici permeabili allo ione K⁺, tra cui i canali Ca²⁺-dipendenti AHP "outward-rectifiers", che sono responsabili dell'iperpolarizzazione postuma e del fenomeno dell'accomodazione del potenziale d'azione. (Pickering et al., 1993). Elevati livelli di mRNA dei recettori mGluR1 sono stati riscontrati in molte aree del SNC, incluso il cervelletto, l'ippocampo, il bulbo olfattivo ed il talamo. Tecniche immunocitochimiche hanno evidenziato la presenza dei recettori mGlu1-a nei corpi e nei dendriti delle cellule del Purkinje. Un'elevata espressione di recettori mGlu5 è stata localizzata nello striato, minori quantità si trovano, invece, nel cervelletto e nella regione ponto-midollare (Baskys, 1994).

Sembra che i recettori mGlu del gruppo I siano localizzati alla periferia della membrana post-sinaptica e perciò attivabili solo dagli elevati livelli di glutammato caratteristici delle condizioni di

iperattività. È generalmente accettata l'importanza dei recettori del gruppo I nell'amplificare l'eccitabilità neuronale (Nicoletti et al., 1996).

Agonisti recettoriali

Agonisti non selettivi del gruppo I

L'acido quisqualico (Quis) rappresenta in assoluto la prima molecola individuata come agonista dei recettori mGlu associati all'idrolisi dei polifosfoinositidi, in quanto mostra un'elevata potenza e selettività di legame, sia verso i recettori nativi sia verso i ricombinanti. Il suo impiego è limitato all'attività di agonista sui recettori AMPA.

Agonisti selettivi dei recettori metabotropici del gruppo I

La 3,5-diidrossifenilglicina (3,5-DHPG) è il primo agonista selettivo per i recettori del gruppo I ad essere stato sintetizzato e non ha attività sui recettori del gruppo II o III.

Antagonisti recettoriali

Antagonisti selettivi dei recettori metabotropici del gruppo I

Recente è la sintesi di molecole analoghe alla carbossifenilglicina (4-CPG), come l'MCPG (α -metil-4-carbossifenilglicina) e la 4-C-3-HPG (4-carbossi-3-idrossifenilglicina), che si comportano da antagonisti competitivi dei recettori mGlu1 e, con minore affinità, dei recettori mGlu5. Questi composti sono, tuttavia, in grado di interagire con i recettori metabotropici del secondo gruppo (mGlu2 e -3). La 4C3HPG agisce da agonista, mentre l'MCPG come antagonista dei recettori mGlu2 e -3.

Allo scopo di migliorare la selettività dei derivati della fenilglicina nei confronti dei sottotipi recettoriali del primo gruppo, sono state realizzate opportune sostituzioni sulla struttura della 4CPG: il risultato è un analogo metilico, il composto LY367385 (2-metil-4-carbossifenilglicina), che si comporta come un antagonista selettivo dei recettori mGlu1 e non interagisce con i recettori del gruppo II.

Antagonisti selettivi non competitivi dei recettori metabotropici del gruppo I

Tra gli antagonisti che agiscono mediante meccanismo non competitivo, l'estere etilico dell'acido 7-(idrossiimino) ciclopropan[b]cromen-1a-carbossilico (CPCCOEt) esibisce elevata potenza e selettività nei confronti dei recettori mGlu1

Alcuni derivati fenilpiridinici esibiscono un'elevata potenza e selettività come antagonisti non-competitivi dei recettori mGlu5. Tra questi, i composti 2-metil-6-feniletinilpiridina (MPEP), 6-metil-2-fenilazopiridin-3-olo (SIB-1757) e 2-metil-6-stiril-piridina (SIB-1893) sono attualmente utilizzati per studiare gli effetti dell'attivazione endogena dei recettori mGlu5 (Schoepp et al., 1999).

Recettori metabotropici del gruppo II

Gruppo II: sottotipi mGlu2 e -mGlu3

Gli mGlu2 e mGlu3 sono prevalentemente presinaptici, si ritrovano nella glia radiale dove sono in grado di stimolare un ruolo neuroprotettivo attivando anche la produzione di fattori neurotrofici; inoltre si ritrovano in colture di cellule di glioma prelevate da tessuto bioptico.

Trasduzione del segnale

I recettori metabotropici del secondo gruppo (mGlu2 e mGlu3) sono accoppiati alla proteina G_i , sensibile alla tossina della pertosse, che media la trasduzione del segnale inibendo l'adenilato ciclasi e quindi la sintesi dell'adenin-monofosfato ciclico (AMPc). I recettori mGlu2 sono anche accoppiati negativamente a canali per il Ca^{2+} voltaggio-dipendenti: canali VOC di tipo L, N, P o Q (Tanabe et al., 1992). Si ritiene che i recettori metabotropici del gruppo II e III modulino la neurotossicità da amminoacidi eccitatori attraverso un meccanismo di inibizione pre-sinaptica (Nicoletti et al. 1996, Flor et al., 1998).

Agonisti recettoriali

I recettori mGlu2 e mGlu3 esibiscono un simile profilo farmacologico in virtù della loro elevata omologia strutturale.

Agonisti non selettivi dei recettori metabotropici del gruppo II

L'1S,3R-ACPD è in grado di attivare i recettori mGlu2 e mGlu3 ma anche i sottotipi del primo gruppo. Tale composto si comporta anche come substrato della glutammina sintetasi, l'enzima astrocitario che converte il glutammato in glutammina. Altri agonisti dei recettori del secondo gruppo sono una serie di derivati fenilglicinici, quali la 4CPG, la 4C3HPG, la 3H4CPG e la 3HPG.

Agonisti selettivi dei recettori metabotropici del gruppo II

Alcuni composti, sintetizzati di recente, hanno mostrato la più elevata selettività e potenza nei confronti dei recettori metabotropici del gruppo II. La sostituzione del gruppo metilenico in posizione C4 dell' ACPD con una funzione aminica ha prodotto il composto 2R, 4R-4-aminopirrolin-2,4-dicarbossilico (2R, 4R-APDC). Tale composto, dotato di affinità nanomolare nei confronti dei recettori mGlu2 e mGlu3, è oggi considerato l'agonista più selettivo dei recettori metabotropici del secondo gruppo. Alcuni composti biciclici sintetizzati dai laboratori della Eli Lilly (LY354740, LY379268 ed LY389795) sono tra i più potenti agonisti dei recettori metabotropici mGlu2 e mGlu3. Tali composti sono biodisponibili per via orale e, dunque, offrono notevoli vantaggi nello studio dei recettori metabotropici in modelli *in vivo*. Il composto LY354740 è attualmente sottoposto a trials clinici come farmaco ansiolitico.

Antagonisti recettoriali

Uno dei primi composti identificati come antagonisti per i recettori del gruppo II è l'MCPG; la sua azione non è però selettiva, perchè tale composto si comporta da antagonista nei confronti di recettori mGlu del primo e terzo gruppo. Il DCG-IV, agonista dei recettori del secondo gruppo, si comporta anche come debole antagonista dei sottotipi del gruppo III e del gruppo I; ciò ne ha limitato l'impiego in studi farmacologici (Schoepp et al., 1999).

Recettori metabotropici del gruppo III

Gruppo III: sottotipi mGlu4, mGlu, mGlu7 e mGlu8

I sottotipi mGlu4, mGlu7 e mGlu8 sono presinaptici; i recettori mGlu6 sono localizzati esclusivamente sulle cellule ON bipolari della retina

Traduzione del segnale

I sottotipi mGlu4, mGlu7 e mGlu8 sono accoppiati a proteina Gi e inibendo l'adenilato ciclasi sono in grado di inibire sia il rilascio di glutammato che di GABA ed hanno bisogno, a differenza dei recettori del gruppo II, di piccole quantità di neurotrasmettitore per essere attivati. Insieme ai recettori di gruppo II modulano la neurotossicità di amminoacidi eccitatori attraverso un meccanismo di inibizione pre-sinaptica. Il sottotipo mGlu6 appartenente allo stesso gruppo è accoppiato invece alla proteina Gt (trasdudina) che nelle cellule ON bipolari della retina partecipa all'amplificazione del segnale visivo.

Agonisti recettoriali

La farmacologia dei recettori del gruppo III (recettori mGlu4, mGlu6, mGlu7 ed mGlu8) è stata solo parzialmente caratterizzata. Due analoghi del glutammato, l'acido L-2-amino-4-phosphonobutanoico (L-AP4) e la L-serina-O-fosfato (L-SOP), riducono il rilascio di acido glutammico dai terminali attraverso un meccanismo presinaptico. E' oggi noto che tale effetto è mediato dai sottotipi mGlu4, mGlu7 ed mGlu8.

Agonisti dei recettori metabotropici del gruppo III

Il più potente agonista dei recettori del gruppo III (con elevata affinità nei confronti dei recettori mGlu4, mGlu6 ed mGlu8) è l'L-AP4, derivato dall'acido glutammico per sostituzione isosterica del gruppo α -carbossilico con l'acido fosfonico. La L-serina-O-fosfato è un composto endogeno, prodotto dall'idrolisi della fosfatidilserina, che si accumula nel parenchima cerebrale di soggetti affetti da malattia di Alzheimer. Tale composto agisce da agonista pieno nei confronti dei recettori del gruppo III e, in particolare, nei confronti dei recettori mGlu4, mGlu6 ed mGlu8 con potenza simile a quella del glutammato.

Antagonisti recettoriali

Un analogo di DHPG con un ulteriore gruppo idrossilico legato al fenile in posizione 4, l'(R,S) - 3,4,5-triidrossifenilglicina (THPG), è capace di antagonizzare l'azione dell'L-AP4 nelle cellule bipolari ON della retina, un effetto mediato dai recettori mGlu6. Il DCG-IV, come già menzionato in precedenza, agonista dei recettori del secondo gruppo, si comporta anche come debole antagonista dei sottotipi del gruppo III e del gruppo I.

2. Scopo del lavoro

Il carcinoma del colon-retto rappresenta una delle più frequenti cause di morte per neoplasia nei paesi occidentali. Gli adenocarcinomi costituiscono il 95% delle neoplasie del grosso intestino.

Il quadro istologico macroscopico è caratterizzato da lesioni ampie, irregolari, infiltranti, con numerose componenti emorragiche, alternate ad aree di trombosi e necrosi (Fig.3a). Microscopicamente sono evidenti l'iper cellularità, l'ipercromatismo, il pleomorfismo e la presenza di cellule atipiche (Fig.3b).

La terapia chirurgica è di prima scelta, seguono la radioterapia e la chemioterapia adiuvanti che spesso risultano inefficaci data la farmacoresistenza. Il 5 Fluoro-uracile (5-FU) è il farmaco di prima scelta che può essere associato con l'acido folinico in quanto sembra aumentarne la tossicità; gli altri farmaci usati sono l'irinotecan e l'oxaliplatino.

Recentemente diversi lavori evidenziano l'esistenza in diverse neoplasie, ad esempio quelle del sistema ematopoietico e di tumori solidi, come glioblastomi e adenocarcinoma di colon-retto, di una popolazione di cellule staminali tumorali che, proliferando e differenziando in maniera abnorme, danno origine e sostengono la proliferazione della neoplasia.

Questa popolazione di cellule risulta particolarmente resistente alle terapie convenzionali.

Scopo del lavoro è stato studiare il ruolo del recettore mGlu2/3 nelle cellule staminali di cancro, ottenute da prelievi biotipici di adenocarcinoma di colon. I risultati di questi studi potrebbero fornire la base per l'individuazione di possibili target farmacologici da impiegare in terapie antitumorali, miranti ad inibire la proliferazione e il differenziamento tumorale.

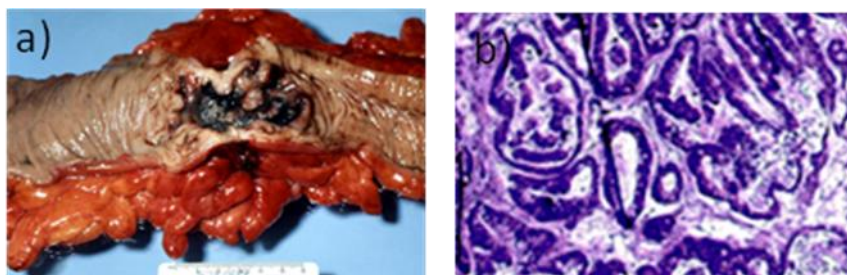


Fig. 3 Anatomia patologica di adenocarcinoma di colon-retto

3. Materiali e Metodi

Per valutare l'espressione del recettore mGlu2/3 nelle cellule staminali tumorali CD133⁺ derivanti da prelievo biotico umano di adenocarcinoma di colon le cellule sono state messe in coltura in condizioni indifferenziate, in presenza di fattori mitogeni (EGF 20 ng/ml e bFGF 10 ng/ml). Dopo diversi passaggi in coltura le cellule, sono state trattate con buffer di lisi, per estrarre le proteine da utilizzare per l'analisi Western Blot. È stato usato il Trizol[®] per estrarre l'RNA messaggero, attraverso cui è stato sintetizzato il cDNA che è analizzato mediante tecnica PCR per verificare la presenza dei geni del recettore mGlu.

Per comprendere in che modo i recettori mGlu di secondo gruppo influenzino la risposta delle cellule staminali CD133⁺ derivanti da adenocarcinoma di colon ai chemioterapici più utilizzati nella pratica clinica (5-Fluoro-uracile e irinotecan), queste cellule sono state trattate farmacologicamente in associazione con l'agonista selettivo LY379268, (-)-2-oxa-4aminobicyclo[3.1.0.]esano-4,6dicarbossilato, e con l'antagonista LY341495, acido 2s-2-amino-2- (1s, 2s - 2- carbossicicloprop-1-1) -3(xant-9- il) propanoico. Sulle cellule così trattate è stato eseguito un saggio di sopravvivenza cellulare per valutare un eventuale sinergismo farmacologico.

3.1 Coltura di cellule staminali tumorali

Sono state allestite, secondo le linee guida dettate dalla WHO, colture di cellule staminali tumorali CD133⁺ derivanti dai prelievi biotici di quattro pazienti con diagnosi di adenocarcinoma di colon-retto. Il tessuto è stato posto in un dish contenente DMEM F12 arricchito e sottoposto ad omogeneizzazione mediante tagli verticali di bisturi. In seguito sono stati eseguiti ulteriori procedimenti per la dissociazione meccanica delle cellule come passare varie volte l'omogeneizzato ottenuto con pasteur di vetro di lume sempre più ristretto. La sospensione così ottenuta è stata centrifugata per 3' a 1000 rpm e lasciata per 1h in ghiaccio. Dopo aver eliminato il surnatante (composto da detriti cellulari e da terreno) le cellule, visibili come pellet, sono state risospese in una falcon con 15 ml di mezzo per la proliferazione: DMEM-F12 (1:1) contenente Glucosio 30%, Hepes, Eparina, Hormon mix, BSA (Sigma), Penicillina e Streptomicina (Sigma) 1:200, con l'aggiunta di fattori di crescita quali human recombinant EGF (Sigma) 20 ng/ml e human

recombinat bFGF (Sigma) 10ng/ml. La sospensione è stata trasferita in una flask da coltura (Falcon) 75cm² e posta in un incubatore a 37°C che permette la crescita delle cellule e la loro aggregazione in "sfere tumorali". Dopo una settimana, le cellule della coltura primaria sono state raccolte in un tubo falcon, centrifugate, dissociate meccanicamente e poste nelle medesime condizioni di coltura adottate precedentemente. Questo passaggio viene effettuato per eliminare i precursori che si dividono lentamente e permettere una più rapida espansione della coltura in cui si ritrovano sfere tumorali secondarie.

Al fine di espandere la popolazione cellulare iniziale, sono stati effettuati passaggi seriali delle cellule in coltura ogni 2-3gg. Queste cellule così coltivate, senza siero e con fattori mitogeni, sono sfere immunopositive per CD133 marcatore di staminalità.

3.2 Crioconservazione e Scongelamento

Le cellule staminali CD133⁺ derivanti da adenocarcinoma di colon possono essere crioconservate in qualunque stadio di proliferazione senza perdere la loro potenzialità. Le cellule sono state raccolte e centrifugate a 1000 rpm per 10 minuti. Ottenuto il pellet, si è proceduto ad un lavaggio con terreno di crescita fresco e successivamente le cellule sono state risospese nello stesso medium, contenente il 10% di un agente crioprotettivo (DMSO), fino a raggiungere una concentrazione di $1,5 \cdot 10^6$ in circa 3 ml di terreno-DMSO e conservate in provette specifiche per la crioconservazione. In seguito le provette sono state sottoposte ad un processo di congelamento in un congelatore a discesa di temperatura controllata, che permette un graduale abbassamento della temperatura. Infine, sono state poste in azoto liquido. Nel caso si volesse riutilizzarle, dovranno essere scongelate ponendole ad una temperatura di 37°C, trasferite in una falcon da 15 ml e recuperate mediante centrifugazione a 1000 rpm per 10' in 10ml di mezzo per la proliferazione. Al termine della centrifugazione il surnatante dovrà essere aspirato lasciandone solo 100 µl, risospeso il pellet e posto in una flask da 75 cm² con 15 ml di mezzo addizionato dei fattori di crescita. Le cellule cresceranno in sospensione ed in seguito potranno essere analizzate secondo le procedure sperimentali necessarie per il lavoro di ricerca.

3.3 Estrazione e Dosaggio Proteico

Le cellule sono state recuperate, centrifugate per 10' a 800rpm e successivamente trattate con Buffer di Lisi (Tris a PH 7.5 0.1M, NaCl 0.5M, EDTA 0.5M, PMSF 0.1M, Triton 100x, β -Gliceraldeide 1x, Apoprotinina 1:1000, Leupeptina1:1000). Una volta sonicate sono state messe in ghiaccio per 40' e centrifugate per 5'a 1400 rpm a 4°C. Questo procedimento ha permesso di separare tutto il materiale proteico presente nelle cellule, il surnatante, dividendolo dagli scarti cellulari, il pellet. A questo punto sono stati preparati i campioni per l'analisi allo spettrofotometro con l'intento di individuare la concentrazione proteica presente in ognuno di essi. È stata preparata la "Mix" per la colorazione: 800 μ l di acqua e 200 μ l di protein assay (Bio-rad), e messo in una cuvetta 998 μ l della mix e 2 μ l dei campioni da misurare. Dopo aver calibrato lo strumento si è proceduto alla lettura dell'assorbanza di ogni campione in analisi a 595 nm. Registrato il valore dell'assorbanza del campione, lo strumento calcola in automatico la concentrazione proteica in 2 μ l. I campioni sono stati conservati alla temperatura di -20°C fino al momento dell'utilizzo.

3.4 Analisi Western Blot

Il contenuto proteico delle cellule staminali CD133⁺ derivanti da adenocarcinoma di colon cresciute in sospensione è stato analizzato tramite elettroforesi monodimensionale su gel di poliacrilammide-SDS all'8% composto da:

RUNNING per 30ml

4.85 ml H₂O
2.5 ml Acrilammide 30% (Bio-Rad)
2.5 ml Tris/HCl 1.5M PH 8.8
100 μ l SDS 10% (Bio-Rad)
100 μ l APS 10%
10 μ l TEMED (Bio_Rad)

STACKING per 5ml

3 ml H₂O

660 µl Acrilammide 30% (Bio-Rad)

1.26 ml Tris/HCl 1.5M PH 6.8

50 µl SDS 10% (Bio-Rad)

10 µl TEMED (Bio-Rad)

Ad ogni campione è stato aggiunto il 25% di sample buffer, che riduce i ponti disolfuro delle proteine e permette di individuarle durante la corsa su gel. I campioni così preparati, sono stati tenuti in un bagno caldo a 37°C per 3' e poi opportunamente caricati sul gel in quantità equivalenti a 40 µg di proteine per ogni pozzetto. La separazione elettroforetica, eseguita utilizzando un apparato (BioRad Mini Protean II Cell, Hercules, USA), è stata effettuata a 120V per il superamento dello stacking e in seguito a 100 V per il running, utilizzando come soluzione conduttrice il tampone di corsa (1 g Tris, 14 g di Glicina, SDS 1% in un litro di acqua distillata). Al termine della corsa, dopo circa 3h, sono state trasferite le proteine dal gel su una membrana di nitrocellulosa (Hybond, Amersham) per 1h usando un sistema *semidry electroblotting* (BioRad, Trsblot SD) a 100 V con tampone di trasferimento (1 g di Tris, 14.4 g di glicina, 200 ml di Metanolo in un litro di acqua distillata). Una volta ottenuto il trasferimento la membrana è stata messa in agitazione per 5' con rosso ponceau allo scopo di verificare l'esatto caricamento e trasferimento delle proteine. La membrana è stata poi saturata, ponendola in costante agitazione per 1h in una blocking solution (3% di latte in polvere, Bio-Rad, in PBS 1X) e incubata overnight con gli anticorpi policlonali di coniglio anti-mGluR1, anti-mGluR2/3, anti-mGluR4 ed anti-mGluR5 (Upstate, Milano) 1.5 µg/ml in soluzione con PBS, 3% di latte in polvere e Tween20 allo 0.05%, ponendo tutto in costante agitazione ad una temperatura di 4°C. Dopo 2 lavaggi con acqua distillata la membrana è stata messa in incubazione con l'anticorpo secondario anti-αrabbbit (Chemicon) 1:5000 diluito in PBS, 3% di latte in polvere e 0.05% di Tween20 lasciando per un ora in agitazione. Sono stati effettuati 2 lavaggi con acqua distillata, 1 in PBS 1X con lo 0.05% Tween20 per 5' e altri 4 in acqua distillata. A questo punto è stato possibile rilevare le proteine immunoreattive tramite la chemiluminescenza trattando la membrana per 3' con ECL (Amersham). La membrana è stata trasferita insieme alla lastra di sviluppo nell'apposita cassetta e dopo un tempo di esposizione variabile, la lastra è stata sviluppata.

3.5 Estrazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule staminali CD133⁺ derivanti da adenocarcinoma di colon tramite l'utilizzo di Trizol[®](Invitrogen): una soluzione monobasica di guanetidina isotiocianato capace di lisare le cellule senza alterare l'RNA. Alle cellule, coltivate in condizioni indifferenziate, ovvero in presenza di fattori mitogeni quali EGF (20 ng/ml) e bFGF (10ng/ml) è stato aggiunto Trizol[®](500 µl a flask da 75cm²). Gli estratti cellulari così ottenuti sono stati trasferiti in eppendorf e conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo per estrarre l'RNA. I lisati cellulari precedentemente ottenuti e congelati, sono stati riportati a temperatura ambiente per iniziare il protocollo per l'estrazione dell'acido ribonucleico. E' stato aggiunto ad ogni campione cloroformio (125 µl per 500 µl di Trizol[®]), in seguito sono stati centrifugati a 13300 rpm a 4°C per 15'. L'aggiunta del cloroformio seguita dalla centrifugazione porta alla separazione di due fasi: una fase acquosa superiore, contenente l'RNA ed una fase inferiore. Dopo aver raccolto delicatamente la fase acquosa, l'RNA è stato fatto precipitare per 10' a temperatura ambiente in isopropanolo (125 µl per 500 µl di Trizol[®]) e successivamente centrifugato a 13300 rpm a 4°C per 10'. Il pellet è stato sospeso in etanolo al 75% e centrifugato per 10' a 10500 rpm a 4°C. Alla fine della procedura, l'RNA è stato asciugato all'aria e poi risospeso in H₂O sterile nel volume desiderato.

3.6 Determinazione della concentrazione dell'RNA

La concentrazione dell'RNA è stata determinata misurandone la densità ottica (OD) o l'assorbanza (A). Un'aliquota di RNA di cui si vuole determinare la concentrazione viene opportunamente diluita e se ne misura l'assorbimento a 260 nm (picco di assorbanza tipico degli acidi nucleici) e a 280 nm (picco d'assorbimento caratteristico delle proteine) allo spettrofotometro. Osservando il rapporto A_{260}/A_{280} si ha l'indice della purezza del campione che è ottimale a valori compresi tra 1.8 e 2 dato che un'assorbanza a 260 nm corrisponde ad una concentrazione di RNA di 40 µg/ml, dal valore di assorbanza misurato è possibile risalire direttamente alla concentrazione del campione.

3.7 Reazione di sintesi del cDNA

La reazione è stata condotta in un volume finale di 20 μ l per la retro-trascrizione di 2 μ g di RNA totale estratto. In una provetta sono stati inizialmente assemblati i seguenti componenti:

RNA

1 μ l di Oligo (dT)12-18 (500 μ g/ml)

acqua sterile demineralizzata fino a 12 μ l

La miscela è stata scaldata a 94°C per 30'' e poi messa in ghiaccio per altri 30''. Successivamente sono stati aggiunti:

5 unità d'inibitore delle Rnasi

4 μ l di buffer first standard 5X (Invitrogen)

2 μ l di DTT 0.1 M

1 μ l di dNTP mix 10 mM

1 μ l di SuperScript II 200 U/ μ l (BRL life Tech)

acqua sterile demineralizzata fino ad un volume di 20 μ l

La miscela è stata quindi incubata a 37°C per 1h: è stato così ottenuto il cDNA, che, risospeso in acqua fino al volume di 100 μ l, è stato conservato a -20°C, pronto per essere usato nelle reazioni di PCR.

3.8 PCR

La reazione è stata condotta in un volume totale di 30 μ l. In una provetta sono stati assemblati i seguenti componenti:

6 μ l di Buffer 5X (Roche)

1 μ l di dNTP mix 10mM

1 μ l di primer F 100ng/ μ l

1 μ l di primer R 100ng/ μ l

0.15 μ l di Taq Polimerasi (5U μ l; Roche)

1 μ l di cDNA da amplificare

acqua sterile demineralizzata per portare a volume

La reazione di PCR è composta da diverse fasi. La prima permette la completa denaturazione del DNA ed avviene a 94°C per 3'. Seguono 40-45 cicli di amplificazione, ciascuno corrisponde ad una fase di denaturazione a 94°C per 30'',una fase di appaiamento alla temperatura appropriata dei primer utilizzati per 30'' ed una fase di allungamento a 72°C per 30''. La reazione termina con uno step di estensione finale di 10' a 72°C. La miscela viene portata a 4°C fino al momento dell'analisi. Le sequenze di primer usate sono:

mGlu1 FOR 5'TGTCATGCCTTCACAGAAGC
 REV 5'GGAAGGGAATTATGGGGAGA

mGlu2 FOR 5'CTACAGTGATGTCTCCATCC
 REV 5'AAAGCCTCAATGCCTGTCTC

mGlu3 FOR 5'CAAGTGACTIONACAGAGTGCAG
 REV 5'CTGTCACCAATGCTCAGCTC

mGlu4 FOR 5'CTACAGTGATGTCTCCATCC
 REV 5'AAAGCCTCAATGCCTGTCTC

mGlu5 FOR 5'CCGAGAAACACATGGTGATG
 REV 5'CTGCACCTTCTATGCGTTCA

β-actina FOR 5'TGAACCCTAAGGCCAACCGTG
 REV 5'GCTCATAGCTCTTCTCCAGGG

3.9 Elettroforesi orizzontale su gel d'agarosio

I prodotti della PCR sono stati analizzati grazie all'elettroforesi orizzontale su gel d'agarosio (1 g di agarosio in 100 ml di TAE Buffer) contenente bromuro di etidio (Bio-Rad) alla concentrazione finale di 0.5 µg/µl. L'elettroforesi in TAE 1X è stata eseguita ad un voltaggio costante di 80 V/cm² per circa 50'. Per stimare la lunghezza dei frammenti di DNA vengono confrontate le bande dei campioni con un marcatore di peso molecolare.

3.10 Dosaggio della concentrazione glutammato nel mezzo

La concentrazione di glutammato nel mezzo è stata misurata attraverso l'utilizzo di colonne con o-phthaldialdeide (OPA) e con la lettura a fluorescenza mediante HPLC.

3.11 Misurazione della formazione di AMPc

Per quantificare la formazione di AMPc, le neurosfere sono state pre-incubate con 0.5mM di isobutylmethylxanthine per 20', e poi stimolate con forskolin (10µM) con e senza la cosomministrazione dei ligandi per il recettore mGlu2/3, LY379268 e LY341495 (entrambi alla concentrazione di 100nM). Dopo 20' di incubazione, è stata terminata la reazione, acidificando con HClO₄. I livelli di AMPc sono stati misurati mediante un saggio radioimmunologico (Amersham Bioscience, Mi. Italy).

3.12 Saggio di vitalità

La proliferazione e la sopravvivenza cellulare sono state misurate mediante un saggio di vitalità non radioattivo che sfrutta le proprietà di un composto del tetrazolio, il TMS, che viene bioridotto

ad un composto colorato, il formazano, capace di assorbire ad una lunghezza d'onda di 490nm monitorata allo spettrofotometro. La quantità di formazano prodotto è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali.

Il kit usato (Promega: CellTiter 96 Acquose one solution cell proliferation assay) corrisponde ad un'unica soluzione contenente un composto del tetrazolio, il [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H.tetrazolio] **{TMS}** e la [fanazina etosolfata] **{PES}**.

Il TMS viene ridotto ad opera di una deidrogenasi che usa NADH. Tale reazione avviene solo nelle cellule metabolicamente attive.

Esiste una correlazione lineare tra il numero di cellule attive e la quantità di composto ridotto e di conseguenza, una relazione tra l'assorbanza del mezzo, dovuta al composto colorato, e la quantità di cellule vitali. Il PES è aggiunto nella soluzione come accettore di elettroni in modo da stabilizzarla.

Le cellule sono state piastrate, dopo dissociazione enzimatica mediante tripsina, in multiwell da 96 alla densità di 10.000 cellule/pozzetto in un mezzo contenente i fattori di crescita. La quantità di mezzo per ogni pozzetto è di 100 µl. I trattamenti farmacologici sono stati eseguiti secondo schemi stabiliti. Sono stati somministrati 20µl di soluzione titolante/100 µl di mezzo e dopo un incubazione di 1-4 ore si è provveduto alla lettura dell'assorbanza a 490 nm mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro per piastre da 96 well.

3.13 Trasfezione

La trasfezione del plasmide AKT è stata realizzata tramite il metodo della LipofectAMINE (Invitrogen) secondo il protocollo d' uso. Le cellule sono state contate e seminate con una densità di 1×10^4 cellule per piastra da 96 e di 1×10^6 cellule per dish da 3,5 cm di diametro; sono state lasciate in coltura nel mezzo privo di antibiotici per un giorno e successivamente incubate per 4 ore con 10µl di reagente specifico LipofectAMINE e 10µg di plasmide.

Data la loro natura cationica, i lipidi interagiscono elettrostaticamente con il DNA e formano dei complessi, che mantengono la carica positiva. Questi complessi aderiscono alla membrana cellulare e vengono incorporati dalle cellule per endocitosi. Essendo questo un sistema in transiente, il DNA non si integra nel genoma, ma rimane in forma episodica e viene perso durante la replicazione cellulare. Aggiunto mezzo ed antibiotico, dopo 4 ore dalla trasfezione, sono stati somministrati i farmaci, secondo gli schemi stabiliti, e dopo 48 ore è stato eseguito il saggio di vitalità. Per avere

conferma dell'avvenuta trasfezione si è provveduto all'estrazione di proteine dalle cellule piastrate sui dish da 3,5 cm di diametro.

3.14 Oligonucleotidi

Gli oligonucleitidi antisenso sono brevi frammenti di DNA, di circa 15 nucleotidi, che contengono una sequenza nucleotidica complementare al filamento di DNA codificante (senso) o di RNA messaggero (mRNA). L'antisenso, grazie alla sua "specularità" rispetto al DNA senso, si appaia alle sequenze complementari di DNA, o di RNA, impedendo così la decodificazione ed il successivo processo di sintesi proteica.

Le dimensioni di 15-18 basi garantiscono la complementarità unica ed evitano interazioni. Per facilitare l'ingresso intracellulare e la stabilità degli oligonucleotidi vengono sostituiti atomi di ossigeno presenti nel DNA con gruppi metilici, in modo da ridurre la repulsione tra le membrane cellulare e gli oligo stessi. Inoltre, l'atomo di fosforo presente nel DNA viene sostituito da uno zolfo (S-oligo) che ne aumenta la solubilità in soluzione acquosa.

Il legame di un oligonucleotide antisenso all'RNA impedisce ai ribosomi di iniziare o terminare la traduzione o indurre l'enzima ribonucleasi H a tagliare l'RNA che viene rapidamente degradato.

Nel caso l'oligonucleotide si leghi ad una regione di controllo del DNA, si forma un complesso a tripla elica che impedisce all'RNA polimerasi di legarsi al DNA per dare inizio alla trascrizione.

4 Risultati

4.1 Colture primarie di cellule staminali tumorali derivanti da adenocarcinoma di colon-retto esprimono i recettori mGlu

Sono state allestite colture di cellule staminali tumorali, derivanti da prelievi biotipici di quattro pazienti con diagnosi di adenocarcinoma di colon-retto. I pazienti sono stati identificati con sigle o numeri: CRO, 1.2, 11 e 18. Le cellule sono state propagate in coltura in presenza di fattori di crescita: EGF 20 ng/ml e bFGF 10 ng/ml e in assenza di siero. Per caratterizzare il profilo di espressione dei recettori mGlu ci si è avvalsi della tecnica di PCR e di Western Blot. La PCR ha dimostrato l'espressione dei messaggeri dei recettori mGlu2, mGlu3, mGlu4 e mGlu5 in tutte le linee studiate. Il messaggero del recettore mGlu1 è presente solo nella linea 18 (Fig.4).

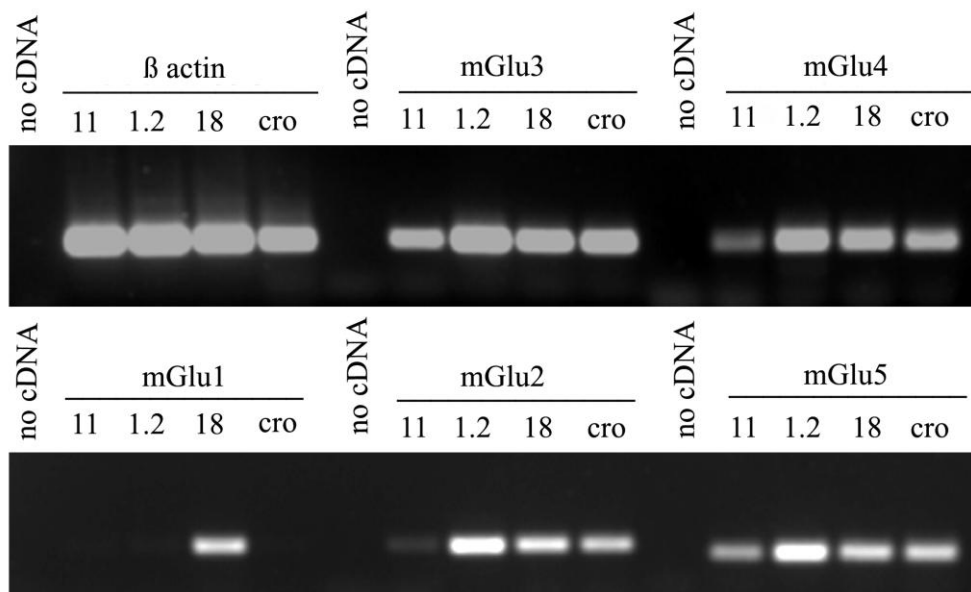


Fig.4 RT-PCR dei recettori mGlu

L'analisi Western Blot ha dimostrato, nelle quattro linee cellulari, la sola espressione del recettore mGlu2/3, con banda a 110KDa che corrisponde al peso del monomero (Fig.5).

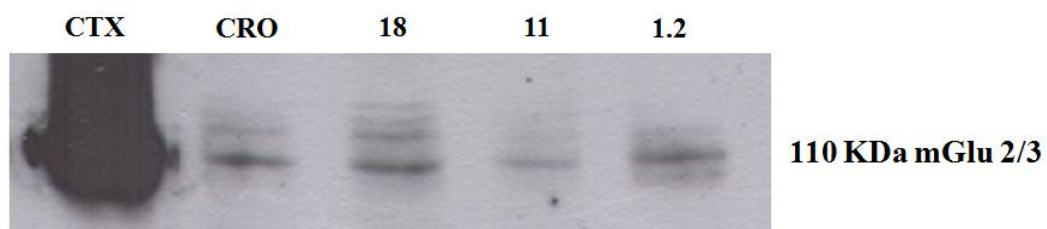


Fig. 5 Western blot del recettore mGlu2/3

4.2 Caratterizzazione delle cellule staminali tumorali derivanti da adenocarcinoma di colon-retto

Le cellule staminali tumorali ottenute da adenocarcinoma di colon-retto coltivate in vitro in presenza di mitogeni si aggregano a formare strutture in sospensione chiamate sfere tumorali. Al fine di caratterizzarle, ci si è avvalsi dell'analisi citofluorimetrica al FACS, che ha rivelato l'espressione del CD133, noto marcatore di staminalità (Fig. 6)

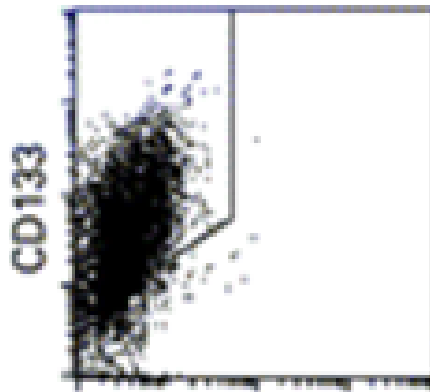
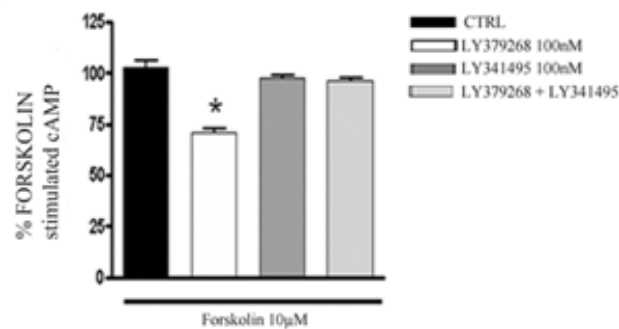


Fig. 6 FACS del CD133

4.3 Il recettore mGlu2/3 espresso in colture di cellule staminali tumorali di adenocarcinoma di colon-retto è funzionante

Il recettore mGlu2/3 espresso dalle cellule staminali tumorali di adenocarcinoma di colon-retto è accoppiato alla via di trasduzione del segnale canonica che comprende l'inibizione dell'attività dell'adenilatociclastasi, come evidenziato dal saggio radioimmunologico (Amersham Bioscience, Mi. Italy) che misura la formazione di AMPc. Nelle cellule dissociate dalle sfere tumorali, starvate dai fattori mitogeni per 24 ore, la formazione di AMPc, stimolato da Forskolin (10 μ M), è ridotta dalla somministrazione di LY379268 (100nM), agonista selettivo del recettore mGlu2/3. L'effetto non si osserva dopo la somministrazione di LY341495 (100nM), antagonista del recettore mGlu2/3 (Graf.1).



Graf.1 Misurazione formazione AMPc

La via di trasduzione del segnale è stata studiata anche mediante l'esecuzione di Western Blot per valutare una possibile modulazione dell'attività della PI-3K (phosphoinositide 3 kinase).

Le cellule staminali tumorali di adenocarcinoma di colon-retto sono state piastrate e mantenute per 24 ore in condizioni indifferenziative, successivamente sono state starvate dai fattori di crescita.

I risultati sono stati esaustivi: l'espressione della pAKT (phospho-serine/threonine protein kinase) è ridotta dopo la somministrazione di LY341495(100nM), antagonista del recettore mGlu2/3,rispetto ai basali e rispetto alla stimolazione con EGF (10ng/ml), che fa da controllo positivo (Fig.7). L'interpretazione dei dati è stato supportato dallo studio densitometrico (Graf. 2).

I dati ottenuti suggeriscono che il recettore mGlu2/3 è accoppiato ad una via di trasduzione del segnale molteplice, che include l'inibizione dell'adenilatociclastasi e l'attivazione della PI-3K.

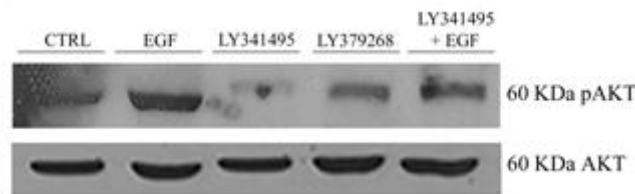
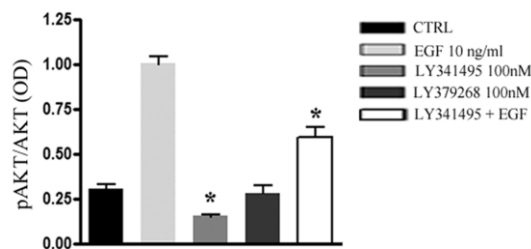


Fig. 7 Western blot di pAKT e AKT



Graf.2 Densitometria pAKT/AKT

4.4 Il blocco farmacologico del recettore mGlu2/3 aumenta la risposta delle cellule staminali tumorali derivanti da adenocarcinoma di colon-retto ai chemioterapici classici

Data l'espressione su cellule staminali tumorali, derivanti da adenocarcinoma di colon-retto del recettore mGlu2/3, ci si è chiesto se fosse in grado di modularne la risposta ai chemioterapici.

Poiché la concentrazione di glutammato nel mezzo, misurata mediante HPLC, è pari a $35 \pm 3 \mu\text{M}$ (i valori sono significativi \pm SEM; $n=5$) e tale concentrazione è in grado di attivare il recettore mGlu2/3, per svelarne il ruolo, è stato usato l'antagonista, LY379268.

Sono state quindi allestite delle colture in condizioni proliferative, in assenza di siero ed in presenza di fattori di crescita (EGF 20 ng/ml e bFGF 10 ng/ml). Le colture sono state trattate con il 5 fluoro – uracile (5-FU), chemioterapico di prima scelta nel trattamento del cancro del colon-retto, e con l'irinotecan, farmaco dotato di significativa attività in pazienti con carcinoma in stadio avanzato. Inoltre è stato usato il cisplatino, chemioterapico con bassa attività nei confronti del cancro del colon-retto, come controllo negativo. Le cellule sono state esposte a diverse concentrazioni di 5-FU ($0.05 \mu\text{g/ml}$ corrispondenti a $3.8 \mu\text{M}$ e $5 \mu\text{g/ml}$ corrispondenti a $38 \mu\text{M}$) per 48 ore. Sono stati somministrati l'agonista selettivo del recettore mGlu2/3, LY379268 (100nM), e l'antagonista selettivo del recettore mGlu2/3, LY341495 (100nM), da soli o in associazione ai tre farmaci citotossici. La morte cellulare indotta da 5-FU è aumentata dall'associazione con LY341495, che da solo si è mostrato inefficace. Questa associazione riduce drammaticamente la sopravvivenza cellulare, inducendo una morte del $68\% \pm 7$, e del $82\% \pm 8$ alla concentrazione di $0.5 \mu\text{g/ml}$ e $5 \mu\text{g/ml}$, rispettivamente (Grafico 3). Allo stesso modo le cellule sono state trattate con irinotecan ($5 \mu\text{g/ml}$ corrispondenti a $8 \mu\text{M}$) per 72 ore. La mortalità cellulare indotta dall'irinotecan che risulta essere del $78\% \pm 8$, arriva al $96\% \pm 9$ dopo l'associazione con LY341495 (Grafico 4). Infine è stata confermata la mancata risposta cellulare al trattamento con cisplatino ($5 \mu\text{g/ml}$ corrispondenti a $17 \mu\text{M}$) a 48 ore (Grafico 5); in questo caso l'associazione con LY341495 non induce morte cellulare, suggerendo che sia necessaria una iniziale chemioresponsività. Non è stato osservato alcun aumento della mortalità cellulare dopo la somministrazione di LY379268 (100 nM), agonista selettivo del recettore mGlu2/3, se combinato con i tre chemioterapici. È interessante notare come la somministrazione di LY379268 alle cellule trattate con LY341495 e 5-FU o irinotecan, reverte l'aumento della morte cellulare indotto da LY341495, suggerendo un possibile coinvolgimento del recettore mGlu2/3 nell'aumentare la chemiosensibilità indotta da LY341495 (Tabella 1). I valori

espressi in percentuale sul totale delle popolazioni cellulari sono significativi \pm SEM con $*p < 0.001$ rispetto ai controlli (One-Way ANOVA + Newman-Keuls test).

Farmaco somministrato	Percentuale mortalità somministrazione chemioterapico	Percentuale mortalità co-somministrazione di LY341495, 100nM
5-FU, 0.05 μ g/ml	18% \pm 2	68% \pm 7
5-FU, 5 μ g/ml	60% \pm 6	82% \pm 8
Irinotecan, 5 μ g/ml	78% \pm 8	96% \pm 9

Tabella1 Percentuale cellule morte

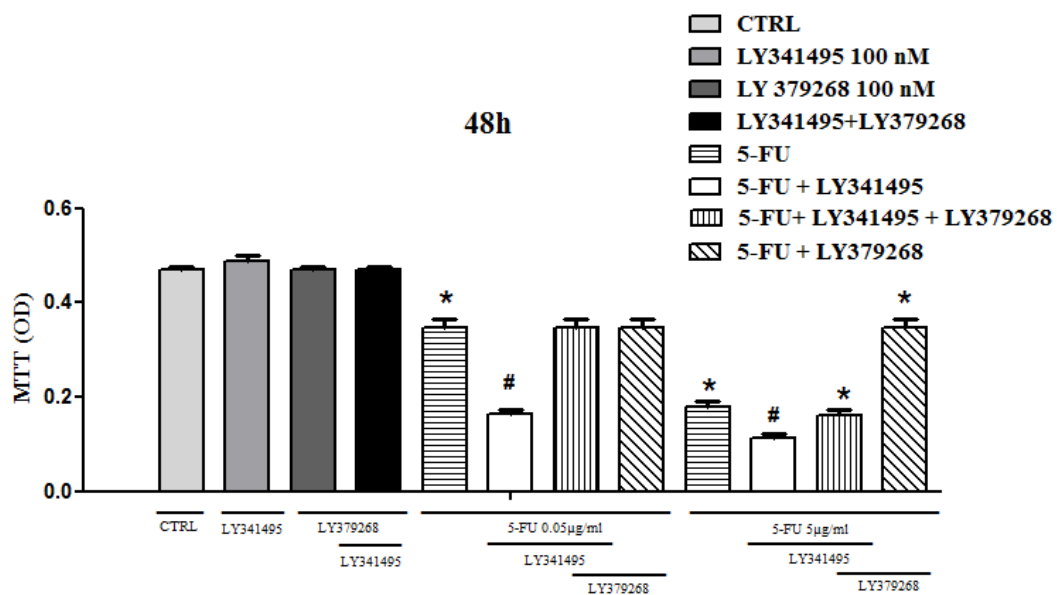


Grafico 3 Saggio di vitalità dopo trattamento con 5-FU, LY341495 e LY379268 I valori derivano dalla media \pm SEM di 6-9 determinazioni (ANOVA, Newman-Keuls test); $*p < 0.05$: 5FU vs CTRL e # $p < 0.05$: 5FU+ LY341495 vs 5FU

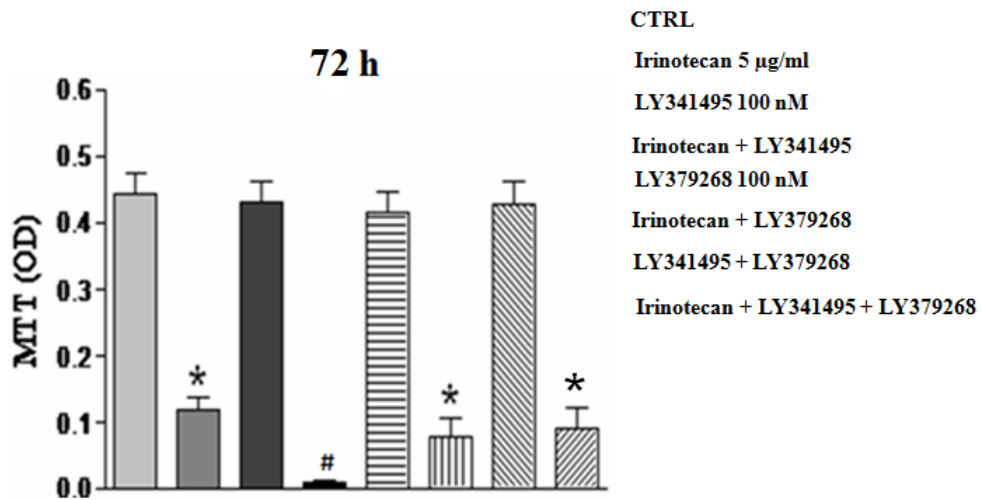


Grafico 4 Saggio di vitalità dopo trattamento con Irinotecan e LY341495 a 72 ore I valori derivano dalla media \pm SEM di 6-9 determinazioni (ANOVA, Newman-Keuls test); * $p < 0.05$: Irinotecan vs CTRL e # $p < 0.05$: Irinotecan+ LY341495 vs Irinotecan.

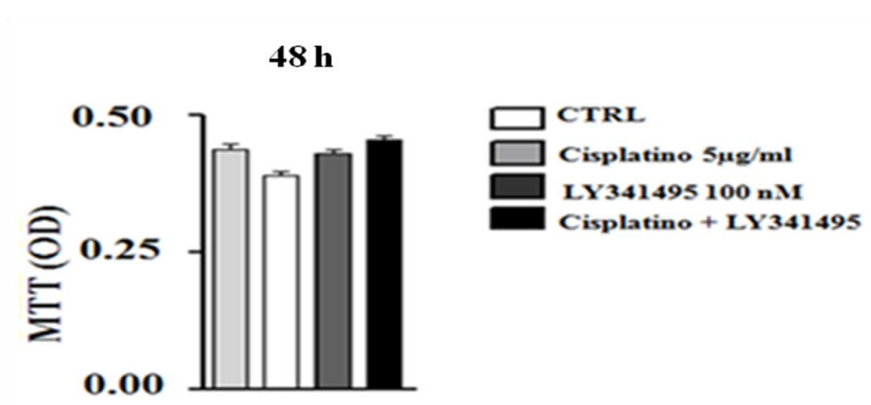


Grafico 5 Saggio di vitalità dopo trattamento con cisplatino e LY341495(ANOVA, Newman-Keuls test)

È stato eseguito, per ciascuna linea cellulare, un time course di risposta ai farmaci dopo 24, 48 e 72 ore dalla somministrazione (Grafici 6, 7 e 8). Il test di vitalità, eseguito dopo 72 ore, è stato preceduto da un'unica somministrazione dei due farmaci (1+1), una del chemioterapico classico e due di LY341495 (1+2) e due di entrambi (2+2).

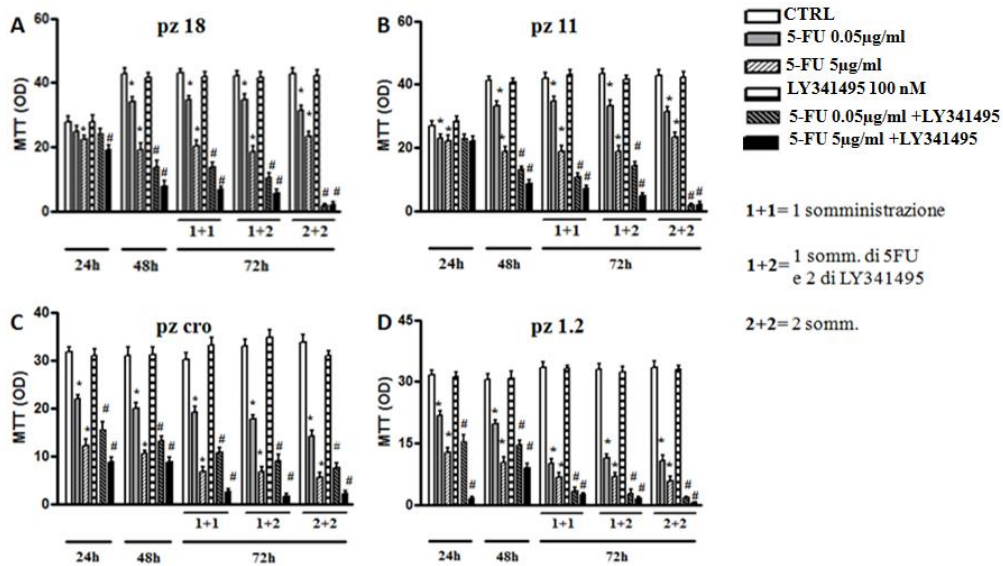


Grafico 6 Time course dopo somministrazione di 5-FU ed LY341495. I valori derivano dalla media \pm SEM di 6-9 determinazioni (ANOVA, Newman-Keuls test); * $p < 0.05$: 5FU vs CTRL e # $p < 0.05$: 5FU+ LY341495 vs 5FU

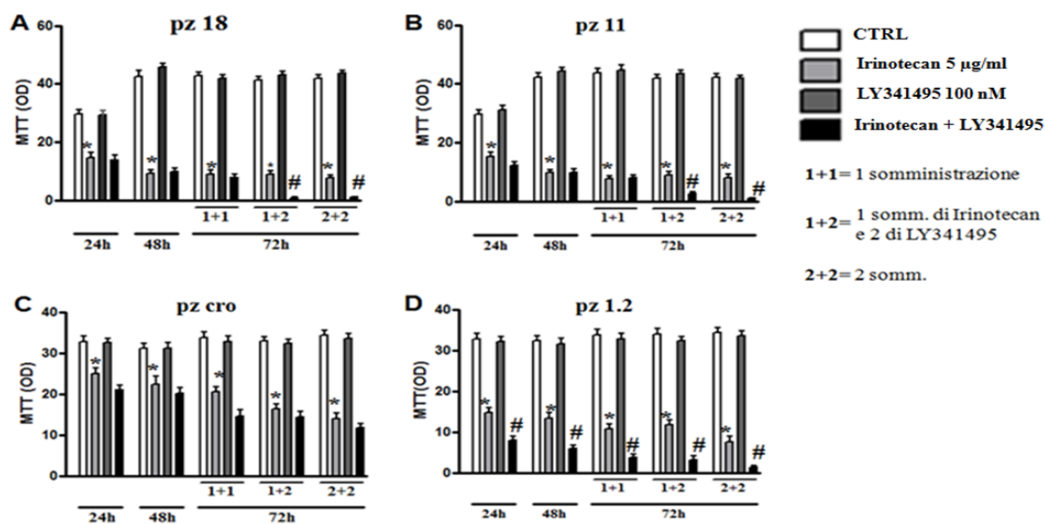


Grafico 7 Time course dopo somministrazione di Irinotecan ed LY341495. I valori derivano dalla media \pm SEM di 6-9 determinazioni (ANOVA, Newman-Keuls test); * $p < 0.05$: Irinotecan vs CTRL e # $p < 0.05$: Irinotecan+ LY341495 vs Irinotecan

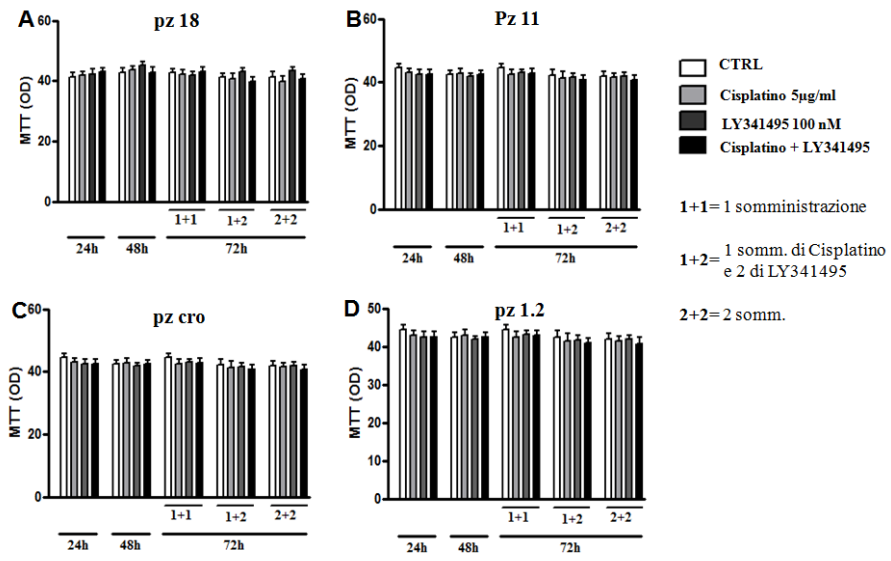


Grafico 8 Time course dopo somministrazione di Cisplatino ed LY341495 (ANOVA, Newman-Keuls test)

4.5 Il blocco del recettore mGlu2/3 amplifica la risposta al 5FU delle cellule staminali tumorali di adenocarcinoma di colon-retto mediante inibizione della via della PI-3K.

Per comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base degli effetti finora osservati ci si è proposti di esplorare la trasduzione del segnale mediata dal recettore mGlu2/3. Per esaminare il coinvolgimento della via dell'adenilatociclastasi, è stato somministrato alle colture cellulari un analogo dell'AMPC, 8Br-cAMP (1mM), da solo o in associazione con 5-FU. Dopo 48 ore è stato eseguito il test di vitalità ed è stato così possibile osservare che 8Br-cAMP non ha alcun effetto e non mima l'azione di LY341495 quando combinato con 5-FU, suggerendo che non ci sia un coinvolgimento della via dell'adenilatociclastasi.

L'inibitore della PI-3K, LY290042 (100nM), che da solo sembra non avere alcun effetto, somministrato in associazione con 5-FU riproduce lo stesso pattern di morte cellulare indotta dalla co-somministrazione di 5-FU con LY341495 ($68\% \pm 7$ cellule morte, dopo 48 ore dalla somministrazione). Inoltre non si sono osservati ulteriori aumenti di morte cellulare quando LY341495 e LY290042 sono stati somministrati in associazione con 5-FU (Graf.9). Questi risultati lasciano supporre un possibile coinvolgimento della via del segnale mediata dalla PI-3K.

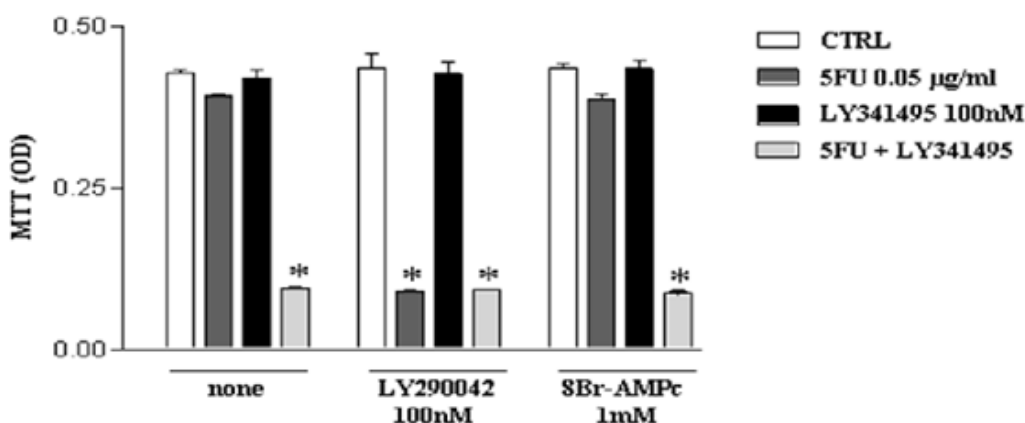


Grafico 9 Saggio di vitalità dopo trattamento con 5FU, LY341495, LY290042 e 8Br (ANOVA, Newman-Keuls test)

Dato che il recettore mGlu2/3 è accoppiato a proteine G_i e regola la trasduzione del segnale anche mediante attivazione delle MAPK, protein-chinasi attivate da mitogeni (Ferraguti et al, 1999), per escludere il coinvolgimento di un'ulteriore pathway è stato usato un inibitore delle MAPK, UO-126 (200nM). È stato così possibile osservare che UO-126, che di per sé non ha mostrato alcuna tossicità, se associato con 5-FU sembra non riprodurre lo stesso pattern di morte cellulare indotta dalla co-somministrazione di 5-FU con LY341495; stesso risultato si ottiene con la combinazione

di UO-126 con LY341495 se somministrata in associazione con 5-FU. Questi risultati lasciano pensare ad una mancata mediazione della via delle MAPK (Graf.10).

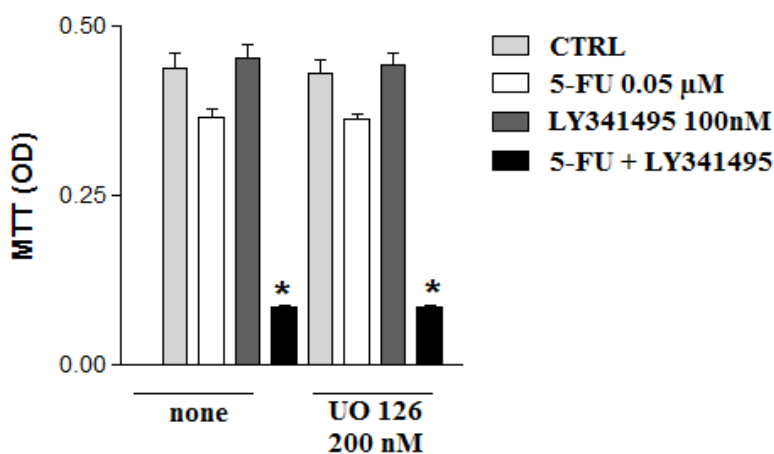
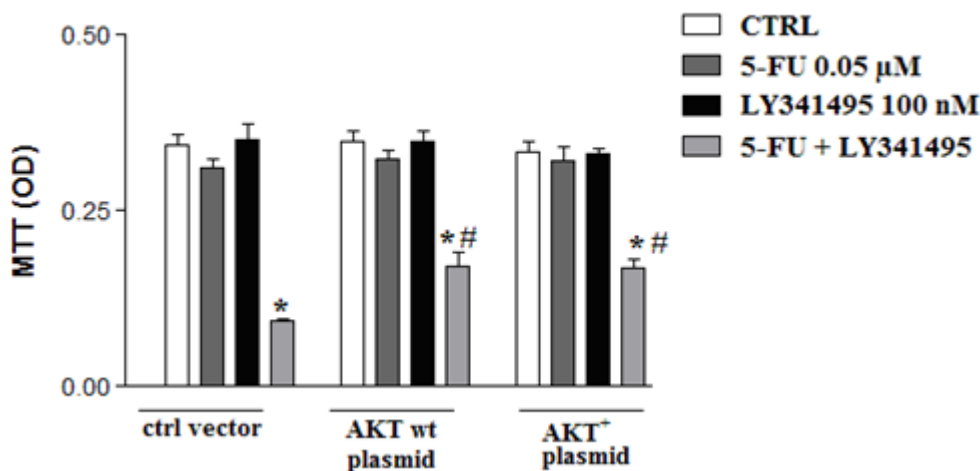


Grafico 10 Saggio di vitalità dopo trattamento con 5FU, LY341495 e UO-126. I valori derivano dalla media \pm SEM di 6-9 determinazioni (ANOVA, Newman-Keuls test). * $p < 0.05$ vs i rispettivi CTRL

Per confermare il ruolo dell'inibizione della PI-3K nella morte cellulare, indotta dall'associazione di 5-FU e LY341495, le cellule sono state trasfettate con un plasmide che codifica per la forma wild type o con un plasmide che codifica per la forma costitutivamente attiva di AKT, target molecolare della PI-3K, ed esposte al trattamento farmacologico. Al test di vitalità, eseguito dopo 48 ore, LY341495 in combinazione con 5-FU mostra l'effetto atteso. Nelle cellule l'overespressione o espressione costitutiva di AKT previene la morte cellulare indotta dalla co-somministrazione di 5-FU e LY341495 (Graf.11)



Graf.11: Saggio di vitalità dopo trasfezione di AKT. I valori derivano dalla media \pm SEM di 6-9 determinazioni (One way Anova, Newmann Test) * $p < 0.05$ vs 5FU; # $p < 0.05$ vs 5FU+LY34.

Prova dell'avvenuta trasfezione è data dal western blot eseguito per AKT e poi titolato con β -actina (Fig. 8 A, B).

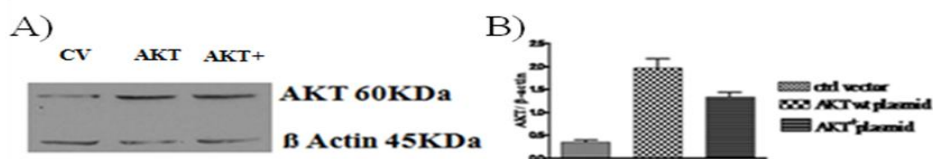


Fig.8: A) Western blot di AKT e β -actina e densitometria AKT/ β actin

Questi dati suggeriscono che il blocco farmacologico del recettore mGlu2/3 aumenta la chemiosensibilità delle cellule staminali tumorali di adenocarcinoma di colon-retto al 5-FU e che questo effetto è mediato dall'inibizione della via della PI-3K.

Per comprendere da quale dei due recettori di secondo gruppo fossero mediati gli effetti finora osservati, è stato somministrato un modulatore allosterico negativo dell'LY mGlu3 NAM. I risultati ottenuti sembrano far pensare ad coinvolgimento del solo recettore mGlu3 (Fig. 9)

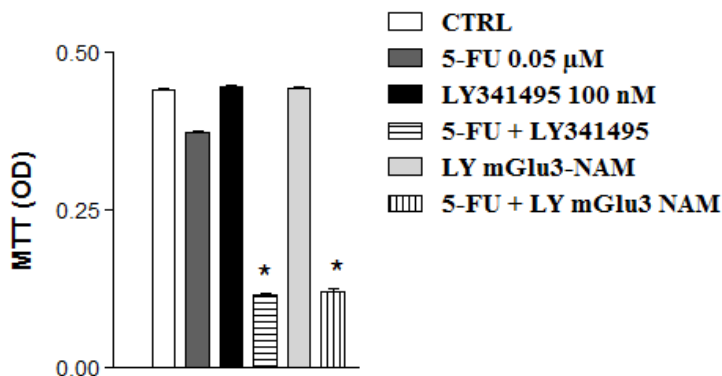


Figura 9: Saggio di vitalità dopo trattamento con 5FU, LY341495 e LY mGlu3 NAM. I valori derivano dalla media \pm SEM di 6-9 determinazioni (ANOVA, Newman-Keuls test). * $p < 0.05$ vs i rispettivi CTRL

Per rinforzare i dati ottenuti si è proceduto alla somministrazione di oligonucleotidi antisense per mGlu2 e per mGlu3 e di oligonucleotidi miss-match (ms), come controllo . Le cellule sono state piastrate secondo le modalità già descritte per il saggio di vitalità. Gli antisense sono stati somministrati per due giorni ed è stata eseguita la lettura allo spettrofotometro. I risultati sono stati esaustivi, in quanto sembra che gli effetti finora osservati siano mediati dal recettore mGlu3 (Fig. 10). Questi ultimi dati sono in attesa di conferma mediante esecuzione di PCR quantitativa.

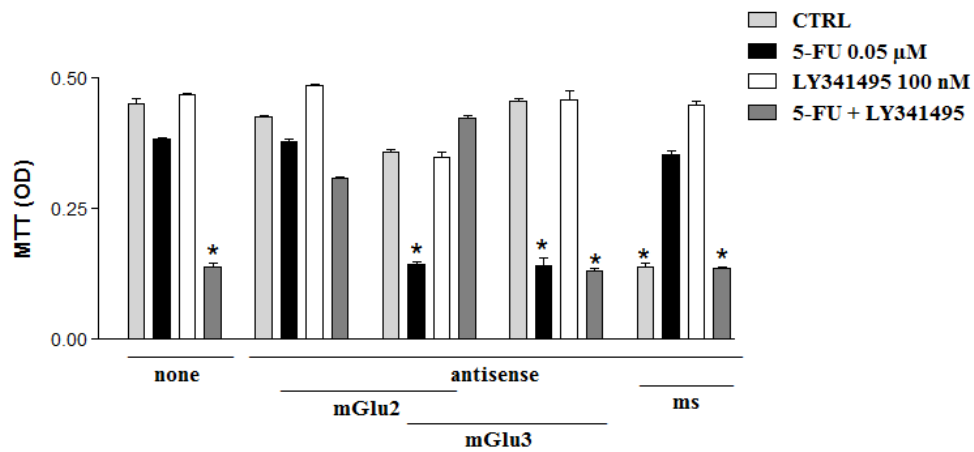


Fig.10: A) Saggio di vitalità dopo somministrazione degli oligonucleotidi antisense di mGlu2 ed mGlu3. I valori derivano dalla media \pm SEM di 6-9 determinazioni (One way Anova, Newmann Test) * $p < 0.05$ vs i rispettivi CTRL

4.6 LY341495 combinato con 5-FU riduce i livelli di espressione di DYPD (dihydropyrimidine dehydrogenase) inibendo la via della PI-3K

Diversi studi hanno dimostrato che enzimi coinvolti nel metabolismo del 5-FU risultano condizionanti la risposta al trattamento chemioterapico (Etienne et al., 1995 e Peters GJ et al). Come è noto, Dihydropyrimidine dehydrogenase (DYPD), enzima coinvolto nella prima tappa metabolica del 5-FU, è determinante per la regolazione dell'intero processo catabolico. Alti livelli di DYPD comportano l'inattivazione del 5-FU e la conseguente chemioresistenza allo stesso (Schmoll, 2003). L'analisi Western Blot ha dimostrato che la somministrazione di 5-FU induce un aumento dei livelli di DYPD nelle cellule staminali tumorali di colon-retto. Tuttavia, come previsto, la combinazione di 5-FU con LY341495 riduce l'espressione di DYPD rispetto ai livelli basali dopo 48 ore di trattamento. Per comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base degli effetti osservati le cellule sono state trattate con l'inibitore selettivo della PI-3K, LY290042, (100 nM), che, pur essendo di per sé inattivo, se combinato con 5-FU riduce i livelli di DYPD come osservato dopo la cosomministrazione di 5FU e LY341495 e dopo cosomministrazione di entrambi i farmaci (Fig. 10 A, B).

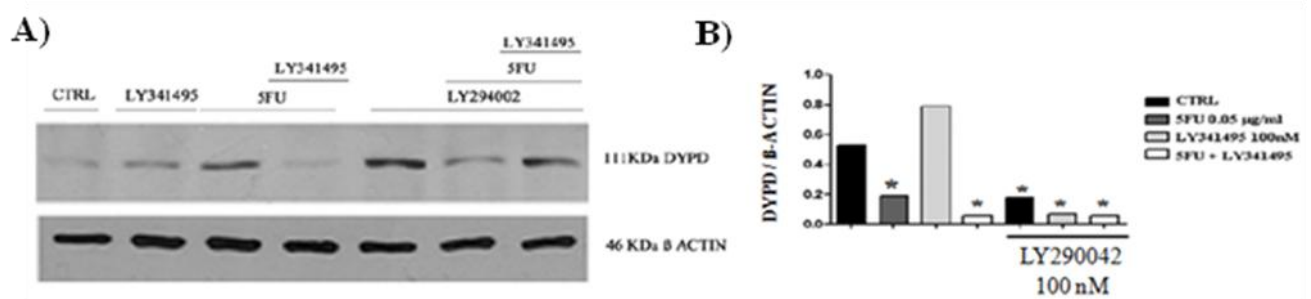


Fig.10: A) Western blot di DYPD e β -actina. B) Densitometria DYPD/Bactin

A conferma di questa ipotesi, gli stessi risultati sono stati ottenuti con le cellule staminali tumorali trasfettate con overespressione di AKT (Fig.11 A, B).

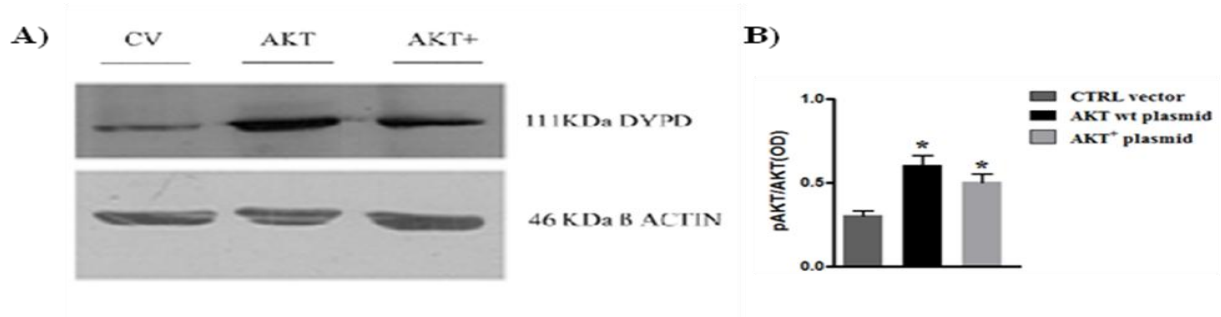


Fig.11: A) Western blot di DYDP e β -actina e densitometria DYDP/ β actin dopo trasfezione

Tali risultati suggeriscono che la riduzione di espressione di DYDP indotta dalla combinazione di 5-FU e LY341495 sia mediata dall'inibizione della via della PI-3K.

5 Studi in vivo

Sono stati realizzati modelli in vivo che prevedono l'impianto sotto-cute di cellule staminali di cancro di colon-retto in topi nudi, allo scopo di indurre la formazione di un tumore umano negli animali. Questo modello animale permette di studiare in vivo l'attività antitumorale di agonisti e antagonisti del recettore mGlu2/3, dato il possibile potenziamento citotossico coi chemioterapici classici visto in vitro.

A questo scopo le cellule sono state impiantate sottocute a livello del fianco di topi nudi con una densità di 10^6 cellule/100 μ l.

Una volta che la massa tumorale avrà raggiunto il diametro di circa 1 cm, si procederà alla somministrazione dei farmaci, previa randomizzazione e divisione in quattro gruppi: controllo (con somministrazione di salina), 5-FU, LY341495 e 5-FU in associazione con LY341495.

Lo schema terapeutico prevede la somministrazione intraperitoneale di 5-FU alla dose di 1,5mg/3 volte a settimana e di LY341495 alla dose di 1mg/3 volte a settimana per un mese.

Lo studio verrà infine completato con l'esame istologico.

6. Discussione e Conclusioni

- Recenti evidenze indicano un ruolo dei recettori mGlu che va oltre la regolazione della attività sinaptica: sono presenti, infatti su cellule che precludono la formazione di sinapsi e in diverse neoplasie, quali ad esempio melanomi (Pollock et al., 2003), medulloblastomi (Iacovelli et al., 2006) e carcinoma del colon-retto (Yoo et al., 2004). La funzione di questi recettori sembra estesa quindi a molti altri processi biologici, quali ad esempio la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza cellulare (Melchiorri et al., 2007; Nicoletti et al., 2007).
- Cellule staminali tumorali preparate da prelievi biotici umani di adenocarcinoma del colon-retto esprimono il CD133, marker di “staminalità” (Ricci-Vitiani et al., 2007) e il recettore mGlu2/3.
- Il blocco farmacologico del recettore mGlu2/3 amplifica la risposta delle cellule staminali tumorali, derivanti da adenocarcinoma di colon-retto, ai chemioterapici classici, 5-FU e Irinotecan, attraverso l’inibizione della via PI-3K.
- Il blocco farmacologico del recettore mGlu2/3, inibendo la via di PI-3K, riduce i livelli di DYPD, un enzima responsabile della mancata risposta al trattamento con il chemioterapico.

Il recettore mGlu2/3 è un potenziale target farmacologico nella terapia sperimentale del carcinoma del colon-retto

7. Bibliografia

Al-Hajj M., Wicha MS., Benito-Hernandez A., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cell*. "Proc Natl Acad Sci USA." 100 (2003) fasc. 7, p. 3983-3998.

Baskys A., Wojtowicz J.M., *Effects of brain tissue hydrolysate on synaptic transmission in the hippocampus*, "Pharmacol. Biochem. Behav". 4 (1994) fasc. 49, p.1105-1107.

Beall C., Fyrberg C., S. Song S., et al., *Isolation of a Drosophila gene encoding glutathione S-transferase*, "Biochem Genet.",10 (1992) fasc. 30, p. 515-527.

Bettler B., Boulter J., Dingledine R., et al., *Molecular biology of the glutamate receptors*, "Clin. Neuropharmacol.", 1 (1992) p. 60-61.

Bez A., Corsini E. , Curti D., et al., *Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization*, "Brain Res.", 993 (2003) fasc. 1-2, p. 18-29.

Blanplain C., Horsley V., Fuchs E., *Epithelial stem cell: tuning over new leaves*. "Cell" 2007.

Bliss T.V. & Collinbridge G.L., *A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus*, "Nature", 6407 (1993) fasc. 361, p. 31-39.

Bonnet D., Dick JE. *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. "Nat Med." 3 (1997) fasc. 7, p. 730-737.

Burnashev N., Monyer H., Seeburg P.H. et al., *Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit*. "Neuron", 1 (1992) fasc. 8, p. 189-198.

Burnashev N., Sakmann B., Seeburg P.H., *Determinants of Ca²⁺ permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing*, "Neuron",10 (1993) fasc. 3, p.491-500.

Burnashev N., Schoepfer R., Monyer H. et al., *Control by asparagine residues of calcium oscillations by phosphorylation of metabotropic glutamate receptors*, “Nature”, (1996) 383, p. 89-92.

Catania M.V., Landwhermeyer G.B., Testa C.M., et al., *Metabotropic Glutamate receptors are differentially regulated during development*, “Neuroscience”, 61 (1994) p. 481–495.

Choi D.W., *Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system*, “Neuron”, 8 (1988) fasc. 1, p. 623-634.

Choi D.W., Yokoyama M., Koh J., *Zinc neurotoxicity in cortical cell culture*, “Neuroscience”, 24 (1988) fasc.1, p. 67-79.

Cotsarelis G., Sun TT., Lavker RM. *Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implication for follicular stem cell, hair cycle, and skin carcinogenesis*. “Cell” 1990.

Desai T. and Coun S., *Selective activation of phosphoinositide hydrolysis by a rigid analog of glutamate*, “Neurosci. Let.”, 109 (1990) p. 157-162.

Etienne MC, Chéradame S, Fischel JL et al., *Response to fluorouracil therapy in cancer patients: the role of tumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity*. “J Clin Oncol.”13 (1995) fasc.7, p. 1663-70.

Flor H., Wu S., Wright R. A et al., *Group III human metabotropic glutamate receptors 4, 7 and 8: molecular cloning, functional expression, and comparison of pharmacological properties in RGT cells*, “Brain Res. Mol. Brain Res.” 1 (1998) fasc. 53, p. 88-97.

Flor P.J., Gomeza J., Tones M.A., et al., *The c-terminal domain of mGluR1 metabotropic glutamate receptors affects sensitivity to agonists*, “J. Neurochem.”, 67 (1996) p. 58-63.

Giannakis M., Stappenbeck TS., Mills JC., et al. *Molecular properties of adult mouse gastric and intestinal epithelial progenitors in their niches*. “J Biol Chem”. 281 (2006), fasc. 16, p. 11292-11300.

Gomez J., Mary S., Brabet I., et al., *Coupling of metabotropic glutamate receptors 2 and 4 to G 15 and 16 and chimeric Gq/i proteins: characterization of new antagonists*, “Mol. Pharm.”, 50 (1996) p. 923-930.

Greaves LC., Preston SL., Tadrous PJ., et al. *Mitochondrial DNA mutations are established in human colonic stem cell, and mutated clones expand by crypt fission*. “Proc Natl Acad Sci USA” 103 (2006), fasc. 3, p. 714-719.

Hayashi H., Sekiyama N., Nakanishi S., et al., *Analysis of agonist and antagonist activities of phenylglycine derivatives for different cloned metabotropic glutamate receptor subtypes*, “J. Neurosci.”, 14 (1994) p. 3370-3377.

Heppner GH., *Tumor heterogeneity*. “Cancer Res”. 44 (1984), fasc. 6, p. 2259-2265.

Higuchi M., Single F.N., Kohler M. et al., *RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency*, “Cell”. 75 (1993) fasc. 7 p. 1361-1370.

Hollmann M., Hartley M., Heimann S., *Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition*, “Science” 5007 (1991) fasc. 252, p. 851-853.

Holmann C. and Heinemann P., *Cloned glutamate receptors*, “A. Rev. Neurosci.”, 17 (1994) p. 31-108.

Hume R.I., Dingledine R., Heinemann S.F., *Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability*, “Science”, 5023 (1991) fasc. 30, p.1028-1031.

Iacovelli L., Arcella A., Battaglia G., et al., *Pharmacological activation of mGlu4 metabotropic glutamate receptors inhibits the growth of medulloblastomas*, “J. Neurosci.”, 32 (2006) fasc. 26, p. 8388-8397.

Ishida M., Saitoh T., Nakamura Y., et al., *A novel metabotropic glutamate receptor agonist: (2S,1'S, 2'R, 3'R)-2-(carboxy-3-methoxymethylcyclopropyl) glycine (cis- MCG-I)*, “Eur. J. Pharm-Mol. Pharm. Section”, (1994) 268, p. 267-270.

Joly C., Gomeza J., Brabet I., et al., *Molecular, functional and pharmacological characterization of the metabotropic glutamate receptor type 5 splice variants: comparison with mGluR1*, “J. Neurosci.”, (1995) 15, p. 3970-3981.

Kawabata S., Tsutsumi R., Kohara A., et al., *Control of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor*, “Science”, 5075 (1992) fasc. 257, p. 1415-1419.

Kemp M.C., Roberts P.J., Pook P.C.K., et al., *Antagonism of presynaptically mediated depressant responses and cyclic AMP-coupled metabotropic glutamate receptors*, “Eur. J. Pharm.-Mol. Pharm.”, (1994) 266, p. 187-192.

Kohler M., Burnashev N., Sakmann B. Et al., *Determinants of Ca²⁺ permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing*. “Neuro” 10 (1993) fasc. 3 p. 491-500.

Korbling M., Estrov Z., *Adult stem cell for tissue repair – a new therapeutic concept?* “N Engl J Med”. 349 (2003), fasc. 6, p. 570-582.

Lomeli H., Wisden W., Koler M., et al., *High-affinity kainate and domoate receptors in rat brain*, “FEBS Lett.”, 2 (1992) fasc. 307, p. 139-143.

Mayer M.L. & Westbrook G.L., *Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones*, “J Physiol.”, 394 (1987) p. 501-527.

Melchiorri D., Cappuccio L., Ciceroni C., et al. *Metabotropic glutamate receptors in stem/progenitor cell*. “Neuropharmacology” 2007, Sep; 53(4):473-80.

Moroni F., Lombardi G., Thomsen C., et al., *Pharmacological characterization of 1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid, a potent mGluR1 antagonist*, “J Pharmacol. Exp. Ther.”, 2 (1997) fasc. 281, p. 721-729.

Mosbacher J., Shopfer R.S., Ruppertsberg J.P., *A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors*, “Science”, 5187 (1994) fasc. 266, p. 1059-1062.

Nicoletti F., Arcella A., Iacovelli L., et al., *Metabotropic glutamate receptors: new targets for the control of tumor growth?*, “Trends Pharmacol. Sci.”, 5 (2007) fasc. 28, p. 206-213.

Nicoletti F., Bruno V., Copani A., et al., *Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders ?* “Trends in Neurosci.”, (1996) 19, p. 267-271.

Nishimura S., Wakabayashi N., Toyoda K., et al. *Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cell.. a possible stem cell marker of human colon epithelium.* “Dig Dis Sci”. 48 (2003) fasc. 8, p. 1523-1529.

O’Brien CA., Pollet A., Gallinger S., et al. *A human colon cancer cell capable of initiating tumor growth in immunodeficient mice.* “Nature” 2007.

Pellicciari R., Luneia R., Costantino G., et al., *1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid : a novel antagonist of phospholipase C-linked metabotropic glutamate receptors*, “J. Med. Chem.”, (1995) 38, p. 3717-371.

Peters GJ., Laurensse E, Leyva A, et al., *Sensitivity of human, murine, and rat cells to 5-fluorouracil and 5'-deoxy-5-fluorouridine in relation to drug-metabolizing enzymes.*” Cancer Res” 46 (1986) fasc.1, p. 20-8

Pin J.P., Duvoisin R., *The metabotropic glutamate receptors: structure and functions*, Neuropharmacology, (1995) 34, p. 1-26.

Pickering DS., Thomsen C., Suzdak PD., et al. *A comparison of two alternatively spliced forms of a metabotropic glutamate receptor coupled to phosphoinositide turnover.* ” J Neurochem.” 61 (1993) fasc.1, p85-92.

Pollock PM., Cohen-Solal K., Sood R., et al. *Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia.* “Nat Genet”. 34 (2003) fasc.1, p.108-112.

Potten CS., Owen G., Booth D. *Intestinal stem cell protect their genome by selective segregation of template DNA strands.* “J Cell Sci”. 115 (2002) fasc.11, p. 2381-2388.

Ricci-Vitiani L., Lombardi DG., Piloizzi E., et al. *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cell.* "Nature". 445 (2007) fasc. 7123, p. 111-115.

Romano C., Yang W.L., O'Malley K.L., *Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer,* "J. Biol. Chem.", 45 (1996) fasc. 271, p. 28612-28616.

Schiffer H.H., Swanson G.T., Heinemann S.F., *Rat GluR7 and a carboxy-terminal splice variant, GluR7b, are functional kainate receptor subunits with a low sensitivity to glutamate,* "Neuron", 5 (1997) p. 1141-1146.

Schmoll HJ., Dihydropyrimidine dehydrogenase inhibition as a strategy for the oral administration of 5-fluorouracil: utility in the treatment of advanced colorectal cancer." *Anticancer Drugs*". 14 (2003) fasc.9, p. 695-702.

Schoepp D.D., Jonson B.G., Monn J.A., *Inhibition of cyclic AMP formation by a selective metabotropic glutamate receptor agonist,* "J. Neurochem.", (1992) 58 p. 1184-1186.

Schoepp D.D., Kingston A.E., O'Neill M.J., et al., *Neuroprotective actions of novel and potent ligands of group I and group II metabotropic glutamate receptors,* "Ann. NY Acad. Sci.", 890 (1999) p. 438-449.

Shmelkov SV., St Clair R., Lyden D., et al. *AC133/CD133/Prominin-1.* "Int J Biochem Cell Biol". 37 (2005) fasc. 4, p. 715-719.

Singh SK., Clarke ID., Terasaki M., et al. *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors.* "Cancer Res". 63 (2003), fasc. 18, p. 5821-5828.

Sommer W., Matt W.J., *Human brain potential correlates of face encoding into memory,* "Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol." 6 (1991) fasc.79 p. 457-463.

Somogyi P., Shigemoto R., Lujan R. et al., *Location of postsynaptic mGluRs in relation to transmitter release,* "Neuropharmacology", 35 (1996) fasc. 29 p. 114-130.

Soung YH., Lee JW, Kim SY., et al. *Mutation of FADD gene is rare in human colon and stomach cancers.* "Apmis", 2004 Sep; 112 (9):595-7.

Strader C.D., Fong T.M., Graziano M.P., et al., *The family of G-protein-coupled receptors*, "FSAEB J.", (1995) 9 p. 745-754.

Sugiyama H., Ito I., Hirono C., *A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism*, "Nature", 6104 (1987) fasc. 325, p. 531-533.

Szilvassy SJ., Humphries RK., Lansdorp PM., et al. *Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cell by a competitive repopulation strategy.* "Proc Natl Acad Sci USA". 87 (1990) fasc. 22, p. 8736-8740.

Tanabe Y., Masu M., Ishii T. et al., *A family of metabotropic glutamate receptors*, "Neuron", (1999) fasc. 8, p. 169-179.

Tanabe Y., Nomura A., Masu, et al., *Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4*, J. Neurosci., (1993) 13, p. 1372-1378.

Thomsen C., Boel E., Suzdak P.D., *Actions of phenylglycine analogs at subtypes of metabotropic glutamate receptor family*, "Eur J. Pharm-Mol", (1994) 267 p.77-84.

Thomsen C., Mulvihill E.R., Haldeman B. et al., *A pharmacological characterization of the mGluR1 alpha subtype of the metabotropic glutamate receptor expressed in a cloned baby hamster kidney cell line*, "Brain Res.", 1 (1993) fasc. 619, p. 22-28.

Thomson A., *Glycine modulation of the NMDA receptor/channel complex*, "Trends Neurosci." 9 (1989) fasc. 12, p. 349-353.

Vescovi AL., Parati EA., Gritti A., et al. *Isolation and cloning of multipotential stem cell lines by epigenetic stimulation.* "Exp Neurol." 156 (1999) fasc. 1, p. 71-83.

Watkins and Collingridge, *Phenylglycine derivatives as antagonists of metabotropic glutamate receptors*, "TIPS", (1994) 15, p. 333-342.

Yatabe Y., Tavaré S., Shibata D. *Investigating stem cell in human colon by using methylation patterns*. "Proc Natl Acad Sci USA". 98 (2001) fasc. 19, p. 10839-10844 .